

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 107 388**

②① Número de solicitud: 9502169

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 33/543

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **07.11.95**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.97**

Fecha de concesión: **12.05.98**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.98**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.98

⑦③ Titular/es: **Universidad de Granada
Cuesta del Hospicio, s/n
Granada, ES**

⑦② Inventor/es: **Younes, Sbihi y
Osuna, Antonio**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Desarrollo de un kit rápido para el diagnóstico de la trichinelosis.**

⑤⑦ Resumen:

La presente invención consiste en el desarrollo de un "kit" rápido capaz de detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a *Trichinella spiralis* aplicados al diagnóstico de la trichinelosis, enfermedad parasitaria, del hombre, cerdo y otros animales empleados para el consumo cárnico. Este kit discrimina los casos positivos de los negativos, apareciendo una banda coloreada sobre un sustrato inerte en los casos positivos. Como reactivos biológicos, pueden emplearse sangre, suero, saliva u otros fluidos biológicos.

Este "kit" puede aplicarse a la detección de anticuerpos de cualquier agente infeccioso, así como para la detección de sustancias capaces de comportarse como antígenos.

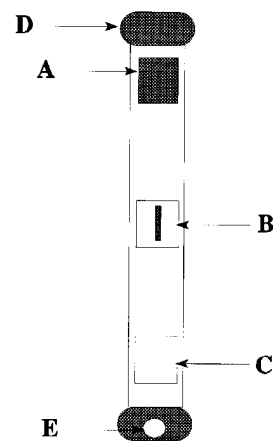


Fig.2

ES 2 107 388 B1

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

DESCRIPCION

Desarrollo de un kit rápido para el diagnóstico de la triquinosis.

Objeto de la invención

Consiste en el desarrollo de un "kit" rápido para el diagnóstico de la triquinosis, basado en la detección de anticuerpos específicos. Esta enfermedad parasitaria es una zoonosis que se transmite al hombre por el consumo de carne de cerdo, jabalí y otros animales. Este "kit" discrimina los casos positivos de los negativos de un modo fácil de interpretar por la formación de una cruz coloreada sobre un sustrato inerte en los casos positivos.

Para su realización puede partirse de muestras de sangre, suero, saliva, u otros fluidos orgánicos.

Antecedentes

La Triquinosis es una enfermedad del hombre y otros mamíferos carnívoros u omnívoros, causada por el parásito *Trichinella spiralis*. La parasitación humana se estima en unos 300.000 casos diagnosticados anuales. Estas cifras en nuestro país no son muy elevadas, pero se denuncian focos dispersos anuales como consecuencia de matanzas clandestinas de cerdo ó jabalí. Así, entre 1981 y 1989, se contabilizaron 55 brotes epidémicos, afectando a 1.100 personas, siendo pues la triquinosis un problema de salud pública en España (Boletín Epidemiológico Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo. 198289). En otros países de Europa, sobre todo del hemisferio norte, la incidencia es mayor. Los casos son generalmente debidos a la ingestión de carne o embutidos de cerdo o jabalí, aunque existen brotes curiosos, como los ocurridos en Francia y en Italia, donde la fuente de contaminación fue carne de caballo importada de Alemania y Polonia (Pozio, E., Capelli, O., Marchesi, L., Valeri, P. and Rossi, P. 1987. Ann. Parasitol. Humm. Comp. 63: (1) 48-53; De Carnerí, I., Ancelle, T., Dupuy-Carmet and Pozio, E. 1989. En: Trichinellosis. Edit. Ch. E. Tarnner 1989). El diagnóstico de esta enfermedad es de obligado cumplimiento en los mataderos y explotaciones cárnicas de la mayor parte de los países occidentales. El procedimiento seguido para la detección del parásito consiste en la visualización del mismo mediante triquinoscopia. El veterinario examina una muestra muscular del animal sacrificado, entre placas de cristal, detectando así los quistes del parásito. Su mayor inconveniente son los falsos negativos, bien por una parasitemia baja, o por no estar los quistes aún perfectamente formados. otro procedimiento más complejo es la liberación de las larvas, mediante digestión artificial, en una solución de pepsina y ácido clorhídrico, en lo que se denominan digestores. Tiene el inconveniente de que precisa tiempo, con la paralización de la cadena de despiece, hasta la obtención de resultados. El diagnóstico inmunológico no se emplea a nivel de matadero porque precisa tiempo, personal, y material especializado. Tanto en el hombre como en animales parasitados, se han detectado inmunoglobulinas G, M, A y E. (Rosemberg y col. 1971 Ann. Intern. of Med. 75:575-578; Ljungström 1974. En: Trichinellosis (C. W. Kim, ed. Intext. New-York, pp 449-459); Matossian y col

