



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 199 058**

⑫ Número de solicitud: 200201298

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/569
G01N 33/544

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **06.06.2002**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2004**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.02.2004

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido s/n
28071 Málaga, ES

⑦② Inventor/es: **Molina Bolivar, José Antonio;**
Peula García, José Manuel y
Mendoza Montero, Joaquín

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae*.**

⑤⑦ Resumen:

Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae*. Se describe un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas, mediante la aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*. Asimismo se describe el método de obtención de las partículas de látex sensibilizadas y el tampón de reacción donde se desarrolla la inmunorreacción. El desarrollo del inmunodiagnóstico tiene lugar en los pocillos de una placa de microtitulación mezclando las partículas sensibilizadas con muestras de sueros humanos en un tampón de reacción específico. La presencia en el suero de anticuerpos frente *Mycoplasma pneumoniae* se detecta mediante la aglutinación de las partículas de látex sensibilizadas. La ausencia de anticuerpos específicos se detecta mediante la sedimentación de éstas partículas. Este test de inmunodiagnóstico es económico, técnicamente simple, tiene una elevada estabilidad temporal y presenta unos niveles de sensibilidad y especificidad adecuados.

Lectura	Interpretación
	Negativo
	No concluyente
	Positivo

Figura 1

ES 2 199 058 A1

DESCRIPCION

Reactivo de látex para la detección de anticuerpos frente a micoplasma pneumoniae.

Objeto de la invención

Obtención de un reactivo de aglutinación-sedimentación de partículas de látex para la detección y titulación de sueros que contienen anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae*. El reactivo comprende partículas de poliestireno coloreadas y sensibilizadas con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*, capaces de aglutinar de forma específica en presencia de anticuerpos humanos frente a *Mycoplasma pneumoniae*, y un medio de reacción que favorece el proceso de aglutinación-sedimentación de las partículas sensibilizadas. El reactivo permite indicar la positividad o negatividad de un suero así como su titulación.

Sector de la técnica

La invención consistente en un test de aglutinación-sedimentación de partículas de látex coloreadas es un método muy útil para detectar la presencia de inmunoquímicos como los anticuerpos en una muestra biológica. Se enmarca dentro del área de la biotecnología, y presenta aplicación directa en el inmuno-diagnóstico serológico.

Antecedentes

La interacción antígeno-anticuerpo es la base de todos los métodos inmunológicos. Proteínas especiales llamadas anticuerpos son producidas por los mamíferos como respuesta a la presencia de un cuerpo extraño conocido como antígeno. Esta respuesta normal del cuerpo ante un agente patógeno ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas que se usan para diagnosticar enfermedades. En algunos de estos tests la presencia del antígeno sospechado se pone de manifiesto añadiendo a la muestra biológica el anticuerpo complementario. Si el antígeno está presente las reacciones antígeno-anticuerpo que se producen originan un precipitado que generalmente es muy difícil de detectar visualmente debido a su pequeño tamaño. Por esta razón los antígenos o anticuerpos se unen a partículas de látex de forma que los precipitados o agregados formados por las reacciones antígeno-anticuerpo entre distintas partículas de látex sean grandes y se detecten visualmente con facilidad.

La aglutinación de partículas de látex sensibilizadas constituye uno de los métodos de inmuno-diagnóstico más simples y rápidos. En un inmunoensayo de este tipo, las partículas de látex en cuya superficie se ha adsorbido un anticuerpo (o antígeno) se mezclan con la muestra a analizar y que contiene el antígeno específico correspondiente (o anticuerpo). La existencia de reacciones antígeno-anticuerpo cruzadas entre partículas de látex conduce a la aglutinación del coloide que se puede observar visualmente por el operador.

Los primeros inmunoensayos fueron realizados por Singer y Plotz¹ al detectar el factor reumatoide en el suero humano mediante partículas poliméricas recubiertas de inmuno-gammaglobulina G (IgG).

