



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 131 032**

②① Número de solicitud: 009702551

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 33/569

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **09.12.1997**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.1999**

Fecha de concesión: **18.12.1999**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2000**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.02.2000

⑦③ Titular/es: **Almudena Rojas González**
Polg. Ind. Dos de Octubre
18320 Santafé, Granada, ES
Joaquín Mendoza Montero

⑦② Inventor/es: **Rojas González, Almudena y**
Mendoza Montero, Joaquín

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

⑤④ Título: **Test de laboratorio para medir anticuerpos incompletos en brucelosis y equipo para realizarlo.**

⑤⑦ Resumen:

Test de laboratorio para medir anticuerpos incompletos en brucelosis y equipo para realizarlo.

La prueba o test de laboratorio se caracteriza porque en una serie de pocillos tipo ELISA se adiciona un tampón de pH5, adicionando después cada uno de los sueros en el primer pocillo, procediendo después a una doble dilución pasando líquido de cada pocillo al siguiente, y añadiendo finalmente en cada pocillo una cierta cantidad de la suspensión bacteriana estabilizada. Se procede después a una incubación en estufa durante 24 horas a 37°C, en cámara húmeda en la oscuridad. Posteriormente se puede leer el resultado con ayuda de un lector de placas de aglutinación. Se describe también el equipo necesario para realizar el test.

El test de la invención se usa para medir anticuerpos incompletos en casos de brucelosis, pudiéndose aplicar tanto a humanos como a animales.

ES 2 131 032 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Test de laboratorio para medir, anticuerpos incompletos brucelosis y equipo para realizarlo.

5 El test de laboratorio de la presente invención (Brucellacapt) se usa para medir anticuerpos incompletos en casos de brucelosis, pudiéndose aplicar tanto a humanos como a animales.

10 La brucelosis o Fiebre de Malta es una enfermedad grave provocada por la infección por *Brucella abortus* o *Brucella melitensis* que es endémica de los países de la cuenca del Mediterráneo, afectando tanto a humanos como a cabras, ovejas y vacas (Young EJ. Clin Infect Dis, 1995; 21:283290).

15 En humanos, la enfermedad es muy frecuente en España y provoca enfermedad a un gran número de personas anualmente. Conlleva además graves complicaciones como endocarditis, meningitis, orquitis, osteomielitis, artritis, etc (Colmenero JD, Reguera JM, Fernández-Nebro A, Cabrera-Franquelo F. Ann Rheum Dis, 1991; 50:23-26). Las secuelas de la enfermedad ocasionan unos perjuicios económicos enormes pues provocan invalidez en un número elevado de personas.

20 Las pruebas más empleadas en su diagnóstico serológico, son la aglutinación (Bettelheim KA, Maskill WJ, Pearce J, J Hyg Camb, 1983; 90:33-39), el Rosa de Bengala, la Reacción de Fijación del Complemento, el test de Coombs y las pruebas de ELISA (Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. World Health Organization monograph ser. No 55. Geneva. World Health Organization. 1975; Baum M, Zamir O, Bergan-Rios R, Katz E, Beider Z, Cohen A, Banai M, J Clin Microbiol, 1995; 33: 2166-2170). Mientras que en las formas menos evolucionadas de la enfermedad todas las pruebas serológicas son sensibles para el diagnóstico de la enfermedad, en las fases más evolucionadas aparecen anticuerpos incompletos que son incapaces de aglutinar a las brucelas, por lo que para poder poner de manifiesto este tipo de anticuerpos, es necesario emplear técnicas como las de ELISA (Goldbaum FA, et al. J Clin Microbiol 1992; 30: 604-607; Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. J Clin Microbiol, 1993; 31: 2141-2145), reacción de fijación del complemento o Test de Coombs (Foz A, Garriga J. Rev Immunol, 1954, 18:288-298, Ariza J. Med Clin (Barc), 1992; 98:494-496).

