

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

14 ABR. 1978

ES	462029	A1
	19-8-71	



ESPAÑA

CONCEDIDA

Ref.: WW 4093/33

PATENTE DE INVENCION

70 PRIORIDADES: 71 NUMERO	72 FECHA	73 PAIS
76.09263-4	20 Agosto 1976	Suecia

74 FECHA DE PUBLICIDAD	75 CLASIFICACION INTERNACIONAL	76 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

77 TITULO DE LA INVENCION
"PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR UN MATERIAL INMUNOLOGICAMENTE ACTIVO"

78 SOLICITANTE (S)
D. CHARLES WADSWORTH

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
57 Marklandsgaten, Göteborg (Suecia)

79 INVENTOR (ES)
el propio peticionario

80 TITULAR (ES)
D. CHARLES WADSWORTH

81 REPRESENTANTE
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un método rápido y sensitivo para determinar materiales inmunológicamente activos en un fluido biológico observando una reacción de anticuerpo-antígeno después de aplicación de reactivos sobre la superficie de un gel.

5.

Son bien conocidos en el arte métodos de diagnóstico basados sobre una reacción de antígeno-anticuerpo en un gel. En los últimos años los métodos que utilizan el ensayo electroinmunológico de Laurell (Anal. Biochem. 15, 45, 1966) se han extendido tanto que se encuentran en el comercio tablas y normas, listas para el uso, para la medición de proteínas en el suero humano, particularmente las inmunoglobulinas A, G y M. Desafortunadamente estos métodos tienen la desventaja de ofrecer grandes errores cuantitativos lo que se ha demostrado cuando las muestras y standars de prueba son de caracter divergente, por ejemplo, con respecto al tamaño molecular.

10.

15.

Con el método de Mancini se consideran culpables las diferencias de la difusibilidad mientras que para el método de Laurell, entre otras cosas, se consideran responsables de las discrepancias de cuantificación las variaciones en electromobilidad y difusibilidad.

20.

El presente invento, que se basa en el hecho de que los antígenos así como sus anticuerpos específicos son solubles en solución acuosa mientras que los productos de su inmunoprecipitación son insolubles, evita la influencia de la difusión y electromobilidad. En efecto, el presente invento supera las desventajas de los métodos anteriores y

25.

proporciona un nuevo método que es rápido, preciso, simple de elaboración y económico.

- Más particularmente el presente invento se refiere a un procedimiento para determinar un material inmunológicamente activo en un fluido, que comprende utilizar una matriz de gel inerte sobre un soporte no reactivo, aplicar una parte alícuota de una muestra del fluido sobre el gel, cubrir el área de aplicación con una solución que contiene un material contra-reactivo específico, separar los materiales solubles sin reaccionar y observar los resultados de la reacción inmunológica.
- 5.
- 10.

- Además el presente invento se refiere a un procedimiento para determinar el contenido de proteína total en un fluido, que comprende utilizar una matriz de gel inerte o un soporte no reactivo, aplicar una parte alícuota de una muestra del fluido sobre el gel, fijar químicamente las proteínas y observar los resultados de la reacción.
- 15.

- El término "material inmunológicamente activo" se refiere a componentes de fluidos fisiológicos, células y extractos de tejido para los que se dispone o puede producirse un contrarreactivo inmunológico. Los materiales inmunológicos típicos son aminas primarias, aminoácidos, péptidos, proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, esterinas, esteroides, lipoides, ácidos nucleicos, enzimas, hormonas, vitaminas, polisacáridos y alcaloides.
- 20.
- 25.

Ejemplos de estas sustancias inmunológicamente activas se ofrecen en la tabla siguiente :

TABLA I

I. Microorganismos

Bacteria

1. Cocci gram-positivos
5. Streptococci (pyogenes, fecalis y viridans)
Staphylococci (aureus y albus)
Pneumococci (D. pneumoniae)
2. Cocci gram-negativos
Neisseria (gonorrhoeae y meningitidis)
10. 3. Bacilli aeróbicos gram-positivos
Bacillus anthracis
Corynebacterium diphtheriae
Erysipelothrix
Listeria monocytogenes
15. 4. Bacilli anaeróbicos gram-positivos
Clostridia (botulinum, perfringens, welchii y tetani)
5. Bacilli anaeróbicos gram-negativos
Escherichia
Klebsiella
20. Enterobacter
Proteus
Pseudomonas
Salmonella
Shigella
25. 7. Bacilli nonintestinales gram-negativos
Pasteurella (pestis y tularensis)
Haemophilus influenzae
Brucella (militensis, abortus y suis)
Bordetella pertussis
Malleomyces

8. Espiroquetas
 - Treponema pallidum
 - Leptospira
 - Borrelia
 5. 9. Micoplasma
 10. Micobacteria
 11. Vibrio
 12. Actinomices
- Protozoos
10. 1. Protozoos intestinales
 - Ameabae
 - 2. Flagelados
 - Trichomonas
 - Leishmania
 - 15. Trypanosomes
 - Toxoplasma
 - 3. Esporozoos
 - Plasmodia (vivax, falciparum, malariae y ovale)
 - 4. Nemátodos intestinales
 20. Oxiuros
 - Anquilostomas duodenales
 - Tricocéfalos
 5. Nemátodos del tejido
 - Trichinella
 25. Filaria (Wuchereria bancroftii)
 - Dracunculus
 6. Tremátodos
 - Schistosomes
 - Tremátodos intestinales

Tremátodos del tejido

7. Cestodos

Tenias

8. Toxoplasma (T. gondii)

5. Hongos

1. Sporotrichum

2. Cryptococcus

3. Blastomyces

4. Histoplasma

10. 5. Coccidioides

6. Candida

Virus y Rickettsias

1. Rickettsia

2. Virus

15. Hepatitis canina

Papiloma endémico

Gripe A y B

Peste aviar

Herpes simplex

20. Adenovirus

Poliooma

Rous sarcoma

Vacuna

Poliovirus

25. Sarampión

Moquillo canino

Leucemia

Parotiditis

Enfermedad de Newcastle

- Sendai
 - Virus huérfano humano citopatógeno entérico
 - Glosopeda
 - Psitacosis
 - 5. Rabia
 - Extremelia
 - Virus arbor
- II. Antígenos de tejido incluyendo antígenos específicos de órganos
- 10. Polisacáridos
 - Hialuronidasa
 - Toxina de tétanos
 - Ovalbúmina de huevo
 - Albúmina de suero ovino
 - 15. Riñón
 - Hígado
 - Piel
 - Corazón
 - Tracto gastrointestinal
 - 20. Próstata
 - Antígenos embriónicos (alfa 1 fetoproteína)
 - Antígenos tumorales (antígeno carcinoembrionario)
 - Músculo
 - Colágeno
 - 25. Amiloide
- III. Hormonas
- Hormonas pituitarias
 - Insulina
 - Glucagon

Hormona tiroide

Gonotropina coriónica

Hormona coriónica del crecimiento - prolactina

IV. Enzimas

5. Quimitripsinógeno
Procarboxipeptidasa
Deoxirribonucleasa
Ribonucleasa
Gliceraldehído -3-fosfato dehidrogenasa
10. Catalasa
Peroxidasa

V. Antígenos de células sanguíneas, sustancias del grupo sanguíneo y otros isoantígenos.

- Plaquetas
15. Megakariocitos
Leucocitos
Eritrocitos
Substancias del grupo sanguíneo
Antígeno Forssman
20. Antígenos de histocompatibilidad