1977, J. Helminthol. 51:1-4). Estas inmunoglobulinas se hacen patentes en el suero algunos días tras la infección (Ljungström 1974, Parasitology 69:XXIV). Después de algunos meses los niveles de IgM siguen permaneciendo altos, al igual que los de IgA. Transcurridos dos años de la infección, prácticamente el 50 % de los sueros carecen de IgA e IgM específicas frente a *Trichinella*. En algunos pacientes se observa una elevación de los niveles específicos de IgE, (Stumpf y col. 1981, En: Trichinellosis C. W. Kim, E. J. Ruitenber and J. S. Teppema, eds., Redbooks, Chertsey, England, pp. 279-282). El diagnóstico inmunológico de la enfermedad fue inicialmente desarrollado por Ströbel en 1911 (Muench. Med. Wochenschr. 58: 672-674), quien desarrolló una técnica de fijación de complemento. Este método precisa tiempo, especialización, y los resultados no son extrapolables de un laboratorio a otro, (Kagan y Norman 1970, En: Trichinosis in man and animals (S. E. Gould, ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 222-268). Bachman, en 1928, (J. Prev. Med. 2:35-48; J. Prev. Med. 2:169-173), empleó para el diagnóstico una técnica de intradermorreacción, muy en boga en la época. Tras la inyección del antígeno, se produce una reacción de hipersensibilidad inmediata, entre los 10-20 minutos, una reacción de Arthus entre las 4-8 horas, y una hipersensibilidad retardada entre las 12-48 horas. Esta técnica es sólo aplicable al hombre.

Se han valorado también técnicas de precipitación. La precipitación en anillo, en la que el suero y un extracto del parásito se incuban, viéndose tras la incubación un halo de precipitación, (Kagan y Bargai 1956, J. Parasitol. 42: 237-245.), es un test bastante sensible pero de especificidad cuestionable (Kagan y Norman 1970, Trichinosis in Man and Animals (S. E. Gould, ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 222-268). En el test de microprecipitación el precipitado se forma en los orificios naturales del verme, tras incubar adultos o larvas con el suero del paciente, (Mauss 1940, Am. J. Hyg. 32 Sect D: 80-83). Éste es un test sensible, (Ljungström 1974, in Trichinellosis (C. W. Kim, ed. Intext. New-York, pp 449-459)), pero tiene como grave inconveniente la necesidad de disponer de larvas vivas del parásito. Se han descrito también varios tests de floculación, empleando distintos soportes sensibilizados con los antígenos del parásito, que floculan al realizarse la reacción antígeno-anticuerpo, tales como partículas de colesterol, (Suessenguth y Kline 1944, Am. J. Clin. Pathol. 14: 471-484), de bentonita, (Bozicevich y col. 1951, Public. Heath Rep. 66:806-814), o de carbón activo (Anderson y col. 1963, J. Parasito. 49: 642-647) Cuando estas partículas sensibilizadas se mezclan con el suero, se forman una serie de agregados, y se valora en función del grado de agregación, con la ayuda de una lupa ó visualizando sobre una superficie lisa y brillante. Estos tests son menos sensibles que los. de aglutinación (M. Kozar y col. 1964, Wiad. Parazytol. 10:717-737).

La técnica de hemoaglutinación fue aplicada por Price y Wiener, en 1956 (Am. J. Clin. Pathol. 26: 1261-1269), y por Kagan y Bargai (J. Pa-

rasitol. 42: 237-245. 1956). Los antígenos usados para esta técnica fueron obtenidos por el procedimiento de Witesbky y col. (N. Y. State J. Med. 42: 431-435. 1942), consistente en un extracto hervido de larvas musculares, y por el de Melcher (J. Infect. Dis. 73: 31-39. 1943), consistente en un extracto ácido soluble de las larvas. Estos métodos son más sensibles que la floculación con bentonita (Barriga 1977 J. Clin. Microbiol. 6: 274-279) la fijación de complemento, o los tests de precipitación. Su sensibilidad es aún mayor que la de la Inmunofluorescencia indirecta siendo sólo comparable a la de la técnica de ELISA (Campbell 1983, *Trichinella* and *Trichinellosis*, Plenum Press, New York and London). Sus inconvenientes son los falsos positivos debidos a fenómenos de prozona, y el que deben emplearse glóbulos rojos frescos, recién tanizados y sensibilizados, cuya durabilidad es de unos seis meses (Ali-Khan 1974, *Int. J. Parasitol.* 4: 549-554).