30 Estas técnicas presentan los siguientes inconvenientes: La técnica de ELISA para medir anticuerpos no es cuantificable a dilución única de suero por lo que se obtiene un resultado cualitativo que en zonas endémicas como es España presenta poco valor por la frecuencia de personas con anticuerpos. La reacción de fijación del complemento es una prueba cuantitativa que es poco sensible y por tanto menos útil en los estadios iniciales de la enfermedad y además de difícil ejecución, por lo que sólo algunos laboratorios realizan de forma habitual (Sánchez-Sousa A, Torres C, Campello MG, García C, Parras F, Cercenado E, Baquero F. J Clin Pathol, 1990; 43:79-81).

40 El test de Coombs es la prueba más adecuada para medir este tipo de anticuerpos, pero presenta dos serios inconvenientes: en primer lugar lleva al menos 24 horas en su ejecución y en segundo lugar es muy laboriosa de ejecutar. Si no se emplea microtécnica la titulación de un suero lleva al empleo de 8-12 tubos que tienen que ser lavados mediante centrifugación. Es fácil comprender que la realización de un número de sueros elevado es prácticamente inviable, pues por, ejemplo analizar 24 sueros por esta técnica obligaría al empleo de 192 a 288. Como el proceso de lavado tiene que ser repetido en tres ocasiones esto produce una manipulación enorme que la hace casi inviable lo que ha llevado a pesar de su utilidad a que no sea realizada todo lo ampliamente que debería, por lo que muchos casos de brucelosis pueden quedar sin diagnosticar (Maravi-Poma E, Murie M, Gamboa J, Díaz R, Rivero-Puente A. Rev Clin Esp, 1982, 166 101-105, Ariza J, Pellicer T, Pallarés R, Foz A, Gudiol F. Clin Infect Dis, 1992; 14:131-140).

50 La brucelosis es endémica de países con baja tecnología y en los que la ejecución de alguna de las técnicas anteriormente descritas es difícilmente aplicable.

Otro problema frecuentemente encontrado en las pruebas de aglutinación clásicas, es la aparición del llamado efecto de zona, que consiste en que a concentraciones altas de sueros positivos la reacción queda anulada por exceso de anticuerpos y es interpretada como negativa.

55 Con las técnicas serológicas para la brucelosis disponibles hasta el momento no es posible diferenciar entre un individuo enfermo de brucelosis y una persona ya curada de la enfermedad pero que todavía mantiene anticuerpos a *Brucella*, lo que dada la frecuente aparición de recaídas en esta enfermedad dificulta mucho el manejo de estos enfermos. En todas las enfermedades infecciosas se ha demostrado la presencia de anticuerpos de diferente afinidad en las diferentes fases de la enfermedad. Al inicio aparecen anticuerpos con baja afinidad, anticuerpos que se unen a los antígenos reaccionantes débilmente, con posterioridad son sustituidos por otros que presentan una gran afinidad por el antígeno y cuando no se

producen nuevos estímulos antigénicos, los anticuerpos que se detectan vuelven a ser de baja afinidad, tal como ocurría al principio de la infección.

5 En animales la enfermedad afecta tanto a ganado vacuno, como caprino y aviar, ocasionando graves pérdidas económicas por la frecuente aparición de abortos en el ganado afectado. Considerando nada más el ganado ovino en España se dedican anualmente más de 2.500 millones de pesetas al saneamiento del ganado infectado por *Brucella*, sin considerar los gastos ocasionados por la vacunación de los animales (Alonso-Urmeneta B, Moriyón I, Díaz R, Blasco JM. *J Clin Microbiol*, 1988; 26:2642-2646.; Delgado S, Fernández M, Cármenes P. *J Vet Diagn. Invest* 1995; 7: 206-209; Díaz-Aparicio E, et al. *J Clin Microbiol* 10 1994; 32:1159-1165).