VI. Proteínas de plasma

- Fibrina y fibrinógeno
Plasminógeno y plasmina
Albúmina
25. Inmunoglobulinas
Alfa-1-antiquimotripsina
Alfa-1-antitripsina
Factores complementarios
Ceruloplasmina

- 5. Ge-globulina
- Haptoglobina
- Alfa-2-macroglobulina
- Beta-2-microglobulina
- Orosomucoides
- Prealbúmina
- Transferrina
- VII. Proteínas de leche
- Lactoferrina
- 10. Lisozima
- IgA secretoria
- IgM secretoria
- Componente secretorio
- VIII. Proteínas de saliva
- 15. IgA secretoria
- IgM secretoria
- Componente secretorio
- IX. Proteínas de orina
- X. Proteínas patológicas
- 20. Proteína de mieloma
- Proteínas macroglobulinaémicas
- Proteínas disglobulinaémicas
- Proteínas Bence Jones I, II
- Proteína C-reactiva
- 25. Crioglobulinas
- XI. Anticuerpos incluyendo autoanticuerpos
- Factor antinuclear
- Autoanticuerpos tiroidales
- Proteína anti-Tamm-Horsfall

- Aglutininas frias
Factor reumatoide
Autoanticuerpos adrenales
Autoanticuerpos frente a células parietales gástricas
5. en anemia perniciosa
Anti-colon
Anti-hígado
Anti-riñón
Autoanticuerpos frente a espermatozoos
10. Anti-corazón
Autoanticuerpos musculares en myasthenia gravis
Autoanticuerpos frente al tejido nervioso
Autoanticuerpos contra tejido fibroso y componentes vasculares
15. Autoanticuerpos contra plaquetas y megacariocitos
Anticuerpos contra fotoblastos
Anticuerpos frente a microorganismos
Anticuerpos frente a antígenos animales
Anticuerpos frente a drogas.
20. Los materiales inmunológicamente activos particularmente preferidos son IgA, IgG, IgM, CRP (proteína C-reactiva) en el suero y las IgA y IgM secretorias en la leche.
25. El gel utilizado de conformidad con el presente invento puede elegirse entre uno de los muchos materiales inmunológicamente inertes formadores de gel como agar, agarosa, acetato de celulosa, gel de almidón, gelatina, poliacrilamida o sus combinaciones.

El gel puede contener adicionalmente un electro -

lito y/o un detergente disminuidor de la tensión superficial.

5. En el contexto de este invento el término "fluido" abarca fluidos biológicos por ejemplo suero, plasma, leche, orina, saliva o fluido espinal, fluido amniótico, fluido sinovial, fluido extravascular y otras secreciones y excreciones de los humanos y animales así como extractos acuosos de cualquier fuente viviente.

10. Todos los tipos de soporte no reactivo son apropiados de conformidad con el presente invento, por ejemplo placas, portaobjetos o películas que se utilizan en el campo médico o en laboratorios. El soporte puede estar constituido por cualquier material apropiado tal como, por ejemplo, vidrio o material sintético y de preferencia es transparente.

15. El término "aparte alicuota de una muestra" o "gota" tal como se utiliza en el contexto de este invento significa cantidades en microlitros de hasta alrededor de 10 microlitros, usualmente de 1 a 4 microlitros, del fluido que ha de investigarse. Estas cantidades de microlitros del fluido que ha de probarse se aplican, de preferencia, por medio de un microaplicador tal como una micropipeta.

20. La solución del material contrarreactivo que se aplica para cubrir el área de aplicación de la parte alicuota de muestra del fluido que ha de analizarse contiene cualquier sustancia apta para reaccionar inmunológicamente con el material que ha de determinarse.

25. Si bien pueden preverse otros sistemas inmunológicos, por ejemplo basados en un método de anticuerpo doble o reacción competitiva utilizando reactivos señalados o eti-

quetados, la modalidad más preferida del presente invento consiste en utilizar una solución de material contrareactivo que contenga para la determinación de un antígeno un anticuerpo específico para dicho antígeno y para la determinación de un anticuerpo el antígeno correspondiente.

5.

Si bien la cantidad de la solución que contiene el material contrareactivo no es realmente crítica, es crucial que exceda la primera parte alícuota en volumen aplicada de modo que todos los materiales inmunológicamente activos de la muestra tengan la oportunidad de reaccionar con sus contrapartes.

10.

La solución que contiene el material contrareactivo inmunológico es de preferencia una solución acuosa que puede contener aditivos especialmente utilizados en las pruebas inmunológicas, por ejemplo solución salina tamponada de fosfato.

15.

En el procedimiento del invento el pH debe mantenerse, de preferencia, entre 5 y 9 para evitar una desnaturalización de los materiales inmunológicamente activos implicados en la reacción. Esto puede obtenerse con sistemas de tampón convencionales apropiados tal como tampones de fosfato o barbitol.

20.

La observación de los resultados de las reacciones inmunológicas depende de la naturaleza de la prueba y de la forma de visualización que ha de utilizarse. Los métodos de visualización que pueden utilizarse en el contexto de este invento son, por ejemplo, radiodetección, detección fluorométrica, detección enzimática, detección espectrofotométrica, inspección visual.

25.

En una modalidad preferida del invento los resul

tados se observan espectrofotométricamente o visualmente después de la coloración.

- De conformidad con una modalidad preferida del invento, se adiciona sobre una matriz de gel una gota de flúido sujeto a investigación, conteniendo el antígeno, eventualmente diluido y/o tratado por ejemplo mediante calentamiento de modo que el componente de interés sea demostrable. Se cubre la gota con un exceso de anticuerpo, se lavan los antígenos no reactivos y el exceso de anticuerpos, se colo-
- 5.
- 10.
- 15.
- Se cubren los productos de la inmuno-precipitación y se compara el resultado con una escala de color conocido. Cuando debe determinarse la cantidad de cierto anticuerpo en un suero se invierte el orden de aplicación y se aplica primero una gota de suero y luego una gota de antígeno. Se dispone la matriz de gel de preferencia sobre una placa de vidrio o similar y se llevan a cabo una serie de pruebas paralelas para obtener valores seguros.

- También es posible determinar la cantidad de antígeno o anticuerpos distintos en forma simultánea. Para este fin se rocían gotas del flúido que ha de analizarse (flúido primario) en una pauta sobre la matriz de gel y se cubren las secciones individuales con varios flúidos contrarreactivos (flúidos secundarios) conteniendo diferentes tipos de anticuerpos o antígenos que reaccionan específicamente con los antígenos o los anticuerpos del flúido primario.
- 20.
- 25.

En ciertos casos puede ser interesante determinar la cantidad total de proteína de un cierto flúido on adición a la cantidad de cierto antígeno o de determinados antígenos específicos. Para este fin pueden, según una modalidad adicional del invento, fijarse químicamente todas las proteínas

en alguna de las gotas y tratar las otras gotas con anticuerpos de modo que sobre la misma matriz se obtenga, por una parte el valor del total de proteína y por la otra parte uno o más valores parciales.

5. Para obtener una penetración uniforme de las gotas en la matriz de gel es conveniente que ésta contenga cierta cantidad de una solución que disminuya la tensión superficial. La absorción se produce de forma relativamente lenta y cabe esperar cierta diseminación.