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), junto con el radioinmunoensayo (RIA) se han revelado como los más sensibles hasta el momento. Aunque el RIA es un método sensible precisa alta cualificación técnica e instrumental lo que limita su uso a un número reducido de centros. Algo parecido ocurre con el Immunoblot, técnica de aplicación en investigación y no en laboratorios de diagnóstico clínico o industrial. Por el contrario, las técnicas de visualización de la reacción antígeno anticuerpo, mediante reacción enzimática tienen una serie de ventajas sobre las anteriores, reproducibilidad, equipamiento poco costoso y sobre todo sensibilidad. En la ELISA "COMPETITIVA" un antígeno puro y en gran cantidad se emplea ligado a un enzima. La ELISA "SANDWICH", es un ensayo en el que se mide antígeno, empleando un anticuerpo marcado con el enzima, y la más empleada es la ELISA "INDIRECTA", donde el antígeno reacciona con los anticuerpos, enfrentándose éstos posteriormente con un antisuero marcado con el enzima. Como soporte sólido de la reacción se emplea un soporte plástico, al que se ligan las proteínas, sean antígenos o anticuerpos. Para ligar los anticuerpos, o antígenos con el enzima escogido, se emplean tratamientos con reactivos tales como el glutaraldehído, la carbodiimida, o el N-succinidimil 3-(2-pyridylthio)propionato, entre otros. Los enzimas más empleados son la peroxidasa, la β galactosidasa y, en el caso concreto de *Trichinella*, se ha empleado la fosfatasa alcalina, aunque puede acoplarse cualquier enzima, o conjunto de enzimas, que proporcione al final de la reacción un color, o un cambio en la emisión o absorción de fluorescencia. Los primeros investigadores que aplicaron la ELISA al diagnóstico de *Trichinella* fueron Ljungstöm y col en 1974, (*Parasitol.* 69: XXIV). Ruitenber y col en 1975, (*Medicom. Nederl.* 4:30-31) introdujeron la MICRO-ELISA. Este método es muy sensible, únicamente comparable a la Hemaglutinación. Tiene sin embargo el inconveniente de que requiere un plazo de una o dos horas, entre la incubación del suero y la lectura. La inmunoelectroforesis es una de las técnicas más rápidas que se pueden emplear, aproximadamente una hora (Despommier y col. 1974, *Am. J. Trop. Med.*

Hyg. 23:41-44). Su sensibilidad es comparable a los test de floculación de bentonita, (Despommier y col 1974 *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23:41-44), ó a la técnica de la aglutinación de látex, (Barrett-Connor y col. 1976, *J. Infect. Dis.* 133: 473-477). Recientemente, han sido desarrollados como métodos de diagnóstico de la enfermedad métodos de captura de antígenos circulantes (C. Arriga 1993, *Trichinellosis Meeting*, Orvieto, Italia). Un sistema de amplificación quimioluminiscente en inmunoensayo ha sido aplicado por C. K. F. Li (1993) (*Trichinellosis Meeting*, Orvieto, Italia).

El kit objeto de esta patente, se basa en técnicas de aglutinación que no se han utilizado hasta ahora para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o parasitarias.

Estas técnicas se basan en el fenómeno físico del cambio de color que experimentan las partículas de oro coloidal, cuando se adsorben proteínas sobre ellas, (Faulk y Taylor 1971 *Immunochemistry* 8:1081-1083). Las partículas de oro se unen a los anticuerpos, y se emplean para determinar de una forma pasiva, la presencia de antígenos en una muestra biológica. Es una técnica sensible que se ha aplicado para la detección de hormonas en orina, (Gribnau, T. F., Roeles, J.V., Biezen, J., Leuverin and A. Schnurs. 1981. *The applications of colloidal dye particles as labels in immunoassays: disperse(d) dye immunoassay (DYA)*. *Anal. Chem. Symp. Ser.* 9:411-427). (Masson, P. L., Cambiasso, D., Collet-Cassart, C. G. M. Magnusson, C. B. Richards, and C. J. Sindic. 1981. *Particle counting immunoassay (PACIA)*. *Methods Enzymol.* 74:106-139.)

Explicación de la invención

La invención consiste en el desarrollo de un kit para un diagnóstico rápido, (no más de algunos minutos), de la triquinosis. Es además aplicable a la detección de cualquier otro proceso infeccioso, o a la determinación de sustancias con capacidad antigénica. El método se basa en la sensibilización de partículas de metales en estado coloidal, con antígenos o con anticuerpos específicos. Es válido pues, tanto para la determinación de anticuerpos específicos, como para la de antígenos en suero, sangre u otros fluidos biológicos. Los metales coloidales sensibilizados van sobre un soporte inerte, en el que se coloca el fluido biológico, que se desplaza en él por capilaridad, arrastrando las partículas metálicas sensibilizadas, que se ligan específicamente a los anticuerpos ó a los antígenos. A un nivel determinado, se ha situado un sistema "trampa" que atrapa a las partículas impidiéndoles continuar su desplazamiento si la reacción es positiva, lo que puede visualizarse por su color, o por cualquier otro método (colorimétrico, o espectrofotométrico). Esta "trampa" puede basarse en anticuerpos anti-antígeno, en un sistema de captura de anticuerpos, (proteína A ó proteína G), en un anticuerpo monoclonal, en su caso, o puede ser un antígeno si lo que se trata es de valorar inmunoglobulinas. Como medio de desarrollo puede emplearse cualquier solución que mantenga un pH entre 6 y 9, y que no altere los complejos antígeno-anticuerpo formados.

