

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO 469.586	(10) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 8-5-78	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el tenor de la Memoria adjunta.  
**PATENTE DE INVENCION**

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 794,772	(32) FECHA 9-5-77	(33) PAIS Estados Unidos.
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(64) TITULO DE LA INVENCION UN METODO Y SU CORRESPONDIENTE EQUIPO DE ENSAYO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE ANTICUERPOS PARA UNA BACTERIA GRAM-NEGATIVA.		
(71) SOLICITANTE (S) MERCK & CO., INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue- Rahway, New Jersey- ESTADOS UNIDOS.		
(72) INVENTOR (ES) William J. McAleer y Henry Z. Markus.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.		

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

10

Ensayos automatizados para evaluar la concentración de anticuerpos de una muestra por incubación de una muestra de ensayo, bacterias y un complemento y detección del crecimiento bacteriano en la mezcla incubada y para identificar las bacterias y su concentración en una muestra por incubación de una muestra de ensayo, antisuero bacteriano y un complemento y detección de la inhibición del crecimiento bacteriano en la mezcla incubada. Los ensayos automatizados se prestan a uso diagnóstico y pueden presentarse en forma de equipos de ensayo para diagnóstico.

15

20

25

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona un ensayo automatizado para determinar la concentración de anticuerpos de una muestra por incubación en una placa de microvaloración de una mezcla que contiene una muestra de ensayo, las bacterias cuyos anticuerpos están siendo evaluados en la muestra y un complemento y medida del crecimiento bacteriano en la mezcla incubada y un ensayo automatizado para determinar la identidad y la concentración inicial de bacterias en una muestra por incubación en una placa de microvaloración de una mezcla que contiene una muestra de ensayo, antisuero bacteriano, complemento y medio de crecimiento y medida de la inhibición del crecimiento bacteriano.

30

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona un método automatizado para la medida de la concentración de anticuerpos en una muestra biológica como, por ejemplo, suero, plasma, fracciones de la sangre, gamma-globulina y similares. La muestra se mezcla con complemento de conejo, preferiblemente complemen-

1 to de conejos de hasta unas cuatro semanas de edad y con  
las bacterias cuyo nivel de anticuerpos en la muestra se es-  
tá midiendo. Después de incubar la mezcla durante un breve  
5 periodo de tiempo, por ejemplo desde unos 30 a unos 50 minu-  
tos, se agrega caldo y la mezcla se incuba durante unas 15  
a 30 horas, preferiblemente durante unas 20 a 24 horas, a  
37°C aproximadamente.

10 Esta invención también proporciona un método automati-  
zado para determinar la identidad y la concentración inicial  
de bacterias en una muestra biológica como la mencionada an-  
teriormente. La muestra se mezcla con antisueros para las  
bacterias cuya identidad está siendo determinada, medio de  
crecimiento y complemento. Después de incubar la mezcla du-  
rante un corto periodo de tiempo, por ejemplo alrededor de  
15 30 a 50 minutos, se agrega caldo y la mezcla se incuba duran-  
te unas 15 a unas 30 horas, preferiblemente durante unas 20  
a unas 24 horas, a 37°C aproximadamente.

20 El método de análisis automatizado de esta invención  
es aplicable a las determinaciones de anticuerpos o bacte-  
rias para todas las bacterias Gram-negativas. Tiene especial  
utilidad en la determinación de anticuerpos de organismos  
patógenos como N. meningitidis, Salmonella, Neisseria  
gonorrhoea, Hemophilus influenza, E. coli y similares o de  
25 estos organismos patógenos propiamente dichos.

30 El análisis se realiza empleando placas de análisis  
normalizadas de 96 pocillos, un equipo de pipeteado automá-  
tico y un equipo de dilución automático. De esta forma, el  
análisis está automatizado, utiliza menores cantidades de  
ingredientes que los métodos convencionales y es más rápido

1 y más preciso. El coste del análisis es reducido considera-  
blemente en comparación con el método manual utilizado hasta  
ahora mientras que aumenta la precisión del análisis.

5 El método de esta invención puede ser llevado a cabo  
convenientemente en un equipo de ensayo de diagnóstico que  
incluye, para la determinación de bacterias, muestras liofi-  
lizadas de anticuerpos para las bacterias Gram-negativas  
como, por ejemplo, anticuerpos de E. coli, S. typhi, N. me-  
ningitidis cepas A y C, H. influenza y N. gonorrhoea. El com-  
10 plemento puede ser suministrado como parte del equipo o pue-  
de ser suministrado por el usuario del equipo. Este equipo  
se utiliza para determinar la identidad de cualquiera de  
las bacterias anteriores en muestras clínicas. Este ensayo  
tiene la ventaja de excluir los efectos no específicos.