10. Para asegurar la distribución uniforme de las gotas ha resultado ventajoso, por lo menos durante la fase inicial del tiempo de reacción, dejar que pase una corriente alterna a través de la matriz de gel. De este modo se mantienen unidas las distintas moléculas de la gota. Se obtienen resultados satisfactorios con un voltaje comprendido entre 1 y 3 V por matriz de 1 cm entre el papel de filtro que hace puente en los bordes de la placa, siendo preferido un voltaje de 2,5 V.

20. En ciertos casos el antígeno puede enlazarse a otra molécula, por ejemplo albúmina. Cuando el antígeno se une con su anticuerpo y se vuelve insoluble permaneciendo la otra molécula. Puede ser de interés determinar la cantidad de antígeno más la otra molécula, por ejemplo la albúmina. En una modalidad específica se procede como se ha expuuesto anteriormente, o sea se aplica sobre la matriz un par de gotas del fluido primario conteniendo el complejo de antígeno-albúmina, se aplica una cantidad apropiada del fluido secundario que contiene el anticuerpo específico para el antígeno sobre las gotas de fluido primario y se deja que reaccionen los componentes, separándose luego

25.

los componentes solubles mediante lavado. Permanece la albúmina enlazada al antígeno.

5, Luego se aplica cierta cantidad de un fluido que contiene un anticuerpo específico para albúmina sobre el material reaccionado de una de las gotas y después de un tiempo de reacción apropiado se lava el material sin reaccionar no específico para la albúmina. A continuación se colorean los productos finales de la inmunoprecipitación.

10, Con el fin de cuantificación puede utilizarse una escala de color preparada de antemano, pero es más apropiado producir por lo menos tres estándares conteniendo distintas cantidades conocidas del componente investigado, directamente sobre la matriz. De este modo se evita cualquier error de matiz debido a diferencias en efectuar la prueba.

15, La ilustración del invento se amplía por medio de la descripción que sigue con referencia a los dibujos.

En los dibujos :

20, La figura 1 representa, esquemáticamente, una modalidad específica de un dispositivo apropiado para llevar a cabo el método del invento.

La figura 2 muestra, esquemáticamente, las etapas más importantes de una realización específica de un proceso para determinar, simultáneamente, tres componentes distintos (IgA, IgG o IgM).

25, En la figura 1 el número 10 representa una placa de vidrio o una placa de un material no reactivo transparente. Sobre esta placa se dispone una matriz de gel 11 conteniendo agar o agarosa y una cantidad menor de un disolvente que disminuye la tensión superficial. En este caso particular

el gel contiene también un electrolito.

5. La placa 10 se dispone horizontalmente sobre dos recipientes 12 y 13 conteniendo un fluido 14, usualmente el mismo que el electrolito en el gel. Se conecta la matriz de gel 11 con el fluido 14 de los recipientes 12 y 13 por medio de puentes 15 del papel de filtro o similar. Los contactos 16 conectados a un suministro de corriente alterna 17, se sumergen en el fluido 14.

10. En operación se aplican pequeñas gotas del fluido biológico primario que ha de investigarse sobre la matriz de gel y se cubre cada una de las gotas con un volumen mayor de un fluido secundario que contiene el contra-reactivo para el componente que ha de investigarse, por ejemplo anticuerpos monoespecíficos cuando la tarea consiste en determinar un determinado antígeno, o un antígeno apropiado cuando la tarea consiste en determinar la cantidad de cierto anticuerpo en el suero u otro fluido corporal.

15. El procedimiento esencial es más evidente a partir de la figura 2 que muestra una matriz con gotas de fluido y productos de reacción aplicados.

20. El fluido que ha de investigarse se considera que contiene antígenos IgA, IgG e IgM (Más, eventualmente, otros componentes solubles). Los antígenos en cuestión se encuentran en la parte superior de la matriz marcada con varios símbolos para distinción.

25. La matriz se divide simbólicamente en tres campos verticales, y en cada uno de estos se aplican dos gotas del fluido primario. Con el fin de ilustración se con

sidera que la gota a la derecha de cada campo se refiere a un juego con un contenido de antígenos superior que en la gota de la izquierda .

5. Además la matriz se divide simbólicamente en sentido horizontal y en el margen izquierdo se encuentra una letra que se refiere a cierta etapa del proceso.

10. La banda horizontal más superior marcada con b) representa la aplicación de pequeñas gotas del fluido primario. La banda subsiguiente marcada con e) representa la aplicación de gotas mayores de los fluidos secundarios.

15. Se considera también que en el campo izquierdo - vertical - se pretende determinar la cantidad de IgA, en la porción media la cantidad de IgG y en la porción derecha la cantidad de IgM. Así pues en este caso se utilizan tres fluidos secundarios distintos, cada uno de los cuales contiene anticuerpos monoespecíficos frente a IgA, IgG o IgM.

20. En la banda horizontal subsiguiente se conocen los productos insolubles de la inmunoprecipitación. Una porción (llave d) de esta banda muestra los anticuerpos en exceso solubles y los antígenos sin reaccionar solubles en cada campo vertical. Estos componentes solubles se lavan por lo menos una vez con una solución tampón. A continuación se comprimo un papel de absorción contra la matriz de modo que se separen los componentes solubles que no han tomado parte en la reacción y permanecen solubles.

25. A continuación se colorean los componentes reaccionales y se decolora la matriz de gel que circunda estos componentes de reacción. Las diferencias de matiz indican-

do cantidad de reactivos precipitados se exponen en la banda e) y deben compararse con una mezcla de color. Esto puede realizarse con una escala independiente, preparada de antemano, pero para evitar posibles variaciones que podrían ocurrir debido a la forma de proceder es aconsejable establecer cada vez una escala de color estandard, directamente sobre la matriz, tal como se representa por medio de la banda f).

5. En este caso se utilizan soluciones con cantidades conocidas de los antígenos relevantes y se aplican en filas sobre la matriz. Se dispone de una solución stock con elevada concentración y se diluye o se dispone de muchas soluciones distintas con concentraciones escalonadas variables conocidas. En el presente caso existen seis grados de color distintos y la concentración aumenta de izquierda a derecha.

10. El proceso sigue la misma pauta que se ha descrito anteriormente, o sea, se aplica el número necesario de gotas del fluido primario, luego el número de gotas correspondiente de los fluidos secundarios, se lava, se seca y se colorea concurrentemente con la elaboración en el campo vertical correspondiente. Las escalas para IgA e IgG son aproximadamente idénticas mientras que la de IgM es algo más débil que las otras dos.

15. Los ejemplos que siguen amplian la ilustración del invento.

EJEMPLO 1

Determinación de la cantidad de una proteína-antígeno arbitraria. Se elige un gel, por ejemplo conteniendo

- 1% de agarosa y 0,01% de Tween 80 y se esparce hasta una fina capa de 1 mm sobre una placa de vidrio. El gel contiene también un componente eléctricamente conductor, por ejemplo 37,5 mmol de voronal por 1 litro con un pH de 8,6. La
5. capa de gel se conecta mediante puentes de papel de filtro con recipientes que contienen un tampón de voronal a 75 mmol por 1 litro. Los recipientes se acoplan para conectarse a un suministro de corriente alterna con un voltaje de 2,5 v por 1 cm a través de la matriz.
10. Se hace pasar corriente mientras se aplica el fluido primario y durante 15 minutos después de la aplicación del fluido secundario. A continuación se deja sin corriente la placa durante unos 10 minutos.
15. Las proteínas que no han reaccionado todavía están solubles y la placa con la matriz de gel se sumerge un par de veces en solución salina tamponada con fosfato y se comprime; después de cada inmersión, bajo alrededor de 1 kg de peso, con un grueso papel de absorción que absorbe las proteínas insolubles y soluciones salinas. El tratamiento
20. se repite hasta que se tiene la seguridad de que se han separado todos los componentes solubles.
- En este caso la coloración se efectúa con una solución "Coomassie Blue R".
- Luego se decolora la matriz de gel para obtener
25. un fondo claro que contraste con el inmuno precipitado.
- Según ya se ha indicado anteriormente pueden utilizarse escalas de color standards o prepararse directamente sobre la matriz.