La evaluación de resultados se muestra en la

figura nº 1, donde A refleja un resultado positivo, B negativo y C representa al soporte, antes de la aplicación del fluido biológico a examinar.

Este kit tiene una serie de ventajas sobre los procedimientos tradicionales de diagnóstico:

- Es una prueba de un solo paso
- El tiempo de realización es muy corto, no más de 5-10 minutos.
- No requiere operaciones filtrantes.
- No requiere fases de lavado, salvo que se parta de sangre como muestra biológica.
- No requiere la determinación exacta del volumen de muestra a aplicar.
- Los resultados se analizan por una simple lectura visual.

Ningún ensayo descrito anteriormente para el diagnóstico de la triquinosis, presenta todas estas ventajas, combinadas en el mismo sistema analítico.

Descripción

Se utiliza una lámina, de unos 4-5 centímetros de largo por 0'7 de ancho. Esta lámina puede ser de papel de nitrocelulosa, acetato de celulosa, o de cualquier otro material inerte capaz de unir proteínas, y permitir por capilaridad el desplazamiento de un fluido, con un flujo de 1'5 a 2 centímetros por minuto. Es útil, por ejemplo, el tipo de membrana Nitro PB Plastic Backed Nitrocellulose, fabricada por Micron Separation INC. Sobre este soporte se aplican en un extremo, a unos 0'5 cms, las partículas de oro coloidal, de un tamaño comprendido entre 5 y 20 nm de diámetro y previamente conjugadas con el antígeno, ó con el sistema de captura específico que se vaya a utilizar. Aproximadamente en el centro de la membrana, se ha situado el sistema "trampa", en posición trasversal, para capturar por una reacción antígeno-anticuerpo a las partículas del conjugado metálico, impidiendo de esta forma que continúen en su desplazamiento.

En situación longitudinal al soporte, como control negativo, se adsorben partículas metálicas ligadas a una proteína incapaz de reaccionar. De este modo, la línea vertical va a aparecer en todos los casos y el signo "mas" (+) sólo cuando la reacción es positiva, y las partículas han quedado también retenidas transversalmente por una reacción específica.

Preparación del conjugado metálico

El oro coloidal es hidrofóbico, y está formado por partículas de HAuCl₂ manteniéndose la estabilidad del coloide por repulsión electrostática. La adición de electrolitos como el NaCl, induce la floculación de las partículas, formándose agregados. Esta floculación conlleva un cambio de color de rojo a azul, y puede evitarse estabilizando el coloide por adsorción de sustancias hidrofóbicas. Las partículas pueden adquirirse en Janssen Life Sciences Products, Olen, Bélgica. Previo a su sensibilización, se someten a un proceso de reducción con citrato trisódico al 1% en solución acuosa. Después de ajustar el pH a 6, se procede

a calcular la cantidad de reactivo bioselectivo, en ese caso proteína A, necesaria para estabilizar el coloide (E. Knecht, A. Martínez-Ramón, S. Grisolia. 1986 J. Histochem. Cytochem. 34:913-922).

Las partículas se centrifugan después a 60.000 g durante una hora, y a 4°C. Ello conduce a la formación de un precipitado de color rojo en el fondo del tubo, formado por el complejo proteína-oro coloidal, mientras que las partículas no estabilizadas aparecen adheridas a la pared del tubo, como una precipitación de color más oscuro. El botón se resuspende, en un volumen 25 veces inferior, en una solución formada por PBS 0'15M, con un 20% de glicerol y adicionado de 0'2 mg/ml de polietilenglicol-20.000, y 20 mM de azida sódica. Esta suspensión permanece estable durante varios meses a 4°C.

Preparación del antígeno

El antígeno fue preparado de acuerdo con el método descrito por I. Kehayov y col. 1991 (Parasitol. Res 77:72-76), con algunas modificaciones. Las larvas de *T. spiralis* y *T. pseudospiralis*, se obtuvieron de animales de experimentación infectados 45 días antes. Se realizó para ello una digestión péptica del tejido muscular, (1% Pepsina (Merck) 1% HCl 1N en solución salina), durante dos horas, a 37°C y con agitación constante de 70 ciclos por minuto.

Las larvas así obtenidas eran lavadas en solución PBS y sonicadas. El homogenado se centrifugó a 16000 g, durante 20 minutos y a 4°C. El contenido de proteínas del sobrenadante fue valorado con el método de Lowry, ajustado a 5 - 7 mg/ml, distribuido en alícuotas y liofilizado hasta su posterior uso.