En la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada en química clínica habiéndose aplicado para la detección de más de 80 enfermedades infecciones, incluyendo el SIDA. De igual forma, existen reactivos comerciales repartidos en disciplinas como son alergias, test de embarazo, detección de cáncer, marcadores tumorales o hepáticos, pruebas tiroideas, identificación y cuantificación de numerosas sustancias como las hormonas, etc.²

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno respiratorio frecuente cuya infección está asociada a numerosas enfermedades humanas tanto respiratorias (es el responsable del 20 % de las neumonías) como no respiratorias (infecciones neurológicas)³. Su diagnóstico anticipado es importante ya que la infección suele combatirse bien mediante el uso de los antibióticos apropiados. La infección es endémica pero cada determinados años suele aparecer alguna epidemia⁴. La infección suele proliferar fácilmente en instituciones, donde la gente suele estar en contacto. Los grupos de personas con mayor riesgo de contraer la infección suelen ser niños con edad inferior a tres años y adultos con edad superior a los 40 años⁵.

El cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*, aunque es un indicador sensible de la infección, es lento y difícil por lo que su diagnóstico está basado en métodos serológicos. Numerosos laboratorios utilizan como técnica serológica de referencia para su diagnóstico la fijación de complemento, un método caracterizado por sus importantes limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad⁶⁻⁸. Así pues en la actualidad es necesario proponer otros métodos serológicos que permitan detectar la enfermedad en sus estados iniciales. De entre estos Métodos podemos encontrar la inmunofluorescencia y las técnicas

enzimáticas (EIA, ELISA), procedimientos que, aunque sensibles y específicos⁹⁻¹⁰, requieren de personal altamente especializado y equipos costosos. Por estos motivos solamente laboratorios grandes pueden realizar estos ensayos, no estando con frecuencia los resultados disponibles hasta transcurridos algunos días.

Otro método bastante más barato, rutinario y que no necesita tecnología especializada, consiste en un test de aglutinación de látex en tarjeta. Es un procedimiento muy simple pero se ve reducida la sensibilidad y es difícil realizar una cuantificación de anticuerpos o titulación del suero¹¹⁻¹³. Además se suele recomendar una confirmación de los resultados por otras técnicas como fijación de complemento o ELISA. Si se pretende realizar una cuantificación o titulación del suero se pueden utilizar las técnicas de microaglutinación de partículas¹³⁻¹⁶. Estos procedimientos son también sencillos de realizar y proporcionan una sensibilidad y especificidad adecuadas. El proceso de aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*, se puede incluir dentro de este tipo de técnicas.

Referencias

1. Singer y C.M. Plotz. (1956). *Amer. J. Med.*, 21, 888.
2. L. Borque. (1992). *Boletín Bibliográfico Behring*. 6, 13.
3. Ali, M. Sillis, B.E. Andrews, P.F. Jenkins y B.D.W. Harrison. (1986) *Q.J Med.* 227, 241.
4. Foy, H.M. Kenny, G.E. Cooney, M.K. y Allan, LD. (1979). *J. Infect. Dis.* 139, 681.
5. Lind, K. Bentzon y M. W. (1991). *Epidemol. Infect.* 107,189.
6. Kleemola, M. y Käyhty, H.(1982). *J. Infect. Dis.* 146, 284.
7. Leinikki, P. Pantzar, P. y Tykkä, H. (1973). *Scan J. Gastroenterol.* 8, 631.
8. Ponkä, A. Pönkä, T. Sarna, S. y Penttinen, K. (1981). *J. Infect.* 3, 332.
9. S.A. Uldum, J.S. Jensen, J. S.-Andersen, K. Lind, (1992), *J. Clin. Microbiol.* 30, 1198.
10. S. H. Lee, S. Charoenying, T. Brennan, M. Markowski, D.R. Mayo, (1989), *Am. J. Clin. Pathol.* 92, 342.
11. M. Karppelin, K. Hakkarainen, M. Kleemola, A. Miettinen, (1993), *J. Clin. Pathol.* 46, 1120.
12. W. Rastawicki, M. Jagielski, S. Kaluzewski, (2000) *Med. Dosw. Mikrobiol.* 52, 151.
13. G. Aubert, B. Pozzetto, O.G. Gaudin, J. Hafid, A.D. Mbida, A. Ros, (1992), *Ann. Biol. Clin.* 50, 593.
14. C.E. Barker, M. Sillis, T.G. Wreghitt, (1990), *J. Clin Pathol.* 7, 163.
15. D. S. Leland, K.A. Barth, E.B. Cunningham, (1993), *J. Clin. Microbiol.* 1, 1013.
16. W. L Thacker, D.F. Talkington, (1995), *J. Clin. Microbiol.* 33, 1212.