EJEMPLO 2

Cuantificación simultánea de diversos antígenos, por ejemplo IgA, IgG e IgM (figura 2).

5. Se efectúan diversas aplicaciones en una pauta regular y se cubren las áreas dentro de las secciones individuales de la pauta con antisuero correspondiente a los distintos antígenos y a continuación se lava, se comprime, se seca, se colora y se observan los grados de color obtenidos como en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3

10. Determinación de la cantidad de antígenos acoplejados; por ejemplo IgG-albúmina, IgG-IgA o IgG-IgM en el suero humano.

15. Se procede del mismo modo que se ha descrito antes en el ejemplo 1, o sea se adicionan una o más gotas del fluido que ha de investigarse sobre la matriz y se cubren primero con la solución que contienen los anticuerpos específicos para un componente en el complejo y luego se lava la matriz. A continuación se cubren las áreas de aplicación con otra solución conteniendo los anticuerpos específicos para el otro componente en el complejo y por último se procede de conformidad con las etapas de los ejemplos precedentes.

20. En caso de que se desee determinar, en adición a la cantidad total de los antígenos acoplejados, la cantidad de uno de los componentes en dicho complejo se aplican dos gotas o dos filas de gotas y se trata la gota o la fila de gotas de conformidad con el ejemplo 1 para la cuantificación de un componente individual, y la otra gota o fila de gotas de conformidad con la descripción del párrafo pre-

codonto. Deben incluirse en la matriz una escala de color o porciones que representen los componentes individualmente o como antígenos a complejados.

EJEMPLO 4

5. Caracterización y cuantificación de IgA humana.
Se prepara una solución de gel disolviendo (en ebullición) 0,5 g de agarosa (Bio-Rad) en 25 cc de H₂O destilada y se mantiene a 55-60°C. Se mezclan 10 cc de esta solución con 10 cc de tampón, por ejemplo barbital-barbital Na (Merck) 75 mmol/l, NaN₃ 6 mmol l/l, pH 8,6 con una adición de Tween 20 hasta 0,01% también a 55-60°C, se vierte la mezcla sobre una placa de vidrio a nivel (12 x 16 x 0,1 cm) y se deja que gelifique en un medio saturado de H₂O proporcionando una matriz de gel con un espesor de alrededor de 1 mm.
10. Se preparan solubles de antígeno a partir de un banco de suero donador de sangre (HS St) que se ha evaluado para concentración de inmunoglobulina A, G y M con la referencia estandar 67/97 de la Organización Mundial de la Salud. El diluyente es PBS (solución salina tamponada con fosfato), pH 7,1. Se diluye la fracción de inmunoglobulina de IgA anti-humano de conejo específica para cadenas alfa (Dakopatts, Brostex A/S, Copenhagen) con PBS hasta una concentración de 133 microgramos por cc, o sea 1 cc de antisuero puede ligar 133 microgramos de antígeno específico (descripción del fabricante).
15. La placa (soporte de vidrio y matriz de gel) se dispone horizontalmente sobre un aparato de electroforesis apropiado con dos recipientes conteniendo el tampón de bar

5. bital antes citado sin el Tween. Se disponen puentes de papel de filtro (Whatman nº 3) para cubrir alrededor de 0,5 cm de los bordes mayores de la matriz de gel y sumergirse en el tampón de los recipientes que están provistos con electrodos conectados a un transformador veriac alimentado con corriente ordinaria, 220 V, 50 Hz.

10. Se acciona la corriente y se establece a través de la placa un potencial de 2,5 V/cm. Dentro de 10 minutos se inicia la aplicación de 4 microlitros de muestras del antígeno. Tan pronto como las muestras son absorbidas por el gel (unos 5 minutos) se superponen las gotas de antisue-ro (10 microlitros). Los reactivos se aplican dentro de 15 minutos. El aparato se cubre para proteger la placa contra la evaporación y el polvo. Al cabo de cuarenta minutos se cubre la última gota de antígeno con antisuero, se desco-
15. necta la corriente y se deja que se estabilice la placa durante 10 minutos.

20. Se extrae la placa del aparato, se lava con PBS y se cubre con papel de filtro, una gruesa capa de 0,5-1,0 cm de papel absorbente, una placa de vidrio y un peso de 1-2 Kg. Al cabo de unos 15 minutos, cuando el líquido y los componentes solubles de la agarosa se han cluido mediante el papel absorbente, se separan éstos y el papel de filtro. Se hincha la agarosa durante 5 minutos con PBS fresco bajo
25. un nuevo trozo de papel de filtro. Diez minutos más tarde se comprime de nuevo con un papel de filtro nuevo, papel absorbente, el vidrio y el peso. Se repite por tercera vez la compresión, pero después de ésta se deja en posición el papel de filtro y se deja secar la película de agarosa.

- Los precipitados de antígeno-anticuerpo de la película de agarosa seca se tiñen durante 10 minutos en un baño de tinción Coomassie Brilliant Blue R (Sigma): 2,5 g de color por litro de ácido acético glacial, etanol al 95% H₂O destilada (1 + 3,5 + 5,5 partes, respectivamente).
5. Después de lavado con agua del grifo se efectúa la decoloración en un baño de los disolventes antes citados (1 + 2,5 + 6,5 partes, respectivamente) hasta que el fondo de los puntos teñidos es claro.
10. La intensidad del color precipitado se registra con un Chromatogram Spektralphotometer KM3 (Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany). La placa se pasa a través de un rayo de luz de 0,1 mm x 10 mm a una velocidad de 30 mm/min. La absorción a 558 nm se controla como una curva con un registrador Hitachi Perkin-Elmer 165 a 5 mV y una velocidad de gráfica de 60 mm/min. El área de los picos trazados que representan la cantidad del precipitado se calcula como ocho veces el ancho a la mitad de la altura del pico.
15. En la Tabla 1 se expone la concentración de IgA en las diluciones de Hs St y las áreas en mm² dividido por 40 de los picos de curva registrados.
- 20.

TABLA I

Concentración de IgA g/l	Area del pico mm ² /40
0,0085	4,4
0,0085	4,9
0,0143	8,8
0,0215	14,7
0,0285	17,5
0,0285	17,6
0,0343	20,3
0,0428	22,4
0,0428	22,4
0,0573	30,5

Las áreas calculadas de los picos muestran que cuando aumenta la concentración de antígeno también aumenta el área del pico trazado, o sea se forma más precipitado que conduce a mayor tinción absorbida y registrada como un aumento proporcional en el área de los picos trazados. Así pues, la cantidad de color depende de la concentración de antígeno y este parámetro puede utilizarse para la cuantificación de IgA.

5.

EJEMPLO 5

10.

Caracterización y cuantificación de IgG humano.