Preparación de las tiras analíticas

Como soporte analítico se puede emplear cualquier lámina inerte capaz de adsorber proteínas sobre su superficie, y que permita un flujo constante por humectación de una fase móvil acuosa, aplicada en uno de sus extremos. Se puede emplear una lámina de nitrocelulosa, acetato de celulosa o cualquier polímero que cumpla estas características. El soporte empleado en nuestros ensayos ha sido la membrana tipo Nitro PB Plastic Backed Nitrocellulose, fabricada por Micron Separation INC. Se utiliza en tiras de 0'7 centímetros de ancho y 4 a 5 centímetros de largo. Previo a su sensibilización, se aplica sobre ella, centrada y horizontal, una banda de 4 x 1 mm, con una suspensión de partículas metálicas acopladas a una proteína no reactiva, como puede ser albúmina de huevo, altamente purificada.

La sensibilización se lleva a cabo con una solución de antígeno, preparado como se describió anteriormente aplicando transversalmente una banda similar a la anteriormente descrita con partículas metálicas, pero en posición transversa, y a unos 2'5 centímetros del margen de la membrana soporte, que se va a considerar como origen. Una vez el antígeno seco, se aplica sobre la membrana una solución de bloqueo durante 12 horas a 4°C. Esta puede ser una solución de polioxietilensorbitan monolaurato (Tween 20) al 0'3%, leche en polvo, gelatina al 0'4%, o cualquier otra solución de bloqueo de las utilizadas en inmunotransferencia. Una vez bloqueado el

soporte, se deja secar a temperatura ambiente. De este modo, finalizada la reacción, si ésta es negativa sólo va a haber una banda longitudinal, mientras que si ésta es positiva, el funcionamiento del sistema "trampa" va a conducir a una figura en forma de cruz, al darse tanto la reacción inespecífica como la específica. La suspensión del conjugado coloidal (3 a 5 μ l), se aplica a unos 0'5 centímetros del margen de la membrana. La tira reactiva está con ello disponible para llevar a cabo la reacción. Entre el extremo de la membrana y la zona que contiene las partículas metálicas, se aplica un rectángulo de papel, para absorber el fluido biológico que se va a utilizar.

Descripción del equipo que contiene la tira reactiva

El sistema (Figuras 2 a 5), consta de un soporte de material plástico, para albergar la membrana analítica sensibilizada. En su parte superior existen tres ventanas, (Figuras 2, 3 y 4: A, B y C). En el origen, una ventana cuadrada de aproximadamente 0'5 cm de lado, (Figura 2:A) lugar de aplicación de la muestra biológica a analizar, que va a estar situada sobre el rectángulo de papel antes citado, y a la que denominaremos "ventana de aplicación". La segunda, (Fig 2:B), de un tamaño similar, se sitúa a unos 2 centímetros del origen. A través de ella podrá visualizarse la banda longitudinal que corresponde a las partículas unidas a la proteína no reactiva, caso de ser negativa la prueba, y dos bandas cruzadas en los casos positivos. Esta es pues la "ventana de visualización de resultados". La tercera, (Fig. 2:C), está situada a un centímetro de la anterior, y sirve para determinar el fin de la reacción, observando a través de ella el paso de la fase móvil.

Cuando se utiliza como fluido biológico sangre, es necesario previo a la aplicación de la muestra, depositar unas gotas de una solución de heparina a través de la ventana A. Transcurrido el tiempo de desarrollo se aplicaran a través de la ventana B unas gotas de la solución oxidante que se describe posteriormente. Un minuto después, el equipo se introduce brevemente en el contenedor de transporte, y se vuelve a sacar. Este contenedor, (Figuras 4 y 5), es de plástico, tiene forma rectangular y posee unas guías longitudinales (Figuras 4 y 5:H), por las que se introduce el soporte de la tira reactiva. En la superficie interna de su cara frontal, se sitúan unas tiras de celulosa en fibras (Figuras 4 y 5, I), que, al introducir el soporte de la tira reactiva en el contenedor plástico, van a contactar con la ventana central, absorbiendo el exceso de líquido que pudiera existir.

Desarrollo del método

La muestra biológica deberá aplicarse sobre el papel de filtro situado bajo "la ventana de aplicación de la muestra" (Fig 2: A). La cantidad de muestra a aplicar no tiene que ser exacta, bastarán un par de gotas, las necesarias para empapar el papel de la ventana y mantener a este húmedo durante un máximo de dos a tres minutos. Si la muestra fuera insuficiente para ello, tras su aplicación se añadirían 30 μ l de solución PBS 0'15M, a pH 7'4. En el caso de muestras de sangre, se añadirá en todos los casos ésta misma so-

lución adicionada de peróxido de hidrógeno, (110 volúmenes) al 75 %.