Explicación de la invención

La presente invención consiste en un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos de *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas humanas, mediante la aglutinación-sedimentación de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*. El test presenta dos componentes:

A) Partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* y bloqueadas con albúmina de suero bovino.

B) Una solución (Tampón de reacción) que constituye el medio de la reacción inmunológica.

El proceso para producir el componente A consta de los siguientes pasos:

- obtención del antígeno de naturaleza lipídica de *Mycoplasma pneumoniae*, a partir de un extracto
5 crudo de estos microorganismos,
- recubrimiento de partículas comerciales de látex de tamaño entre 0,8-1,6 μm con el antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* mediante un proceso de adsorción física,
- 10 - una vez sensibilizadas con el antígeno, las partículas se someten a una etapa de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA), proteína que también resulta adsorbida en la superficie polimérica de las partículas de látex.

El componente B es una solución de Glicina con NaCl (u otra sal de cationes monovalentes), Polietil-
15 len glicol (PEG 8000), BSA y NaN_3 . Es un medio de reacción que favorece el proceso de aglutinación-sedimentación de las partículas sensibilizadas

Una vez disponibles los componentes A y B el procedimiento para la detección de los anticuerpos es-
pecíficos consiste en una inmunoreacción, que se desarrolla en los pocillos de una placa de microtitulación
20 mediante dilución del suero en el tampón que constituye el componente B hasta alcanzar una determi-
nada titulación del suero y posterior adición de las partículas de látex sensibilizadas, componente A. La
presencia en el suero de anticuerpos frente *Mycoplasma pneumoniae* se detecta mediante la aglutinación
de las partículas de látex sensibilizadas. La ausencia de anticuerpos específicos se detecta mediante la
sedimentación de éstas partículas.

25 Explicación de las figuras

Fig. 1. Imagen de los pocillos de la placa de microtitulación tras la inmunoreacción.

30 Resultado positivo: Las partículas de látex aglutinan y una fina capa de partículas recubre la totalidad
del fondo de los pocillos.

Resultado negativo: Las partículas permanecen en suspensión y sedimentan de forma discreta apare-
ciendo un botón en el centro del fondo del pocillo.

35 Fig. 2. Imagen de la titulación de un suero en la microplaca con pocillos.

Descripción detallada de la invención

40 El test de inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae* en
sueros sanguíneos humanos empleando la técnica de aglutinación-sedimentación de látex, objeto de la
presente invención presenta dos componentes:

45 A) Partículas de látex sensibilizadas con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* y bloqueadas con
albúmina de suero bovino.

B) Una solución (Tampón de reacción) que constituye el medio de la reacción inmunológica.

50 El primer paso para producir el componente A consiste en la obtención del antígeno de naturaleza
lipídica de *Mycoplasma pneumoniae*, para lo que se procede como se indica a continuación:

140 volúmenes de extracto crudo de *Mycoplasma pneumoniae* se llevan a un volumen mediante centri-
fugación y redispersión. A un volumen de estos microorganismos se le adiciona 10 volúmenes de metanol,
20 volúmenes de cloroformo y 7,5 volúmenes de una solución 0,1 M de cloruro potásico. Seguidamente se
55 realizan tres ciclos de sonicación y enfriamiento. El antígeno lipídico se encuentra en la fase del cloroformo
por lo que la misma es extraída para posteriormente realizar una evaporación en corriente de nitrógeno.
El sedimento sólido es resuspendido en 10 volúmenes de etanol, agitando hasta la completa redispersión
del mismo.

60 Las partículas comerciales de látex coloreadas que se utilizan presentan un diámetro homogéneo al-
rededor de 1,5 μm , aunque pueden usarse sistemas con tamaño entre 0,8-1,6 μm . Estas partículas se
recubren con antígeno lipídico de *Mycoplasma Pneumoniae* mediante un proceso de adsorción física. Una

vez sensibilizadas con el antígeno, las partículas se someten a una etapa de bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA), proteína que también resulta adsorbida en la superficie polimérica de las partículas de látex. El procedimiento de obtención de las partículas sensibilizadas, componente A, se desarrolla según las siguientes etapas:

5

1) Un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex se lava con 20 volúmenes de tampón fosfato salino (PBS) y se resuspende en este tampón a un 5 % de contenido sólido.