Se prepara la placa y se lleva a cabo el procedimiento tal como se ha descrito en el ejemplo 4 excepto que la fracción de inmunoglobulina de antisuero de conejo frente a IgG humana (cadena gamma específica, Dakopatts) se sustituye por anti-IgA. Se diluye hasta una concentración de 200 microgramos por cc. Los resultados se ofrecen en la Tabla 2.

15.

TABLA 2

20.

Concentración de IgG g/l	Área del pico mm ² /40
0,0100	5,9
0,0168	10,2
0,0250	14,4
0,0333	22,9
0,0400	24,6
0,0500	29,4

25.

Puede observarse que las áreas de los picos trazados son proporcionales a las concentraciones de antígeno indicando que el proceso puede utilizarse para la cuantificación de IgG.

EJEMPLO 6

Caracterización y cuantificación de IgM humana.

5. Se prepara la placa y se lleva a cabo el proceso tal como se ha descrito en el ejemplo 4 con la excepción de que se utiliza la fracción inmunoglobulina de antisuero de conejo frente a IgM humana (λ = cadena específica, Dako-patts) en lugar de anti-IgA. Se diluye hasta 200 microgramos/cc. Los resultados observados se exponen en la Tabla 3.

10.

TABLA 3

Concentración de IgM g/l	Área del pico mm ² /40
0,0158	3,0
0,0263	6,0
0,0395	9,1
0,0528	11,6
0,0633	14,2
0,0790	17,2

15.

Se aprecia que las áreas de los picos trazados son proporcionales a las concentraciones de antígeno; por lo que el proceso puede utilizarse para la cuantificación de IgM.

20.

EJEMPLO 7

Cuantificación de IgG humana en presencia y ausencia de un potencial de corriente alterna, durante distintos períodos de tiempo.

25.

Se preparan dos placas tal como se ha descrito en los ejemplos 4 y 5 a excepción de que una placa se soporta horizontalmente sin conexión a una fuente de corriente alterna. El proceso con ambas placas se lleva a cabo como en el ejemplo 4 a excepción de que las soluciones de antígeno y antisuero, IgG y anti-IgG como en el ejemplo 5, se

aplican a intervalos para permitir tiempos de reacción de 20, 40, 60 u 80 minutos. Los resultados observados se indican en la Tabla 4.

TABLA 4

Concentración de IgG g/l	Área del pico mm ² /40							
	20 min. volts/cm.		40 min volts/cm		60 min volts/cm		80 min. volts/cm	
g/l	2,5	nin-guna	2,5	nin-guna	2,5	nin-guna	2,5	nin-guna
0,010	10,0	8,8	12,7	9,8	13,2	13,5	13,5	11,9
0,024	19,5	19,2	23,2	20,9	25,8	24,6	26,3	24,5
0,025	25,2	26,3	27,6	23,0	27,6	24,8	30,3	26,8
0,033	29,4	26,7	34,2	33,0	34,5	28,6	41,3	32,9
0,045	39,1	35,5	46,5	39,2	45,6	43,2	47,6	44,5
0,050	42,7	40,1	48,3	41,8	48,5	45,3	48,5	46,2
0,083	59,1	56,6	74,4	62,3	67,3	67,9	72,5	68,8

Las áreas del pico que representan la IgG precipitada en todas las concentraciones de antígeno aumentan con respecto a mayor tiempo de reacción. Excepto en 3 casos las áreas medidas en presencia de corriente alterna (CA) son superiores a las registradas en su ausencia. Con la corriente la cantidad de precipitado aumenta sobre la media en 18,6 % entre 20 y 40 minutos; difícilmente se modifica durante 40 a 60 minutos y se eleva del 6,6 % de 60 a 80 minutos de tiempo de reacción. Sin corriente los aumentos porcentuales medios de precipitado para estos periodos de tiempo son: 8,0%, 8,0% y 2,4%, respectivamente. Así pues la IgG aplicada dentro de 20 minutos y reaccionando con anti-IgG durante

40 a 60 minutos resultará más apropiadamente cuantificada con un medio de corriente alterna que sin éste:

EJEMPLO 8

5. Caracterización y cuantificación de inmunoglobulinas humanas A, G y M y los resultados fotométricos analizados con un método alternativo.

10. Se prepara una placa y se lleva a cabo el proceso según los ejemplos 4, 5 y 6, o sea, se cuantifican diluciones de suero humano para inmunoglobulinas A, G o M. Se utilizan tres microlitros de antígeno y 6 microlitros de anti-suero. Después del registro fotométrico del grado de coloración la altura en mm de los picos trazados se refiere a la concentración de inmunoglobulina analizada, véase la Tabla 5A, B y C.

15.

TABLA 5

Immunoglobulina y concentración, g/l	Altura del pico, mm
--------------------------------------	---------------------

A. IgA

0,0085	14,0
0,0085	17,0
20. 0,0143	29,0
0,0215	46,0
0,0285	57,5
0,0285	56,0
0,0343	66,5
0,0428	74,5
0,0428	70,0
0,0573	100,0

25.

B. IgG

0,0100	21,5
0,0168	35,5
0,0250	50,0
0,0333	72,5
0,0400	82,0
0,0500	99,0

TABLA 5 (cont.)

	<u>Inmunoglobulina y</u> <u>concentración, g/l</u>	<u>Altura del pico,</u> <u>mm</u>
	<u>C. IgM</u>	
5.	0,0158	3,0
	0,0263	6,0
	0,0395	9,1
	0,0528	11,6
	0,0633	14,2
	0,0790	17,2

10. Los picos trazados son proporcionalmente superiores en relación al aumento de concentración de inmunoglobina. Así pues, la altura del pico en mm representativa de la intensidad del precipitado coloreado puede utilizarse como una medida de la cantidad de antígeno analizada en el punto coloreado.

15.

EJEMPLO 9

Caracterización y cuantificación de inmunoglobulinas humanas A, G y M, observándose los resultados mediante inspección visual.

20.

Se prepara una placa y se lleva a cabo el procedimiento como en el ejemplo 8 a excepción de que los resultados se observan mediante inspección visual así como mediante registro fotométrico. Se incluyen en la placa puntos de referencia estándar que representan cantidades conocidas de antígeno para cada clase de inmunoglobulina. Las alturas en mm de los picos medidos se trazan frente a los microgramos conocidos de antígeno para IgA, IgG o IgM. A partir de estas curvas se determina y convierte la cantidad de IgA, IgG o IgM en los puntos de prueba, utilizando el factor de dilución y volumen de muestra aplicada, para

25.

establecer la concentración de inmunoglobulina en el suero ensayado.

5. El modo de inspección visual de cuantificación se lleva a cabo con la placa, hacia abajo el lateral con gel, sobre un fondo mate blanco. La intensidad de color en una mancha de prueba se compara con los distintos grados de color anotados para los puntos de referencia estándares correspondientes y se estima la cantidad de antígeno que forma la mancha de prueba.

10. La concentración de inmunoglobulina en el suero ensayado se calcula, como antes, utilizando el factor de dilución y tamaño de la muestra. Los resultados observados con estos modos de estimación comprenden la Tabla 6A, B y C.

15.

TABLA 6

Cantidad de inmunoglobulina en microgramos en la mancha		Concentración de inmunoglobulina g/l, en el suero probado	
Fotometría, curva en al-tura	Inspección visual	Fotometría, curva en al-tura	Inspección visual

20.

A. IgA

0,204	0,230	2,14	2,42
0,182	0,200	1,91	2,10
0,132	0,139	1,39	1,46
0,126	0,139	1,32	1,46
0,113	0,116	1,18	1,22
0,059	0,050	0,62	0,53

25.