Si se quiere emplear este sistema de diagnóstico a escala industrial, para procesar simultáneamente varias muestras, por ejemplo en mataderos, se empleará el dispositivo que se esquematiza en la Figura 6. Los soportes, una vez aplicada la muestra biológica, se enganchan por un orificio en su extremo final (E), a unos ganchos conectados al tapón cilíndrico del contenedor. Al finalizar la prueba se extraen en su conjunto, y se sumergen en una solución PBS 0'15M (pH 7'4), más el agente oxidante. Transcurridos unos minutos, los soportes se extraerán de la solución para leer los resultados.

Fiabilidad y especificidad del sistema

Con objeto de valorar la fiabilidad y especificidad del kit, hemos realizado un estudio con sueros humanos, procedentes de pacientes infectados con *Trichinella*, titulándolos previamente por la técnica de ELISA. Los resultados aparecen en la tabla N° 1 mostrando como todos los sueros que fueron positivos por ELISA, con títulos comprendidos entre 1/256 a 1/2048, dieron también un resultado positivo con nuestra técnica. La valoración de 15 sueros negativos por ELISA, ofreció también resultados coincidentes.

Correlación entre la Técnica de ELISA y el sistema desarrollado objeto de la patente

10 Sueros de pacientes positivos		15 Sueros negativos	
ELISA	KIT	ELISA	KIT
10	10	15	15

Dada la correlación mostrada, y al objeto de determinar la especificidad del kit, se procesaron sueros positivos frente a otras parasitosis. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla N° 2.

TABLA 2

Parasitosis	N° de sueros	Resultado
Hidatidosis hepática	9	9 negativos
Hidatidosis pulmonar	3	3 negativos
Cisticercosis	3	3 negativos
Leishmaniosis Visceral	10	10 negativos
Toxoscariosis	1	1 negativo
Triquinelosis	10	10 positivos

Para determinar la sensibilidad del kit, y el momento en que comienza a ser positivo a partir de la infección, se realizó una experiencia con ratones albinos "Swiss". Estos se dividieron en 3 lotes de 10 animales cada uno, que fueron infectados respectivamente con 10, 50 y 100 larvas de *Trichinella spiralis*. Las muestras de sangre de estos animales se fueron procesando periódicamente, a partir de los 10 días postinfección. En esta fecha ofrecieron resultados positivos sólo los inoculados con la dosis de 100 larvas, positivándose el resto a partir de los 14 días postinfección.

Al objeto de comprobar que este sistema puede ser también útil para la detección de otros agentes infecciosos y de sustancias con capacidad antigénica en general, se han realizado pruebas en las que sobre la tira reactiva y a modo de trampa se ha adsorbido hemocianina o albúmina de huevo, colocándose como fuente de inmunoglobulinas sueros de animales inmunizados específicamente contra estas proteínas. Cuando se utilizó suero de animales inmunizados apareció la banda coloreada marcando la positividad, mientras que cuando se utilizó suero de animales normales el resultado obtenido fue negativo. Con lo que el método puede ser aplicable a la detección de cualquier sustancia con capacidad antigénica o agente infeccioso capaz de producir una respuesta inmune humoral.

Explicación de las figuras

Fig. 2.- Esquema longitudinal de la tira reactiva en su soporte. Éste consta de dos láminas de plástico, que encajan albergando a la tira reactiva. La lámina superior tiene tres ventanas cuadradas de igual tamaño (A, B y C). La lámina inferior tiene dos expansiones en ambos extremos (D y E), para facilitar su manipulación. La expansión D, sirve de tope, al introducirlo en el contenedor. E, está provista de un orificio central, para colgarla, en su caso, del contenedor para muestras múltiples (Figura 6).

Fig.3.-Esquema transversal de la tira reactiva y su soporte. F.-plástico inferior, sobre el que se sitúa la tira reactiva. G.-celulosa en polvo comprimida. H.-plástico superior con tres ventanas (A, B y C), de igual tamaño.

Figura 4. - Esquema del contenedor albergando al equipo de diagnóstico. M. -Guías que permiten introducir con facilidad el equipo de diagnóstico en el contenedor. I.-Bandas de material absorbente, que van a eliminar el exceso de solución lavadora, si se ha partido de una muestra de sangre. J. -Línea que marca, en el contenedor, el nivel máximo de solución lavadora, en el caso de muestras de sangre.

Figura 5. -Esquema en sección del contenedor, mostrando las guías para introducción del soporte de la tira reactiva (M), y una de las bandas de material absorbente (I), para eliminar el exceso de líquido.

Figura 6.-Esquema del contenedor para muestras múltiples, con un equipo de diagnóstico. J.-Línea marcada sobre el contenedor que indica el nivel máximo de solución decolorante en el caso de muestras de sangre. K.-Línea marcada sobre el contenedor que indica el nivel máximo de solución de PBS. L.-Tapadera cilíndrica que cierra el contenedor para su transporte, provista de ganchos para conectar los soportes de las tiras reactivas a través de sus orificios (E).