Las pruebas de laboratorio empleadas en el diagnóstico en animales son la prueba del Rosa de Bengala y la Reacción de Fijación del Complemento (Díaz R, Levieux D. *C R Acad Sci Ser D*, 1972; 274D: 1593-1596). El mayor problema diagnóstico que aparece en animales estriba en que la mayor parte de los 15 rebaños están vacunados frente a este microorganismo y esto ocasiona la aparición de anticuerpos que son indistinguibles de los que aparecen tras la enfermedad. Cuando se realizan campañas de detección es necesario sacrificar muchos animales que dan las pruebas de laboratorio positivas, pero que sólo están vacunados y no infectados. Una prueba capaz de diferenciar entre los anticuerpos que presentan los 20 animales vacunados y los de los enfermos sería de enorme utilidad pues ahorraría un gran número de sacrificios innecesarios (Sutherland SS. *J Clin Microbiol* 1985; 22:44-47, Debbbarh H, Cloeckeaert A, Zygmunt M, Dubray G. *Vet. Microbiol.* 1995, 44: 37-48; Gómez-Miguel MJ, Moriyón I, Alonso-Urmeneta B, RiezuBoj JI, Díaz R. *Infec Immun* 1988; 56:716-718).

Es un objeto de la presente invención un test que consigue poner de manifiesto, con poca manipulación 25 tanto los anticuerpos completos como los incompletos de brucelosis.

Es otro objeto de la invención una técnica de ensayo que incorpora una solución ácida especialmente diseñada para evitar la aparición del fenómeno de zona, lo que facilita enormemente la lectura y correcta 30 identificación de los resultados.

Es otro objeto de la invención una técnica de ensayo que incorpora una solución con un componente de alto peso molecular en el que se realiza la preparación de la suspensión de brucela que incorpora el 35 equipo y que presenta como finalidad la estabilización del mismo.

Es también objeto de la invención un test que es capaz de diferenciar entre los anticuerpos que presenta un individuo enfermo y uno sano que pasó la enfermedad, pero que en la actualidad está ya curado. Debido al pH del diluyente usado en la técnica de la invención, tan sólo son determinados los anticuerpos de alta afinidad. Con los datos que se tienen se puede afirmar que el test de la invención es capaz de 40 diferenciar entre los anticuerpos que presentan los animales vacunados de los que presentan los animales enfermos.

Es por último, también objeto de la invención el equipo necesario para realizar el test anteriormente descrito.

45 El fundamento de la prueba de la invención se basa en la unión a los pocillos de una microplaca del tipo de las empleadas en las pruebas de ELISA de anticuerpos de cabra antiIgG y antiIgA humana (o en el caso de pruebas destinadas al uso en animales de las antiglobulinas correspondientes anti oveja, anticabra, antivaca) (Desmonts G, Naot Y, Remington JS. *J Clin Microbiol*, 1981; 14:486-491; Ong LY, Pang T, Lim SH, Tan EL, Puthuchearry SD. *J Med Microbiol*, 1989; 29:195-198; Cubel RCN, Alférez ACR, Cohen BJ, *J Clin Microbiol*, 1994; 32:1997-1999). Los sueros de los enfermos son añadidos y posteriormente se 50 añade una suspensión de *Brucella*. Tras dejar la placa en incubación a 37°C durante 24 horas, la prueba se lee a simple vista sin necesidad de ningún tipo de aparataje.

Como se ve, el test de la invención para medir anticuerpos incompletos en brucelosis está basado en 55 la adición a los pocillos tipo ELISA de anticuerpos antiIgG y antiIgA humana y animal adecuadamente bloqueados. En los equipos se incluyen sueros controles positivos y negativos, antígenos de *Brucella abortus* o *Brucella mellitensis*, y solución tampón para la dilución de las muestras. Se utilizan placas de ELISA de 96 pocillos o tiras de 8 pocillos o tiras de 12 pocillos, de forma que por placa se pueden analizar 12 sueros y 8 diluciones o bien 8 sueros y 12 diluciones por suero.