B. IgG

0,238	0,225	24,99	23,63
0,203	0,205	10,63	10,66
0,198	0,193	10,40	10,04
0,174	0,193	9,14	10,04
0,072	0,070	7,46	7,35
0,069	0,064	7,25	6,72
0,062	0,050	6,46	5,25
0,032	0,030	3,36	3,15

TABLA 6 (Cont.)

5.	Cantidad de inmunoglobulina en microgramos en la mancha		Concentración de inmunoglobulina g/l, en el suero probado	
	Fotometría, curva en altura	Inspección visual	Fotometría, curva en altura	Inspección visual
	C. IgM			
	0,300	0,291	1,58	1,53
	0,219	0,245	1,15	1,29
	0,178	0,161	0,93	0,85
	0,145	0,148	0,77	0,78
	0,027	0,035	0,14	0,18

10. La tabla muestra que las estimaciones visuales de la cantidad de inmunoglobulina en las manchas de la placa se ajustan con las leídas a partir de las curvas de altura de pico correspondientes obtenidas fotométricamente. Además concuerdan también con las concentraciones calculadas de inmunoglobulina A, G o M en el suero probado.

15.

EJEMPLO 10

Caracterización y cuantificación de proteína C-reactiva humana (PCR).

20. Se prepara la placa de igual modo que en el ejemplo 4 a excepción de que se mezclan 8 cc de 2% de agarosa con 12 cc del tampón de barbital modificado con la adición de lactato de Ca, 12,3 mmol/l y a pH 8,2. La referencia analizada está constituida por un banco de suero conteniendo elevadas concentraciones de PCR que se ha evaluado para la PCR en el Laboratorio de Diagnóstico, Departamento de Inmunología, Ciudad de Göteborg, Suecia. Este se diluye con el tampón antes citado sin Tween para proporcionar standards con distintas concentraciones de PCR.

25.

La fracción de inmunoglobulina de antisuero de conejo frente a PCR humana (Dakopatts) se diluye 1/3 con PBs.

5. El procedimiento utilizado es esencialmente el mismo que en el ejemplo 4 a excepción de que se aplican partes alicuotas de 3 microlitros de antígeno y se superponen volúmenes de 5 microlitros de antisuero. A través de la placa se utiliza un potencial eléctrico de 2,0 V/cm. Con el registro fotométrico se utilizan 2 mV.

10. Los resultados se exponen en la Tabla 7.

TABLA 7

Concentración de PCR mg/l	Area del pico mm ² /40
1,1	7,4
3,3	15,0
6,7	27,0
12,0	46,6
15,0	56,0
20,0	66,6

20. El área de los picos trazados aumenta en relación al aumento de concentración de antígeno, indicando cantidades proporcionalmente en aumento de precipitado coloreado. Por consiguiente este proceso es aplicable a la cuantificación de PRC humana.

25. EJEMPLO 11

Caracterización y cuantificación rápida de PRC en suero de pacientes.

Se prepara la placa tal como se ha descrito en el ejemplo 10, siendo iguales los estándares de referencia.

El suero del paciente, del que se ha evaluado previamente la PCR, se enriquece con cantidades conocidas de la PCR sin diluir estandar y se diluye (1/5 y 1/15) con el tampón de barbital. Se efectúan diluciones similares con HS St, un banco donador de sangre con una valoración de la PCR negativa. Ambas diluciones de HS St se ensaya sin y con el reactivo de antisuero, mientras que solo las diluciones de 1/5 del suero del paciente se ensayan sin antisuero.

5.

El proceso se lleva a cabo como se ha descrito en el ejemplo 10 a excepción de que los resultados se determinan visualmente y fotométricamente como en el ejemplo 9. Los valores estimados para el suero de prueba se ajustan mediante comparación con los grados de color del HS St de control negativo. Las Tables 8 A y B ofrecen la reacción del color del HS St probado con y sin antisueron y las del estandar de PCR con antisuero aplicado a concentraciones y diluciones similares, utilizando como criterio la altura del pico

15.

TABLA 8

20.

Concentración de PCR mg/l	Dilu - ción del suero	Altura del pico en mm	
		Anti-PCR	sin anti-PCR
A. HS St.			
0,07	1/15	5,0	2,3
0,20	1/5	7,4	4,3
B. PCR standard			
1,1	1/54	7,8	-
4,0	1/15	17,0	-
10,0	-	32,0 π	-
20,0	1/3	59,2	-

25.

π - Límite sobrenormal en este experimento

5. En la Tabla 8 puede apreciarse que el suero humano con concentración de PCR muy baja puede registrar alturas de pico bajas en las diluciones utilizadas, pero éstas son muy inferiores que para el límite normal superior para la PCR en el suero, así como aquellas para diluciones similares de la PCR estandard.

10. En la Tabla 9 se ofrecen los resultados de cuantificaciones de la PCR en el suero enriquecido de pacientes llevada a cabo mediante inspección visual, junto con las concentraciones calculadas para PCR.

TABLA 9

	<u>Concentraciones de PCR, mg/l</u>	<u>Estimación visual</u>
	<u>Calculado</u>	
	16,8	16,2
15.	33,0	35,5
	47,0	42,0
	50,0	49,0
	51,0	51,0
	99,0	99,0
20.	101,0	97,5
	107,0	105,0

25. Las estimaciones visuales se ajustan estrechamente a las concentraciones calculadas, indicando que este proceso de lectura visual es apropiado para la cuantificación de PCR.

EJEMPLO 12

Caracterización y cuantificación de IgA secreto_{rio}, así como determinación de su proporción del total proteínico en la leche humana.

5. Se preparan dos placas tal como se ha descrito en el ejemplo 4 y con una placa se procede como en el ejemplo 8. Se utiliza el mismo tipo de curva standard. tal como se ha descrito en el ejemplo 9, para establecer la concentración de IgA secretoria en las muestras de leche humana e IgA secretoria purificada.

10. El procedimiento con la segunda placa se modifica después de la aplicación del antígeno. Se utilizan diluciones apropiadas (con PBS) de HS St para establecer una curva standard según su contenido de proteína total. Se aplican también diluciones apropiadas con PBS de la leche humana y con IgA secretoria purificada. Se dejan transcurrir 10 minutos para la absorción de antígeno en el gel y luego se separa la placa del aparato. Se dispone durante 15 minutos en un baño de ácido pícrico (5 partes de ácido pícrico saturado + 1 parte de ácido acético glacial) para fijar químicamente las proteínas. Se baña la placa con etanol al 95% y se dispone un trozo de papel de filtro sobre el gel. Luego se comprime con papel absorbente, etc. y se sigue el proceso básico.

20. En las Tablas 10A y B se exponen los resultados de estos ensayos paralelos para IgA secretoria y total de proteína en la leche humana. Se incluyen con fines comparativos algunas cifras de referencia para el total proteínico (Ensayo Micro-Kjeldahl, Espectrofotometría y Lowry y análisis de aminoácidos).

25.

TABLA 10

	Concentración de IgA secretoria g/l	Total proteínico g/l	Relación IgA/proteína	Total proteínico de referencia g/l
	A. Leche humana			micro-Kjeldahl
5.	1,47	11,82	0,124	10,36
	1,20	11,20	0,107	12,55
	1,10	10,54	0,104	10,90
	0,87	6,58	0,132	7,90
10.	0,75	7,83	0,096	7,95
	B. IgA secretoria purificada			Espectrofotometría
	10,89	10,59	1,03	12,00
				Lowry
15.	7,54	8,13	0,927	6,00
	3,90	3,80	1,026	3,00
	1,10	1,30	0,850	
				Análisis de aminoácidos
	0,350	0,440	0,795	0,449
20.				