10

2) La suspensión de látex se mezcla con la suspensión de antígeno lipídico a razón de tres volúmenes de látex al 5 % con 1 volumen de antígeno y todo ello con 36 volúmenes de PBS. El proceso de adsorción transcurre con agitación por un periodo entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente.

15

3) Finalizada la adsorción, las partículas de látex sensibilizadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de tampón fosfato (PB).

4) Finalmente las partículas son redispersadas en 30 volúmenes de una solución 3 mM de ácido acético a pH 5 que contiene un 0.05 % de BSA. Esta etapa debe extenderse por un periodo de tiempo que oscile entre 5 y 12 horas.

20

5) Finalmente las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de tampón glicina (GB) a pH 8 y se resuspenden al 0.065 % en GB, pH 8 y 0.2 mg/ml de NaN_3 .

25

El componente B es una solución 0.1 M de Glicina a pH 8 que tenga una concentración de NaCl (u otra sal de cationes monovalentes) entre 300 y 450 mM, entre 1 y 1,5 % de Polietilen glicol (PEG 8000), entre 0,7 y 1 % de BSA, y 0,2 mg/ml de NaN_3 . Mediante el uso de este medio se favorece el acercamiento entre partículas y la interacción inmunológica entre el antígeno inmovilizado en la superficie de éstas y los correspondientes anticuerpos específicos que pudieran estar presentes en el suero humano que se estudia. Además, se minimiza a aparición de interacciones inespecíficas y se consigue una adecuada sedimentación de aquellas partículas sensibilizadas que no aglutinan debido a la ausencia de anticuerpos específicos en los sueros testados.

30

Una vez disponibles los componentes A y B el procedimiento para la detección de anticuerpos específicos puede ser el siguiente:

35

La inmunoreacción se desarrolla en una microplaca con pocillos en U o V. 5 μl de suero son diluidos en 195 μl del tampón que constituye el componente B. De esta solución se realizan diluciones dobles en serie hasta alcanzar una determinada titulación del suero, por ejemplo desde 1/80 hasta 1/10250. Se introducen en los pocillos de la placa 30 μl de cada una de estas diluciones. Después de añadir 30 μl de la solución de partículas sensibilizadas, componente A, se mezcla mediante agitación a 300 r.p.m. durante 2 minutos. La lectura del resultado se puede realizar transcurridas 12 horas. Si el suero contenía anticuerpos específicos de *Mycoplasma Pneumoniae*, las partículas de látex aglutinan y una fina capa de partículas recubre la totalidad del fondo de los pocillos, véase la figura 1. Sin embargo, si en el suero hay ausencia de estos anticuerpos específicos, las partículas permanecen en suspensión y sedimentan de forma discreta apareciendo un botón en el centro del fondo del pocillo, véase figura 1. La titulación de un suero se puede observar en la figura 2. Los sueros con títulos mayores o iguales a 1/160 son considerados positivos.

45

50

A continuación, con el fin de demostrar la utilidad del reactivo objeto de esta patente se va a presentar un estudio en el que un conjunto de sueros, tanto positivos como negativos frente a anticuerpos de *Mycoplasma pneumoniae*, han sido evaluados con el reactivo de aglutinación-sedimentación de látex. Los resultados obtenidos han sido comparados con los obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. De esta forma se han podido calcular parámetros que caracterizan el comportamiento inmunológico de este reactivo de látex, tales como la sensibilidad, especificidad y eficiencia.

55

Con el fin de determinar la especificidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex se utilizó un panel de 350 sueros procedentes de donantes de sangre. Todos ellos fueron evaluados como negativos frente a anticuerpos de *Mycoplasma pneumoniae* mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Cinco de estos sueros dieron un título de 1/160 mediante aglutinación de látex mientras que el resto dieron negativos. Así pues, si se considera como verdaderos los resultados de IFI, la especificidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma pneumoniae* es del 98 %.