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Se reivindica un método para el diagnóstico inmunológico de la trichinosis, que puede ser aplicable tanto al diagnóstico de otros agentes infecciosos capaces de inducir una respuesta inmune como para la detección mediante anticuerpos específicos de cualquier sustancia natural o sintética capaz de inducir la producción de anticuerpos por sí mismas o como hapteno.

El método consta de:

a: Una tira reactiva que empapa por capilaridad el fluido biológico (sangre, suero, plasma, saliva), del que se parte para el análisis. Dicha tira reactiva posee secuencialmente:

Una zona de aplicación donde se coloca la muestra biológica sobre un material absorbente, una zona de incubación o desplazamiento, una de lectura de resultados, y una zona final para determinar el fin de la reacción.

b: En la zona de incubación existen partículas metálicas acomplejadas con un reactivo capaz de ligar anticuerpos o antígenos, según se trate. En esta zona tiene lugar la reacción de estos complejos con los componentes de la muestra biológica.

c: En la zona de lectura se sitúa un sistema "trampa" en posición transversal, que impide que continúe el desplazamiento de las partículas metálicas si la reacción es positiva, debido a la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Se sitúa además una banda coloreada longitudinal, con partículas ligadas inespecíficamente que aparecerá en todos los casos, y que en conjunción con la "trampa" transversal específica, dará lugar a un signo "+", o a otro tipo de marca preestablecida, sólo en las reacciones positivas.

2. Al objeto de poder manipular y usar la

tira reactiva anteriormente descrita se reivindica el equipo que consta de un soporte formado por dos láminas de plástico que albergan a la tira reactiva para llevar a cabo la reacción.

Este soporte incluye:

a: Tres ventanas en la lámina superior, coincidentes con las zonas indicadas en la reivindicación n° 1 denominadas: de aplicación, de lectura de resultados y zona final.

b: Dos expansiones en ambos extremos para facilitar su manipulación, y adaptación al contenedor para muestras múltiples, (reivindicación n° 4).

3. Se reivindica un contenedor de plástico para transportar y usar la tira reactiva de la reivindicación 1 y el soporte de dicha tira descrito en la reivindicación n° 2.

Este contenedor incluye:

a: Unas guías longitudinales para introducir el equipo.

b: Bandas de material absorbente.

c: Una línea que marca el nivel máximo de solución lavadora en el caso de muestras sanguíneas.

4. Al objeto de poder usar numerosas tiras reactivas de la reivindicación 1 y el soporte de la reivindicación 2, se reivindica un contenedor para muestras múltiples de uso industrial u hospitalario.

Este contenedor incluye:

a: Una tapadera cilíndrica que permite su cierre para transporte, y a la que se conectan los soportes de las tiras reactivas.

b: Dos líneas marcadoras de niveles máximos de solución lavadora y de la solución decolorante, para cuando las muestras biológicas son sangre o contienen hemoglobina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