25. La Tabla muestra una buena concordancia de las mediciones del total proteínico para leche humana y IgA secretoria purificada con las cifras obtenidas por medio de técnicas standard. La proporción de IgA secretoria frente al total proteínico está muy próxima a 1,0 para las muestras purificadas indicando el proceso básico del invento puede aplicarse a la determinación de IgA secretoria, de por sí, o como total proteínico.

Evaluación de estándares así como antisueros para la determinación de IgA secretoria en secreciones mamarias humanas.

5. Se prepara la placa y se lleva a cabo el proceso tal como se ha descrito en el ejemplo 12. Las muestras de prueba de antígeno tienen elevadas o bajas concentraciones de IgA secretoria, o sea son muestras de calostro humano tomadas en la proximidad del parto o muestras de leche humana tomadas más tarde durante la lactancia. Los estándares son HS St y un banco de leche humana (IH). Esta última se evalúa para el contenido de IgA en relación a IgA secretoria purificada. Además del antisuero (anti-IgA, Dako) utilizado en el ejemplo 12 se utiliza la fracción de inmunoglobulina de anti-IgA, cadena alfa específica, producida en conejos por los laboratorios Hyland.
- 10.
- 15.

En la Tabla 11A y B se exponen las concentraciones de IgA secretoria en varias muestras de secreción mamaria humana utilizando HS St o IH como estándar y los dos antisueros comerciales.

20.

25.

TABLA II

Dia de muestreo a partir del parto	Concentración de IgA secretoria g/l			Relación con leche humana como estandar (Dako/Hyland)	
	HS St como estandar (Dako)	Leche humana como standard (Dako)	Anti-IgA (Hyland)		
5.	A. Calostro humano				
	- 1	45,65	42,00	51,60	0,79
	0	43,36	50,24	61,12	0,82
10.	+ 1	26,48	27,43	25,01	1,10
	+ 2	15,15	15,04	15,97	0,94
	+ 1	12,22	10,80	13,20	0,82
	+ 1	12,00	11,98	12,95	0,93
	+ 2	11,90	12,75	12,26	1,04
15.	B. Leche humana				
	+ 3	6,37	6,98	5,48	1,27
	+ 3	2,46	2,50	3,02	0,83
	+ 3	1,72	1,64	1,58	1,04
	+ 3	1,60	1,42	1,29	1,10
20.					

25. La tabla muestra la consistencia en cantidad de IgA secretoria a concentraciones variables en secreciones mamarias obtenidas con IgA de suero (HS St) o IgA secretoria (IH) como estandar. Las concentraciones halladas con anti-IgA de diferentes firmas cuando se compararon dieron relaciones bastante próximas a 1,0. Así pues este proceso es apropiado para analizar la eficacia de distintos estandards y antisueros para la cuantificación de IgA secretoria humana en secreciones mamarias.

EJEMPLO 14

Caracterización de antisuero con respecto al contenido de anticuerpos específicos para distintos determinantes antigénicos sobre el componente secretorio (CS) hallado en las secreciones mamarias humanas.

5.

Se prepara la placa y se lleva a cabo el proceso tal como se ha expuesto en el ejemplo 13. Las muestras de prueba del antígeno son calostro y leche humana y el estándar es IH. El componente secretorio se encuentra en las secreciones humanas en forma libre y enlazado a la molécula

10.

de IgA dimérica y el complejo se conoce como IgA secretoria. Debido a que el calostro tiene una elevada concentración de IgA secretoria en comparación a la leche tiene también una elevada proporción de CS enlazado que comporta un determinante antigénico que no se encuentra en el CS libre.

15.

Se utilizan fracciones inmunoglobulínicas de dos antisueños distintos. Un (enlace anti-CS) se produce (Dakopatts) contra CS en calostro normal y la otra (libre de anti-CS) se produce contra calostro de una mujer con deficiencias en suero y IgA secretoria.

20.

La Tabla 12 comprende los resultados de análisis de las mismas diluciones de calostro y leche humana para CS con "enlace anti-CS" y "libre de anti-CS". Las concentraciones de IgA secretoria en las muestras se ofrecen con fines de referencia.

25.

TABLA 12

Dia de muestreo a partir del par- to	Concentración de IgA secretoria g/l		
	Anti-IgA diluí- da (1 + 2)	Libre de Anti-CS diluida (1 + 2)	Enlace anti- CS sin di- luir
5.	A. Calostro humano		
	- 1	42,00	21,96
	0	50,24	20,32
	+ 1	27,43	11,70
10.	+ 2	15,04	9,20
	+ 1	11,98	9,20
	+ 2	10,80	8,16
	B. Leche hu- mana		
15.	+ 3	6,98	5,49
	+ 3	2,50	3,04
	+ 3	1,64	1,50
	+ 3	1,42	1,77

20. En la Tabla puede apreciarse que son bajas las estimaciones de IgA secretoria en calostro utilizando IH como estandard con ambos antisueros. Cuando se utiliza "libre de anti-CS" no existen anticuerpos para el determinante de enlace formado por la ligación del CS a IgA. Con 25. el antisuero para enlazar CS los determinantes antigénicos se encuentran en exceso y se forma poco o ningún precipitado, o sea excesivamente bajo para la lectura. Por otra parte ambos antisueros contienen anticuerpos para los determinantes sobre el CS libre, que son también reactivos

- cuando el CS se enlaza a IgA, por lo que las estimaciones de IgA secretoria en la leche humana a través del CS libre o CS enlazado son perfectamente razonables. Así pues este proceso permite el análisis de antisueros "específicos" para su contenido de anticuerpos frente a distintos determinantes antigénicos sobre el mismo tipo de molécula, en este ejemplo CS enlazado y libre en secreciones mamarias humanas.

REIVINDICACIONES

10. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente sueca núm. 76 09263-4 de 20 de agosto de 1976.

1. Procedimiento para determinar un material inmunológicamente activo en un fluido, fisiológico, caracterizado porque comprende sobre una matriz de gel inerte en un soporte no reactivo, situar una parte alícuota de una muestra del fluido cubrir el área que comprende la muestra con una solución que contenga un material contra-reactivo, separar los materiales solubles sin reaccionar y observar los resultados de la reacción inmunológica.

2. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es un antígeno o un anticuerpo y el material contra-reactivo es un anticuerpo específico para este antígeno o anticuerpo.

3. Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque especialmente el material inmunológicamente activo es un anticuerpo y el ma-

terial contra-reactivo es un antígeno correspondiente.

4. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el soporte no reactivo es una placa.

5. 5. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los resultados de la reacción inmunológica se observan después de la coloración.