60 El contenido del equipo o kit necesario para la realización del test de la invención tiene reactivos para investigar de forma cuantitativa anticuerpos incompletos frente a *Brucella abortus* o *mellitensis* en 16

ES 2 131 032 B1

muestras si se analizan 12 diluciones de cada muestra o 24 muestras si se analizan 8 diluciones de cada muestra. Consta de lo siguiente:

- 96 pocillos de fondo en U especialmente tratadas para capturar inmunoglobulinas.

5 - 12 ml de suspensión bacteriana de *Brucella abortus* o *Brucella mellitensis* coloreada y muerta por calor y tratamiento con formaldehído al 0,5% en solución salina con 1% de dextrano.

- 14 ml de diluyente para sueros compuesto por una solución salina de acetatos 100 mM.

10 - 100 μ l de suero control positivo con 0,1% de azida sódica.

- 100 μ l de suero control negativo con 0,1% de azida sódica.

Este material debe conservarse a 4-8°C y comprobar la fecha de caducidad.

15 Como material necesario, pero no contenido en el equipo debe de tenerse una pipeta de precisión para dispensar 5 μ l y una pipeta de precisión multicanal para dispensar 50 μ l.

20 La ejecución de la técnica es sencilla, pues se basa en la adición de 50 μ l de tampón de dilución en cada uno de los pocillos y la dilución seriada de los sueros de los enfermos empleando una pipeta multicanal; tras esta operación hasta con la adición empleando también una pipeta multicanal de 50 μ l de antígeno y la incubación hasta el día siguiente para proceder a su lectura.

Debe hacerse constar que otras formas secundarias para la modificación de la prueba que no signifiquen modificaciones sustanciales quedan también cubiertas por la presente invención.

25 El procedimiento detallado del ensayo es el siguiente:

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Sacar las tiras de pocillos necesarios para el número de sueros que se van a procesar, más una tira para los controles positivo y negativo.

30 2. Añadir 50 μ l de diluyente en el pocillo A [Fase a) de la figura 1].

3. Añadir 50 μ l de diluyente en los pocillos de A a H [Fase b) de la figura 1].

35 4. Poner 5 μ l de cada uno de los sueros y de los controles positivo y negativo en el pocillo A. [Fase c) de la figura 1]

5. Doblodiluir tomando 50 μ l de cada pocillo desde A hasta H [Fase d) de la figura 1].

40 6. Añadir 50 μ l de la suspensión bacteriana, previamente agitado para homogeneizarlo, a todos los pocillos utilizados [Fase e) de la figura 1].

7. Tapar mediante un plástico adhesivo e incubar en estufa durante 24 horas a 37°C, en cámara húmeda en la oscuridad, puesto que la suspensión bacteriana una vez mezclada con el diluyente de los sueros cambia de coloración, si se lo somete a una exposición prolongada a la luz.

45 8. Leer el resultado con la ayuda de un lector de placas de aglutinación, teniendo en cuenta que los títulos obtenidos serán 1/40 para la fila A, 1/80 para la fila B, 1/160 para la fila C, 1/320 para la fila D, 1/620 para la fila E, 1/1280 para la fila F, 1/2560 para la fila G y de 1/5120 para la fila H.

La interpretación de los resultados es la siguiente:

50 La prueba es positiva cuando se observa una aglutinación que ocupa la mayor parte del pocillo (*). Una prueba es negativa cuando se observa un botón de bacterias en el centro del pocillo (**). Un título igual o superior a 320 es una fuerte evidencia de brucelosis, pero debe siempre evaluarse conjuntamente las demás pruebas clínicas antes de emitir un diagnóstico. En zonas endémicas de la enfermedad es frecuente encontrar resultados positivos a títulos inferiores a 320.