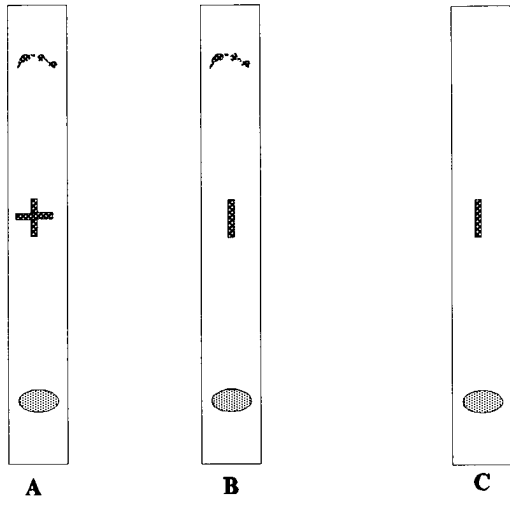


Fig. 1

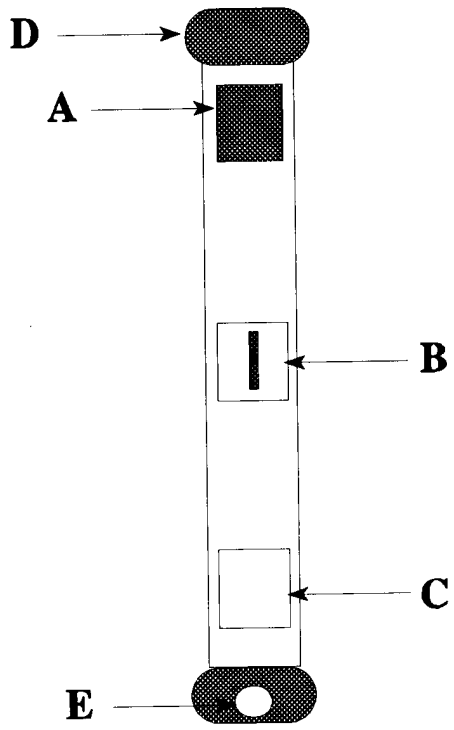


Fig.2

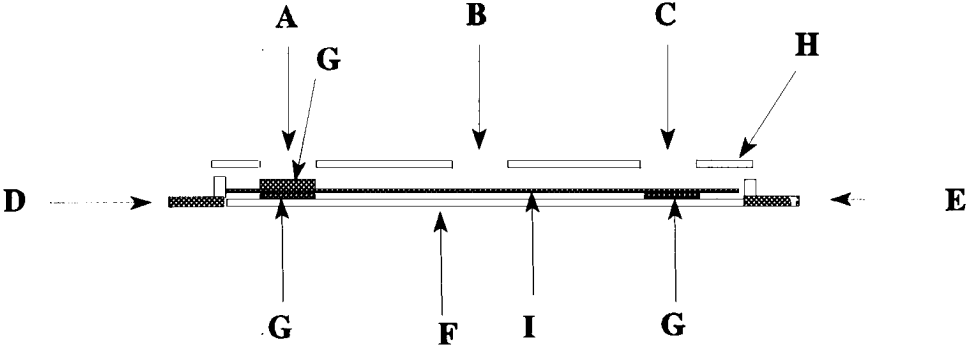


Fig. 3

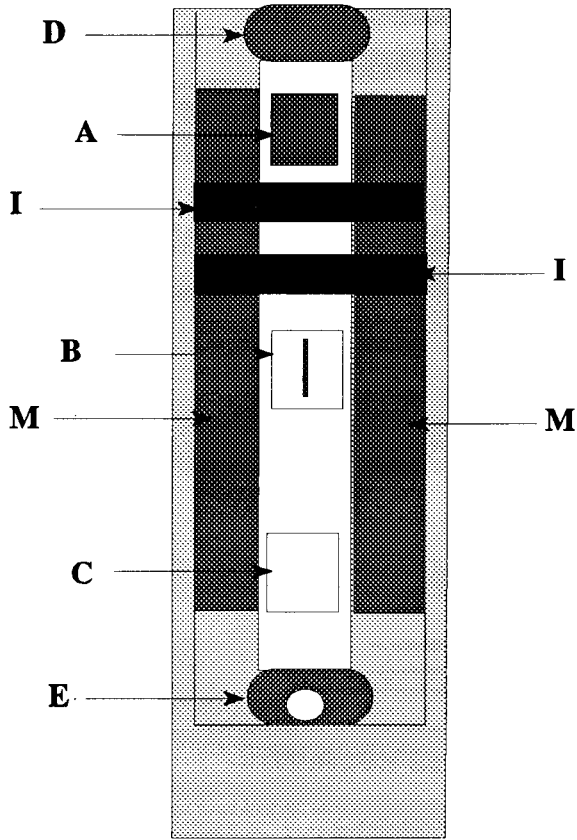


Fig. 4

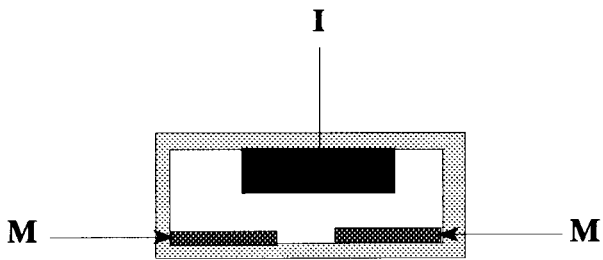


Fig. 5

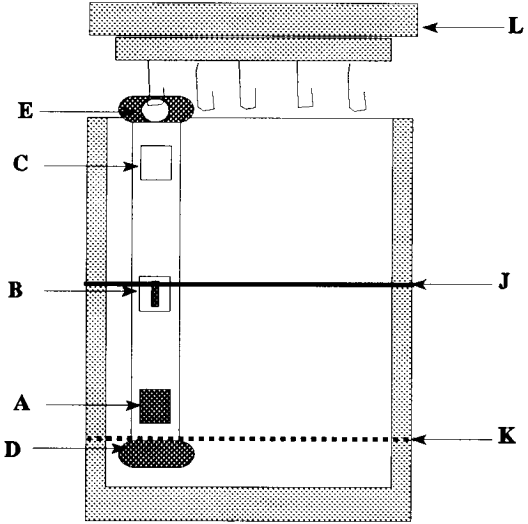


Fig. 6



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: G01N 33/543

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4717656-A (CARL G.P. SWANL JUNG) 05.06.88	
A	US-4962043-A (MORIHARU NAGASE et al.) 09.10.90	
A	WO-9015327-A (GOULD MARTIN et al.) 13.12.90	
A	EP-0402023-A (E-Y LABORATORIES INC.) 12.12.90	
A	WO-9415215-A (OY MEDIX BIOCHEMICA AB) 17.07.94	
A	WO-9517965-A (ABBOTT LABORATORIES) 06.07.95	

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
17.10.97

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1