10. 6. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en su realización a) se forma una matriz de gel sobre una placa de un material no reactivo, b) se sitúa sobre este gel un pequeño volumen del fluido biológico que ha de analizarse y se deja que sea absorbido por el gel, c) se cubre el área de la muestra con una solución conteniendo una concentración apropiada de un material contrarreactivo para el componente que ha de determinarse en una cantidad superior a la del primer fluido aplicado de modo que durante un período de tiempo suficiente exista un exceso de material que posibilite la reacción de los componentes entre sí para formar un inmunoprecipitado insoluble, d) se lava por lo menos una vez la matriz de gel con una solución tampón y a continuación se comprime un papel de absorción contra la matriz de modo que se separen los componentes que no han tomado parte en la reacción y permanezcan todavía solubles, e) se prensa, después de enjuagado, el gel hasta obtener una capa delgada y con el último papel de absorción en posición se seca el gel, f) se separa el papel y se sumerge la placa en una solución

de tinción absorbible por el inmunoprecipitado y se decolora el gel de modo que el fondo de las áreas teñidas se vuelva claro, y g) se comparan las áreas teñidas con una escala de color conocida indicando la intensidad de color como una función de la cantidad del precipitado.

5. 7. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el soporte no reactivo es transparente.

10. 8. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el gel contiene un aditivo que disminuye la tensión superficial.

15. 9. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el gel contiene un cológeno y dos laterales enfrentados de la matriz de gel se conectan a un suministro de corriente alterna.

20. 10. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se sitúa un fluido muestra que contiene una serie de componentes distintos sobre la matriz de gel en cierta pauta y en varias áreas; se cubren ciertas partes de la pauta con soluciones que contiene los contrareactivos específicos deseados y luego se trata la matriz de gel según las etapas d-g de la reivindicación 6.

25. 11. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se producen finalmente gamas de una escala de color que cubre, por lo menos, tres matices distintos, so-

462029

bre la matriz de gel, siguiendo el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6 con soluciones que contienen cantidades conocidas de componentes y sus contrarreactivos.

5. 12. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4-11, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es inmunoglobulina antihumana A, G, ó M.

10. 13. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es proteína C-reactiva humana.

15. 14. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, en una forma particular de realización, se determina el por medio de una matriz de gel inerte sobre un soporte no reactivo, en la que se aplica una parte alícuota de la muestra del fluido sobre el gel, y se fija químicamente las proteínas, observando los resultados de la reacción.

20. 15. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque su realización se lleva a cabo en un sistema que comprende
- a) una matriz de gel inerte que contiene un electrolito sobre un soporte no reactivo;
 - b) medios para conectar dicha matriz con un suministro de corriente alterna, y
 - c) un suministro de corriente alterna.
- 25.

16. Procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque para su realización la placa se mantiene en una

posición nivelada horizontal y la matriz se conecta mediante puentes porosos a dos recipientes que contienen el electrolito y en contacto con el suministro de corriente alterna a través de electrodos sumergidos en los recipientes.

5.

17. Procedimiento para determinar un material inmunológicamente activo en un fluido fisiológico.

Según se describo y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 44 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

10.

Madrid, a 19 de Agosto de 1.977

p. a.

JAIME ISERN

p. p.

~~_____~~
Firmado por JOSÉ FICAZO

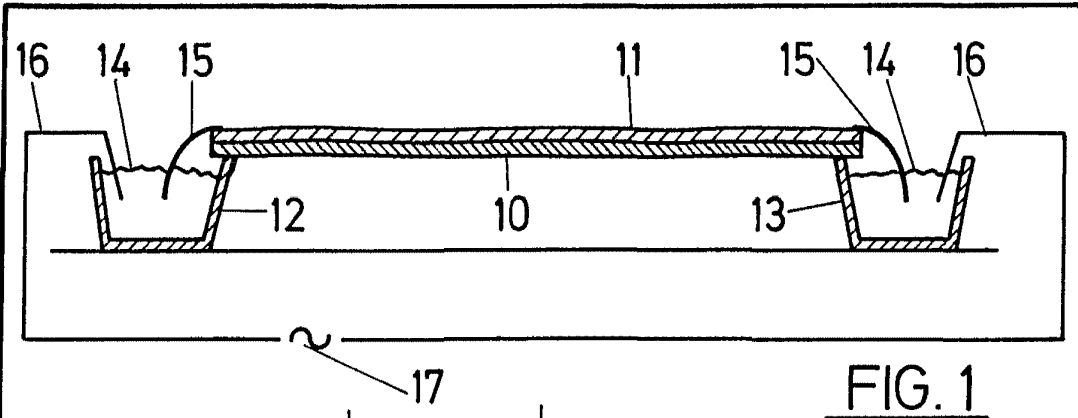


FIG. 1

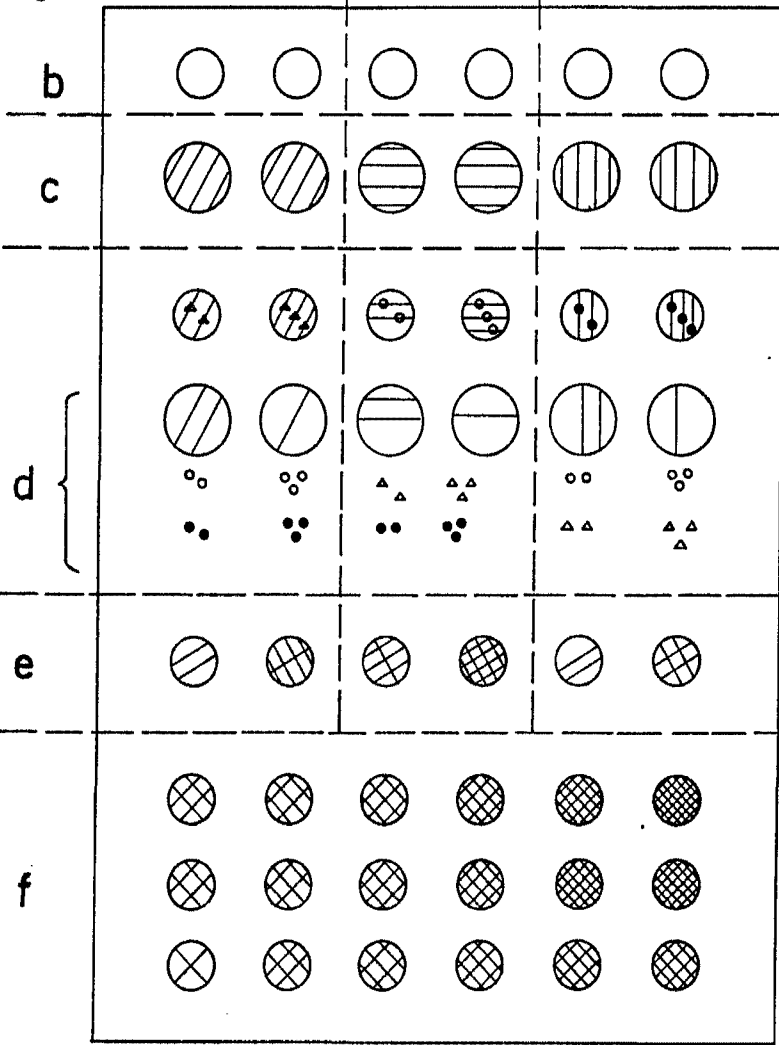
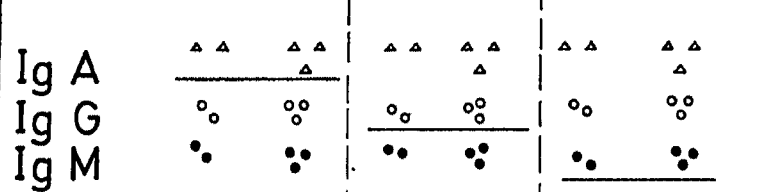


FIG. 2

Ig A
Ig G
Ig M

Madrid, a 19 AGO. 1977

P. a. *[Handwritten signature]*