Para una evaluación de la prueba se estudiaron internamente 206 sueros de humanos, 85 pertenecientes a controles sanos, y el resto a enfermos de brucelosis en diferentes estadios de la enfermedad, comparándose los

60 (*) (Posición 1 de la figura 2)

(**) (Posición 2 de la figura 2)

ES 2 131 032 B1

resultados obtenidos con el test de la invención y los obtenidos empleando el test de Coombs, utilizando para ello microtécnica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I. Es preciso primero aclarar, que en las pruebas serológicas se determina de forma cuantitativa la presencia de anticuerpos por dilución de los sueros en un diluyente adecuado, es decir cuando se indica que un suero es positivo a 320, quiere decir que poniendo una parte de suero en 319 de diluyente la prueba es positiva. Se emplean diluciones dobladas, es decir que en cada ocasión se diluye al doble. Los números que aparecen en la tabla representan hasta aquella dilución de los sueros que estos fueron positivos en cada una de las técnicas, es decir tras diluir el suero del enfermo x veces en su correspondiente diluyente, que el resultado continúe siendo positivo en esta dilución y no lo sea cuando se diluye una vez más.

TABLA I

<i>Brucellacapt</i>								
		MEG	40-160	320-1280	2560-10240	20480-81920	>81920	Total Coombs
	MEG	82	3					85
	40-160	1	5	1			1	8
	320-1280		5	12	11		3	31
	2560-10240			7	18	10	26	61
	20840-81920				2	3	11	16
	>81920						5	5
	Brucellacapt Total	83	13	20	31	13	46	206

Para otra evaluación de la prueba se estudiaron internamente 53 sueros de oveja vacunadas con *B. melitensis* y analizadas a los días 0, 30 y 360 de la vacunación. Estos animales y otros fueron infectados con *B. melitensis* y analizados al día 1, 28, 70 y 336 de la infección. Los resultados pueden verse en la tabla II

TABLA II

Animal	Días P.V.	Días P.I.	R.B.	ELISA	Brucellacapt	Bacteriología
22	0	**	N	N	N	**
30	0	**	N	N	N	**
75	0	**	N	N	N	**
116	0	**	N	N	N	**
6	30	**	P	P	5.120	**

ES 2 131 032 B1

TABLA II (Continuación)

5	Animal	Días P.V.	Días P.I.	R.B.	ELISA	Brucellapt	Bacteriología
	22	30	**	P	P	163.840	**
	30	30	**	P	P	181.920	**
10	75	30	**	P	P	640	**
	116	30	360	P	P	2.560	**
15	6	360	**	N	P	40	**
	22	360	**	N	P	40	**
20	30	360	**	N	P	80	**
	75	360	**	N	N	80	**
25	116	360	**	N	P	80	**
	30	**	1	N	N	40	**
30	75	**	1	N	N	N	**
	6	**	1	N	N	40	**
35	22	**	1	N	P	40	**
	116	**	1	N	N	N	**
40	30	**	28	P	P	327.680	No excretor
	75	**	28	N	P	5.120	No excretor
45	6	**	28	N	P	20.480	Excretor
	22	**	28	N	P	327.680	No excretor
50	116	**	28	N	P	5.120	No excretor
	30	**	70	N	P	10.240	**
	75	**	70	N	P	40	**
55	6	**	70	N	P	320	**
	22	**	70	N	P	1.310.720	Aborto excretor
60	116	**	70	N	P	160	**

ES 2 131 032 B1

TABLA II (Continuación)

5	Animal	Días P.V.	Días P.I.	R.B.	ELISA	Brucellacapt	Bacteriología
	30	**	336	N	P	160	**
	75	**	336	N	N	160	**
10	6	**	336	N	P	80	**
	22	**	336	N	P	327.680	Excretor
15	116	**	336	N	P	160	**
	110	**	0	N	N	N	**
20	122	**	0	N	N	N	**
	2548	**	0	N	N	N	**
25	2491	**	0	N	N	N	**
	3010	**	0		N	N	**
30	110	**	28		P	327.680	Excretor
	122	**	28		P	327.680	Excretor
35	2548	**	28		P	327.680	Excretor
	2491	**	28		P	181.920	Excretor
40	3010	**	28		P	181.920	Excretor
	110	**	70		P	327.680	**
45	122	**	70		P	655.360	**
	2548	**	70		P	163.840	**
50	2491	**	70		P	181.920	**
	3010	**	70		P	5.120	**
55	110	**	336		P	5.120	**
	122	**	336		P	655.360	**
60	2548	**	336		P	81.920	**
	3010	**	336		P	181.920	**

** No aplicable; R.B. prueba del rosa de bengala; P: positivo; N: negativo; Días P.V.: días post

ES 2 131 032 B1

vacunación; Días P.I.: días post infección.