15 El método de esta invención puede llevarse a cabo con-  
venientemente en un equipo de ensayo de diagnóstico que in-  
cluye, para la determinación de anticuerpos, muestras liofi-  
lizadas de bacterias Gram-negativas como, por ejemplo,  
E. coli, S. typhi, N. meningitidis cepas A y C, H. influenza  
20 y N. gonorrhoea. El complemento puede ser suministrado como  
parte del equipo o puede ser proporcionado por el usuario  
del equipo. Este ensayo también tiene la ventaja de excluir  
los efectos no específicos.

25 Los siguientes ejemplos ilustran esta invención sin  
limitarla a los mismos.

#### EJEMPLO 1

30 Unas muestras de suero congelado se descongelan rápi-  
damente en agua corriente fría. Los sueros se inactivan tér-  
micamente a 56°C durante 30 minutos y se mantienen en agua  
de hielo hasta que se sacan para su análisis. Se añaden con

1 puntas de pipeta estériles 25 microlitros de los sueros inac-  
tivados térmicamente sometidos a ensayo a cada uno de los  
12 pocillos de la hilera 1 de las placas MICROTITER<sup>(R)</sup>  
(Cooke Laboratory Products). Se trata de placas de poliesti-  
5 reno rígido, de un solo uso, estériles y con pocillos en for-  
ma de U. Se utilizan de 8 a 96 pocillos/muestra, de acuerdo  
con la precisión deseada. Cada placa se coloca en el pipe-  
teador automático (Cooke Laboratory Products) y se añaden a  
cada uno de los 96 pocillos 0,025 ml de solución salina equi-  
10 librada estéril (Grand Island Biological Co.) y 0,1 % de al-  
búmina de suero bovino. Después la placa se coloca en el di-  
luidor automático (Cooke Laboratory Products) que se acciona  
siguiendo las instrucciones del fabricante. Este diluidor  
realiza diluciones al doble si se están utilizando diluido-  
15 res de 0,025 ml. Utilizando una bandeja limpia de un solo  
uso, se agregan a cada pocillo 0,025 ml de un cultivo bac-  
teriano fresco de Neisseria meningitidis. Esta preparación  
debe contener alrededor de 1530 organismos viables frescos/  
0,025 ml. Cada placa se sacude durante 20-30 segundos des-  
20 pués de la adición de las bacterias. A continuación se agre-  
gan a cada pocillo, con un pipeteador automático, 0,025 ml  
de complemento de conejillo (PelFreeze). Las placas se sacu-  
den de nuevo durante 20-30 segundos y a continuación se in-  
cuban durante 40 minutos en un incubador saturado de agua a  
25 37°C. Transcurrido este periodo de incubación, se añaden  
0,125 ml del caldo Mueller Hinton (Difco) a cada pocillo con  
el pipeteador automático. Esta etapa debe realizarse con una  
nueva cabeza estéril y un nuevo depósito de plástico de un  
solo uso. Las placas se incuban durante la noche (20-24 ho-  
30 ras) en un incubador al 5 % de CO<sub>2</sub> humidificado, a 37°C. Los

1 pocillos que no presentan crecimiento bacteriano se clasifican como negativos. Los pocillos que presentan crecimiento bacteriano se clasifican como positivos. El uso de un espejo de lectura de ensayo (Cooke) facilita la lectura de la placa.

5 Con cada ensayo se incluyen los siguientes controles: número de bacterias en 0,025 ml de muestra; control de suero; control de complemento de conejillo; control de complemento de conejillo inactivado; control de organismo y suero de referencia.

Muestra	Valoración automatizada		Valoración manual en placa Petri	
	Pre	Post	Pre	Post
1	8	64	16	128
2	64	2048	64	1024
3	32	2048	32	512
4	2	256	2	256
5	128	4096	32	512
6	8	256	8	256
7	4	128	2	256
8	32	512	16	256

EJEMPLO 2

La siguiente tabla resume la variabilidad del análisis en función del número de análisis por muestra.