60

Para determinar la sensibilidad del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex se empleó una colección de 36 sueros provenientes de enfermos hospitalizados en diferentes centros. Los resultados obtenidos utilizando aglutinación de látex e IFI se muestra en la tabla 1. Cuatro muestras positivas por IFI-IgG fueron negativas por aglutinación de látex. Por tanto, asumiendo como verdaderos los resultados de IFI, técnica que se considera de referencia para los test serológicos, la sensibilidad del reactivo de aglutinación-sedimentación por látex es del 89 %.

La eficiencia es un valor combinado de especificidad y sensibilidad que indica el porcentaje de pacientes correctamente clasificados. Asumiendo como verdaderos los resultados de IFI, la eficiencia del reactivo de aglutinación-sedimentación de látex es del 97 %.

El estudio que se muestra en la tabla 1 confirma que el reactivo de látex es capaz de detectar anticuerpos frente *Mycoplasma pneumoniae* de tipo IgG e IgM, aunque la sensibilidad del reactivo aumenta si se consideran los resultados de IFI-IgM lo que implica una detección preferente de IgM. La presencia en un suero de este tipo de anticuerpo es indicativa de una infección reciente, por lo que su detección es necesaria para asegurar el uso de una terapia antibiótica adecuada. Además, el test de aglutinación de látex presenta otra serie de ventajas frente a otros métodos convencionales. Es un test muy simple desde un punto de vista técnico que puede desarrollarse sin la necesidad de equipos de laboratorio complejos. Por otro lado, el test de aglutinación-sedimentación de látex ofrece reactivos muy económicos y con una elevada estabilidad que les permite mantener su inmunoreactividad después de 12 meses de almacenamiento a 4°C.

ES 2 199 058 A1

TABLA 1

Resultados de test serológicos para detección de anticuerpos M. pneumoniae.

5

	Nº Suero	Título	Título	Resultado
10		Aglutinación Látex	IFA-IgG	IFA-IgM (1/12)
	1	>10240	512	+
	2	>10240	64	-
15	3	>10240	512	+/-
	4	>10240	128	+/-
	5	>10240	64	+
	6	>10240	512	+/-
20	7	>10240	64	+/-
	8	>10240	512	+
	9	5120	128	+/-
	10	5120	64	+
25	11	5120	512	+/-
	12	2560	128	+
	13	2560	128	-
30	14	1280	128	+/-
	15	1280	128	+/-
	16	1280	128	+
	17	1280	128	+
35	18	640	64	+/-
	19	640	128	+
	20	640	64	+
	21	640	64	+
40	22	640	64	+/-
	23	320	128	+/-
	24	320	64	+
45	25	320	64	+/-
	26	160	64	-
	27	160	128	+
	28	160	64	-
50	29	160	128	+/-
	30	160	128	+/-
	31	160	64	+/-
	32	160	32	+/-
55	33	<160	64	+
	34	<160	128	-
	35	<160	512	-
60	36	<160	64	-

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*, **caracterizado** porque esencialmente comprende la utilización de partículas de látex esféricas y monodispersas con un diámetro entre 0,8 y 1,6 μm , preferiblemente de 1,5 μm , y de un antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* de naturaleza lipídica.

2. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 1, **caracterizado** porque esencialmente comprende los siguientes pasos:

i) sensibilización de las partículas de látex con el antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*, previamente obtenido de un extracto crudo de estos microorganismos, mediante el recubrimiento de las partículas con el antígeno de naturaleza lipídica de *Mycoplasma pneumoniae* por un proceso de adsorción física,

ii) bloqueo de las partículas de látex, ya sensibilizadas, con albúmina de suero bovina (BSA) por un proceso de adsorción física en la superficie polimérica de las partículas de látex.

3. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 2, **caracterizado** porque la sensibilización de las partículas de látex con el antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* consta esencialmente de los siguientes pasos:

a) un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex se lava con tampón PBS y se resuspende en el mismo,

b) la suspensión de látex se mezcla con la suspensión de antígeno lipídico y con tampón PBS, transcurriendo el proceso de adsorción con agitación a temperatura ambiente,

c) finalizada la adsorción, las partículas de látex sensibilizadas se lavan con PB.

4. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso a) se realiza un lavado de un volumen determinado de suspensión comercial de las partículas de látex con 20 volúmenes de PBS y la resuspensión en este tampón se hace a una concentración del 5 % de contenido sólido.

5. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso b) la suspensión de látex se mezcla con la suspensión de antígeno lipídico a razón de tres volúmenes de látex al 5 % con 1 volumen de antígeno y todo ello con 36 volúmenes de PBS, transcurriendo el proceso de adsorción con agitación por un periodo entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente.

6. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 3, **caracterizado** porque en el paso c) las partículas de látex sensibilizadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de PB.

7. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 2, **caracterizado** porque el bloqueo de las partículas de látex, ya sensibilizadas, con albúmina de suero bovina (BSA) consta esencialmente de los siguientes pasos:

a) las partículas son redispersadas en una solución de ácido acético que contiene BSA,

b) las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan con GB y se resuspenden en GB y NaN_3 .

8. Procedimiento de obtención de partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* según reivindicación 7, **caracterizado** porque en el paso b) las partículas sensibilizadas y bloqueadas se lavan dos veces con 20 volúmenes de GB a pH 8 y se resuspenden al 0.065 % en

GB, pH 8 y 0.2 mg/ml de NaN_3 .

9. Uso de las partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la puesta en práctica de un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas.

10. Tampón de reacción **caracterizado** porque es una solución de los siguientes componentes: Glicina, NaCl u otra sal de cationes monovalentes, Polietilen glicol (PEG 8000), Albúmina de suero bovino (BSA) y NaN_3 .

11. Tampón de reacción según reivindicación 10, **caracterizado** porque dicha solución contiene sus componentes en las siguientes concentraciones: 0,1 M de Glicina, entre 300 y 450 mM (preferiblemente 350 mM) de NaCl, entre 1 y 1,5 % (preferiblemente 1 %) de PEG 8000, entre 0,7 y 1 % (preferiblemente 1 %) de BSA, y 0,2 mg/ml NaN_3 .

12. Tampón de reacción según reivindicaciones 10 ó 11, **caracterizado** porque tiene un pH de 8.

13. Uso del tampón de reacción de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para la puesta en práctica de un procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas.

14. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas, **caracterizado** porque esencialmente comprende el uso de las partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae* mediante el procedimiento de reivindicaciones 1 a 8 y/o del tampón de reacción de reivindicaciones 10 a 12.

15. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas según reivindicación 14, **caracterizado** porque se desarrolla mezclando la muestra de suero diluida en el tampón de reacción con las partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*.

16. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas según reivindicaciones 14 o 15, **caracterizado** porque la titulación del suero se realiza mezclando la muestra de suero diluida en el tampón de reacción con las partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*, en pocillos de una placa de microtitulación.

17. Procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque consiste en un proceso de aglutinación-sedimentación de las partículas de látex sensibilizadas con un antígeno lipídico de *Mycoplasma pneumoniae*, en el que se produce la aglutinación específica de las partículas de látex sensibilizadas en presencia de anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* en el suero y la sedimentación de estas partículas de látex sensibilizadas en ausencia de dichos anticuerpos específicos en el suero.

18. Uso del procedimiento (test de inmunodiagnóstico) para detectar y cuantificar anticuerpos específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* presentes en muestras serológicas, de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, para la puesta en práctica de un método de diagnóstico de enfermedades producidas por *Mycoplasma pneumoniae*.

Lectura	Interpretación
	Negativo
	No concluyente
	Positivo

Figura 1

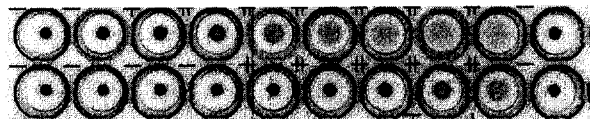


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 199 058
⑫ N.º solicitud: 200201298
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2002
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: G01N 33/569, 33/544

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	JP 60-209179 A (TOMIYAMA TETSUO & SEINAN SOGO KAIMATSU KK) 21.10.1985 (resumen) [en línea] [recuperado el 22.12.2003] Recuperado de: EPO PAJ Database.	1-6,9, 14-18
Y A	US 4321058 A (TOMIYAMA, T. & OGUDA, T.) 23.03.1982, columna 4, líneas 17-19; columna 5; ejemplos 1,3.	1-6,9,10, 12-18 7,8,11
Y A	WO 9214154 A1 (DYNAGEN, INC) 20.08.1992, páginas 8-11,18-20; ejemplo 3.	10,12,13 11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
23.12.2003

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/1