Los resultados obtenidos indican que la prueba de la invención es capaz de señalar los animales infectados y que han manifestado síntomas, discrimina animales vacunados que resisten la infección y por último señala animales vacunados que no resisten la infección.

En una prueba externa realizada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra (Catedrático Dr. D. Ramón Díaz) con sueros procedentes de humanos, se compararon el test de la invención con el test de Coombs empleando microtécnica. Para ello se emplearon muestras de enfermos de brucelosis al inicio de los síntomas de la enfermedad (primera muestra) y cuando ya estaban curados de ella (muestra final).

TABLA III

Paciente	Primera Muestra		Muestra Final	
	Coombs	Brucellacapt	Coombs	Brucellacapt
1	1.280	40.960	20	160
2	2.560	20.480	20	<80
3	2.560	40.960	20	<80
4	1.280	>81.920	160	160
5	5.120	>81.920	640	160
6	5.120	>81.920	2.560	<80
7	2.560	5.120	160	<80
8	2.560	>81.920	80	80
9	2.560	20.480	640	320
10	5.120	>81.920	2.560	640
11	1.280	40.960	80	<80
12	2.560	20.480	640	1.280
13	1.280	10.240	1.280	640

En estos resultados puede observarse que la prueba es muy eficaz para el diagnóstico de la enfermedad al inicio de la misma y lo que es más importante que es capaz de diferenciar cuando esta está curada, pues mientras que el test de Coombs, continua siendo positivo en 6 de los trece enfermos, la prueba de la invención sólo es positivo en dos de ellos a títulos mayores de 320.

REIVINDICACIONES

1. Test de laboratorio, para medir anticuerpos incompletos de brucelosis, aplicable tanto en humanos como en animales, **caracterizado** porque en una serie de pocillos de tipo ELISA se adicionan 50 μ l de un tampón de dilución, adicionando después 5 μ l de cada uno de los sueros en el primer pocillo, y procediendo a continuación a una doble dilución poniendo en cada pocillo 50 μ l del pocillo anterior, añadiendo entonces en cada pocillo 50 μ l de una suspensión bacteriana homogeneizada de Brucella abortus o B. melitensis, agitando e incubando finalmente en cámara húmeda y en la oscuridad, procediendo después a leer el resultado con ayuda de un lector de placas de aglutinación.

2. Test de laboratorio, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tampón de dilución es una solución de acetato sódico 100 mM con un pH de 5.

3. Test de laboratorio, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la suspensión de Brucella abortus o B. melitensis está coloreada y muerta por calor y tratamiento con formaldehído al 0,5% y suspendida con 1% de Dextrano.

4. Test de laboratorio, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fase de incubación se realiza, en cámara húmeda y oscura, durante 24 horas a 37°C.

5. Equipo o kit de laboratorio usado para realizar el test descrito en las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque consta de 24 tiras de 8 pocillos de fondo en U o de 12 tiras de 16 pocillos de fondo en U, o de una placa de 96 pocillos de fondo en U, especialmente tratadas para capturar inmunoglobulinas; 12 ml de suspensión bacteriana de Brucella abortus o B. melitensis coloreada y muerta por calor y tratamiento con formaldehído al 0,5%; 14 ml de diluyente para sueros; 100 μ l de suero control positivo con 0,1 % de azida sódica; 100 μ l de suero control negativo con 0,1 % de azida sódica.