Número de muestras	Límites de confianza al 95% para el log potencia medio
1	± 0,692
2	± 0,489
3	± 0,399
4	± 0,346
5	± 0,309
6	± 0,282

	<u>Número de muestras</u>	<u>Límites de confianza al 95% para el log potencia medio</u>
1	7	+ 0,262
	8	+ 0,245
5	9	+ 0,231
	10	+ 0,219

EJEMPLO 3

Equipo de ensayo para anticuerpos

Una muestra de suero clínico que ha de ser analizada para determinar la presencia de anticuerpos de E. coli, S. typhi, N. meningitidis cepas A y C, H. influenza y N. gonorrhoea se inactiva térmicamente a 56°C durante 30 minutos. Se añaden 25 microlitros del suero inactivado que está siendo analizado con unas puntas de pipeta estériles a un pocillo sí y otro no de la hilera A de las placas MICROTITER<sup>(R)</sup> (Cooke Laboratory Products). El resto de los pocillos de la hilera A reciben 25 microlitros de solución salina equilibrada estéril (Grand Island Biologicals). Cada placa se coloca en el pipeteador automático y se añaden a cada uno de los 96 pocillos 25 microlitros de solución salina equilibrada estéril con 0,1 % de albúmina de suero bovino. Después la placa se coloca en el diluidor automático que se opera de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizan diluciones al doble. Se añaden 25 microlitros de un cultivo bacteriano liofilizado reconstituido de E. coli, con puntas de pipeta estériles, a todos los pocillos de las hileras 1 y 2. La hilera 1 contiene el suero y la hilera 2 es un control de crecimiento bacteriano. Las hileras 3 y 4 reciben S. typhi y las hileras 5 y 6 reciben N. meningitidis A. Las preparaciones bacterianas contienen entre 15 y 30 orga-

1 nismos viables frescos/25 microlitros. Se suministran en es-  
tado liofilizado como parte del equipo de ensayo y, después  
de la reconstitución, contienen la cantidad requerida de bac-  
terias. A continuación se agregan a cada pocillo, con un pi-  
5 peteador automático, 25 microlitros de complemento de cone-  
jillo. Después las placas se sacuden durante 20-30 segundos  
y se incuban durante 40 minutos en un incubador saturado de  
agua a 37°C. Después se agregan 125 microlitros de caldo  
Mueller-Hinton a cada pocillo, con el pipeteador automático.  
10 Esta etapa debe realizarse con una nueva cabeza estéril y  
un nuevo depósito de plástico de un solo uso. Las placas se  
incuban durante la noche (20-24 horas en un incubador al 5 %  
de CO<sub>2</sub> humidificado, a 37°C). Si una muestra de suero inhibe  
el crecimiento bacteriano, se determinan la identidad y la  
15 concentración.

#### EJEMPLO 4

##### Equipo de ensayo para bacteria

20 Empleando puntos de pipeta estériles se agregan a cada  
pocillo de la hilera A de placas MICROTITER<sup>(R)</sup> 25 microlit-  
tros de una muestra de suero clínico en la que ha de determi-  
narse la presencia de las siguientes bacterias: E. coli,  
S. typhi, N. meningitidis A y C, H. influenza y N. gonorrhoea.  
Después se añaden a un pocillo sí y otro no de la hilera A  
25 25 microlitros de los antisueros de referencia para las bac-  
terias analizadas. El pocillo A-2 recibe el antisuero del  
E. coli, el pocillo A-4 el del S. typhi, etc. Estos antisue-  
ros forman parte del equipo y son suministrados en estado  
liofilizado.

30 Cada una de las placas se coloca en el pipeteador au-  
tomático y recibe 25 microlitros/pocillo de solución salina

1 equilibrada estéril con 0,1% de albúmina de suero bovino.  
Después la placa se coloca en el diluidor automático y se  
realizan diluciones al doble. A continuación se agregan a  
cada pocillo, con un pipeteador automático, 25 microlitros  
5 de complemento de conejillo, Después las placas se sacuden  
durante 20-30 segundos y se incuban durante 40 minutos en un  
incubador saturado de agua a 37°C. Después se añaden a cada  
pocillo, con el pipeteador automático, 125 microlitros de  
caldo de Mueller-Hinton. Las placas se incuban durante la  
10 noche (20-24 horas en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub> humidifica-  
do, a 37°C). Si las muestras de suero de referencia inhiben  
el crecimiento bacteriano, esto sirve para establecer la  
identidad y la concentración inicial de las bacterias en el  
suero ensayado.

