



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 102 966**

② Número de solicitud: 9500230

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/53

G01N 33/569

G01N 33/571

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.02.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.97**

Fecha de concesión: **25.02.98**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.98**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.98

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real-Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Gutierrez Fernández, José y
Maroto Vela, Carmen**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Prueba de laboratorio para detectar los anticuerpos IgG con baja avidéz por el antígeno en el diagnóstico de las primoinfecciones por virus de la rubeola, citomegálico, del herpes simple, del herpes humano tipo 6, del virus de epstein-barr y por toxoplasma gondii.**

㉑ Resumen:

Con este método se consigue la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el transcurso de la infecciones por el virus de la rubeola, herpes simple, citomegálico y *Toxoplasma gondii* (mediante ELISA) y por el virus del herpes humano tipo 6 (mediante inmunofluorescencia), mediante la modificación de pruebas ya comercializadas, para mejorar el diagnóstico de laboratorio de la mismas. Para ello se incorpora una sustancia (Urea 8 molar durante 5 minutos y a 37°C tras la incubación inicial de la muestra de suero), anteriormente no utilizada con este fin en esas pruebas comerciales, para el cálculo, de manera significativa en el diagnóstico, de los anticuerpos IgG de baja avidéz por el antígeno. Porcentajes superiores al 55% de IgG con baja avidéz por el antígeno (mediante ELISA) o reducciones dobles en el título de IgG calculado con urea (mediante inmunofluorescencia) se asocian a primoinfección por ese microorganismo.

ES 2 102 966 B1

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

DESCRIPCION

Prueba de laboratorio para detectar los anticuerpos IgG con baja avidéz por el antígeno en el diagnóstico de las primoinfecciones por virus de la rubeola, citomegálico, del herpes simple, del herpes humano tipo 6, del virus de epstein-barr y por toxoplasma gondii

Objeto de la invención:

Desarrollar un método de laboratorio para investigar los anticuerpos IgG de baja avidéz por el antígeno, en suero, en infecciones por virus de la rubeola, citomegálico, del herpes simple, del herpes humano tipo 6, del virus de Epstein-Barr y por *Toxoplasma gondii*.

Antecedentes:

La cuantificación de la avidéz de los anticuerpos IgG específicos, por técnicas simples, proporciona un nuevo método, sensible y específico, para el diagnóstico serológico y seguimiento de las infecciones, ya que puede ser usado para conocer el momento exacto de la primoinfección y para distinguir entre reactivación, reinfección y primoinfección, por los microorganismos antes citados.

El conjunto de fuerzas que participan en las uniones antígeno-anticuerpo se conocen con el término de avidéz o afinidad funcional. En líneas generales, la afinidad de los anticuerpos IgG es inicialmente baja después del primer contacto antigénico y se incrementa durante las semanas y meses siguientes. Esta "maduración" de la afinidad es producida por procesos de selección de las células B de la sangre, que dan lugar a un incremento de la complementariedad en los sitios de unión del inmunocomplejo y que a su vez es el resultado de los procesos de mutación en la región variable de los anticuerpos IgG (1, 2).

Los anticuerpos IgG sintetizados durante los primeros días tras el contacto antigénico provienen de células plasmáticas no mutadas. Posteriormente se produce un aumento de la afinidad de los anticuerpos IgG por el antígeno sobre el sexto día, debido a hipermutaciones de este tipo de células.

A su vez la maduración de la avidéz está también influenciada por la dosis del antígeno. Dosis bajas de antígeno producen una maduración de la afinidad más rápida y viceversa. Como en los estadios iniciales de una infección hay, presumiblemente, gran cantidad de antígenos, se producirían fundamentalmente anticuerpos de baja avidéz por los mismos (2).

La cuantificación de la avidéz de los anticuerpos IgG en el diagnóstico serológico de enfermedades infecciosas se puede realizar a través de técnicas de aglutinación, RIA, fijación de complemento, ELISA o inmunofluorescencia indirecta. Los ensayos de avidéz requieren la adición de una sustancia desnaturizante; ya sea en la dilución de la muestra (método de dilución principal), o bien, aplicada después de la formación del inmunocomplejo (método de elución principal). Las sustancias desnaturizantes pueden ser dietilamina (inactiva a Ph fisiológico), tiocianato potásico, guanidina o urea. Los resultados de varios estudios indican que el tratamiento con urea 8 Molar para medir la avidéz de los anticuerpos IgG específicos, puede ser el método más sencillo

y eficaz (3,4,5).

En estadios tempranos de primoinfección, el "índice de avidéz" (cociente entre la cantidad de anticuerpos IgG específicos obtenidos después de tratar la muestra con urea y la cantidad de anticuerpos IgG específicos obtenidos sin urea) es bajo, ya que la cantidad de anticuerpos después de tratar con urea u otra sustancia desnaturizante es reducido; pero se incrementan ambos (cantidad de IgG y su avidéz por el antígeno) en la convalecencia, y son altos en las infecciones recurrentes y reactivaciones (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16).