30

35

40

45

50

55

60

Figura 1

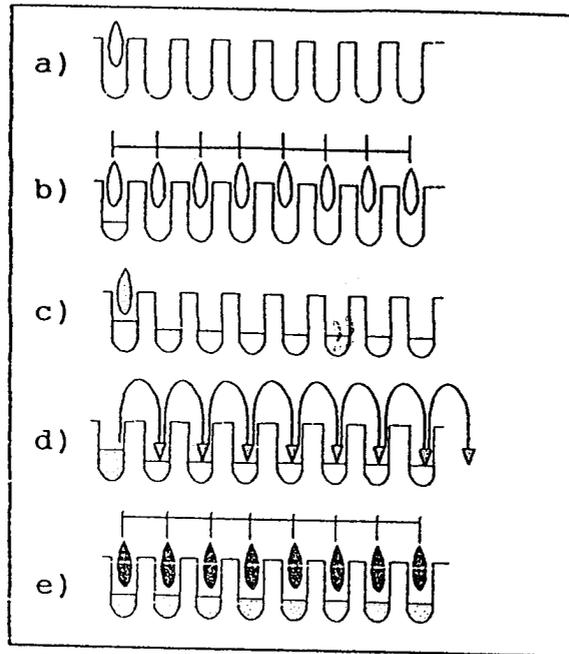
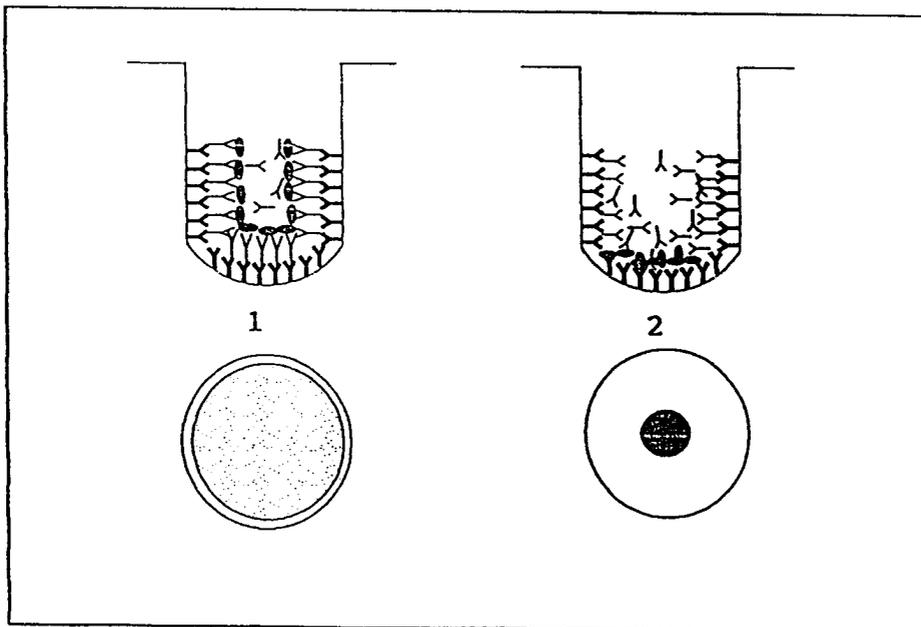


Figura 2





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/569

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BEATON C P et al. "A micromethod for agglutination and antiglobulin tests for antibody to Brucella abortus". Journal of Biological Standardization. Julio 1984. Vol. 12 (3), páginas 271-275.	1,5
X	WO 9007118 A3 (BAJYANA-SONGA) 28.06.1990, página 2, línea 15 - página 8, línea 20; ejemplo 3.	1,5
A	US 3962413 A (L.W. GEORGE et al.) 08.06.1976, columna 1, línea 60 - columna 3, línea 45.	1-5
A	BROWN S L et al. "Safranin O-stained antigen microagglutination test for detection of brucella antibodies". Journal of clinical microbiology. Febrero 1981, Vol. 13 (2), páginas 398-400.	1-5

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

12.02.99

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1