15 En resumen, la Patente de Invención que se solicita  
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES:

1.- Un método y su correspondiente equipo de ensayo  
para determinar el nivel de anticuerpos para una bacteria  
20 Gram-negativa, así como la identidad de dicha bacteria  
Gram-negativa en una muestra, cuyo método comprende reali-  
zar una primera incubación en los pocillos de una placa de  
ensayo de múltiples pocillos, conteniendo dichos pocillos  
una solución de muestra de ensayo diluída en serie, un  
25 complemento adecuado y bacterias complementarias al anticuer-  
po para así determinar el nivel de anticuerpos, o una solu-  
ción de muestra de ensayo diluída en serie, un complemento  
adecuado y anticuerpos complementarios a la bacteria para  
así determinar la identidad de la bacteria Gram-negativa;  
30 llevar a cabo una segunda incubación en los pocillos de una

1 placa de ensayo de múltiples pocillos que contenga un me-  
dio de crecimiento además de los ingredientes citados ante-  
riormente, siendo continuada la segunda incubación durante  
5 el tiempo efectivo necesario para permitir que ocurra el  
crecimiento bacteriano, y medir y puntuar cada pocillo según  
haya o no crecimiento bacteriano.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en  
el que la incubación incluye un primer período de incuba-  
ción a aproximadamente 37°C en una atmósfera saturada de  
10 agua, durante aproximadamente 30 a 50 minutos, y un segun-  
do período de incubación a unos 37°C en un incubador humi-  
dificado al 5% de dióxido de carbono, durante aproximadamen-  
te 15 a 30 horas.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en  
15 el que el medio de crecimiento es añadido a los pocillos de  
la placa de ensayo entre los períodos de incubación primero  
y segundo.

4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en  
que para determinar el nivel de anticuerpos, el anticuerpo  
20 es seleccionado entre aquellos complementarios a un grupo  
predeterminado de bacterias, y en el que las bacterias que  
corresponden a cada uno de los grupos predeterminados están  
presentes en al menos algunos de los pocillos.

5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en  
que para determinar la identidad de una bacteria Gram-nega-  
25 tiva, la bacteria está seleccionada entre un grupo predeter-  
minado de bacterias, y en el que el anticuerpo complemen-  
tario a cada uno de los grupos predeterminados de bacterias  
está presente en al menos algunos de los pocillos.

30 6.- Un equipo de ensayo de acuerdo con la reivindica-

1

ción 1, que comprende una bacteria Gram-negativa liofilizada complementaria, al anticuerpo cuyo nivel está siendo determinado, así como un complemento y un medio de crecimiento adaptados para permitir el crecimiento de la bacteria Gram-negativa liofilizada en una placa de ensayo que posea una pluralidad de pocillos.

5

7.- Un equipo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la bacteria Gram-negativa liofilizada está seleccionada entre E.coli, S. typhi, N. meningitidis, H. influenza o N. gonorrhoeae.

10

8.- Un equipo de ensayo de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, que comprende un anticuerpo complementario a la bacteria a identificar, un complemento adecuado y medios de crecimiento adaptados para permitir el crecimiento bacteriológico en una placa de ensayo que posea una pluralidad de pocillos.

15

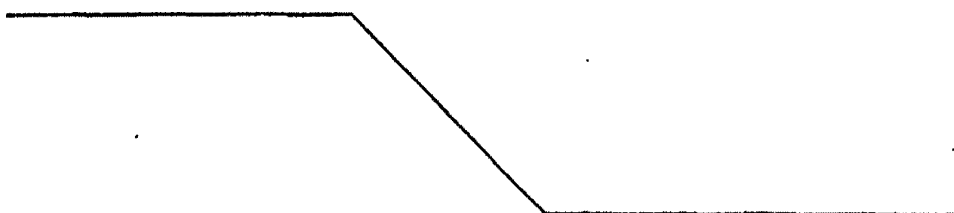
9.- Un equipo de ensayo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo liofilizado está seleccionado de entre los anticuerpos E. coli, S. typhi, N. meningitidis, H. influenza o N. gonorrhoea.

20

10.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN METODO Y SU CORRESPONDIENTE EQUIPO DE ENSAYO PARA DETERMINAR EL NIVEL DE ANTICUERPOS PARA UNA BACTERIA GRAM-NEGATIVA.

25


30



1            Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de doce páginas mecanografiadas.

Madrid, 8 mayo 1.978

BERNARDO UNGRIA

p.p.  


5

10

15

20

25

30