Como conclusión, señalaremos que las técnicas que cuantifican la avidéz de los anticuerpos de clase IgG específicos por el antígeno, pese a no tener una sensibilidad del 100% son, junto a las convencionales serológicas, de gran utilidad y un futuro esperanzador para detectar el momento exacto de la primoinfección y, como posteriormente comentaremos, conocer la probable etiología de un amplio grupo de síndromes infecciosos en los cuales su conocimiento etiológico esta dificultado por la existencia de reactividad antigénica compartida, reacciones heterotípicas o persistencia de anticuerpos IgM.

Explicación de la invención

Para la investigación de la avidéz de los anticuerpos IgG específicos se utiliza un ensayo comercial que se realiza en una ocasión sin sustancia desnaturizante y en otra con sustancia desnaturizante. La sustancia desnaturizante es Urea 8 molar, preparada en tampón de sales de fosfato de Ph 7,2, que es aplicada tras la incubación de una hora de la muestra de suero. Para ello se aspira el suero existente en el pocillo, y se añaden 100 microlitros de dicha sustancia, en el caso de pruebas de ELISA, o se baña el porta en el caso de inmunofluorescencia. Se aplica durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se sigue el proceso normal de la prueba comercial en cuestión. Para conocer la presencia de anticuerpos IgG de baja avidéz antigénica, se sustraen los valores obtenidos mediante ambas formas y se refieren en porcentajes respecto del total de anticuerpos IgG. El ensayo se repite en dos ocasiones, utilizándose el valor medio obtenido, siempre que no hubiera dispersión superior al 10%. Se precisa que hay anticuerpos IgG de baja avidéz por el antígeno, de forma que indique primoinfección por ese patógeno, cuando existen en proporción superior al 55% mediante la prueba de ELISA. Se da un resultado positivo de baja avidéz cuando la reducción del título en la inmunofluorescencia lavada con la sustancia desnaturizante con respecto a la realizada normalmente fue superior a 2 diluciones. Valores inferiores y próximo a este dato requiere un estudio repetido y secuencial para confirmar la normalización de la avidéz de IgG.

Descripción de la invención:

Para ello se emplean los reactivos constituidos por una fase sólida con antígenos, un conjugado de anticuerpos anti-IgG humana total marcados con un enzima que de manera específica actuará sobre un substrato adicionado a la reacción (prueba de ELISA) o marcados con un fluorocromo (prueba de inmunofluorescencia indirecta). Finalmente, en el caso del ELISA, se añade so-

lución de parada de la reacción, antes de la lectura de la misma. Los valores obtenidos se expresan de forma cuantitativa, en el caso de disponer de patrones estándar internacionales, o semicuantitativa en forma de título de la reacción. Simultáneamente, se repite el ensayo adicionando, tras la eliminación de la muestra problema que fue incubada, reactivo de urea, a una concentración 8 Molar, cantidad de 100 microlitros en el caso del ELISA y un baho en el caso de la inmunofluorescencia, y tiempo de 5 minutos, continuando el desarrollo de la prueba de previamente descrita. Una vez finalizado ambos ensayos se procede a sustraer de la cantidad de anticuerpos IgG obtenidos sin urea, la que se obtuvo tras adicionar este reactivo. Se calcula el porcentaje que representa esta cantidad y se precisa si existen o no, de manera significativa, los anticuerpos IgG de baja avidéz, que según nosotros hemos establecido en un valor superior al 55% mediante el ELISA. Se da un resultado positivo de baja avidéz cuando la reducción del título en la inmunofluorescencia lavada con la sustancia desnaturalizante con respecto a la realizada normalmente fue superior a 2 diluciones.

Aplicaciones prácticas:

Determinación de los anticuerpos IgG de baja avidéz anti-virus de la rubeola y anti-Toxoplasma gondii mediante un ensayo de ELISA: para ello se emplean los reactivos elaborados por Sorin BioMédica (Italia). El procedimiento es el siguiente: en el pocillo 1A de la microplaca no se coloca ningún reactivo, ya que se deja reservado para el blanco, que lleva cromógeno y solución de parada cuando se distribuyen para el resto de las muestras de suero. Se deposita por duplicado 100 microlitros de control negativo (diluido 1/5, con solución de tampón), de cada patrón estándar (diluido 1/5) y de cada muestra (diluida 1/500). Los estándares son cuatro, y corresponden respectivamente según se trate de IgG anti-rubeola o de IgG anti-toxoplasma, a las siguientes unidades internacionales (U. I.) por mililitro: estándar 1, 10 y 15 UI; estándar 2, 25 y 30 UI; estándar 3, 50 y 75; estándar 4, 100 y 150 UI. Los controles negativos corresponden con 0 U.I. Estos calibradores están elaborados según la WHO, 1970, en el caso de rubeola y 1980 en el caso de Toxoplasma gondii. Se tapan los pocillos con papel adhesivo y se incuban durante una hora a 37°C, en cámara húmeda. Se lavan 5 veces con solución de lavado. Se distribuyen 100 microlitros de conjugado enzimático (solución de IgG de cabra anti-IgG humana conjugada con la enzima peroxidasa de rábano), diluido 1/50 con una solución de tampón PBS y Tween 20. Se tapan los pocillos y se incuban durante una hora a 37°C con humedad. Se vuelve a lavar de igual forma que antes. Se distribuyen 100 microlitros de substrato. El substrato está constituido por tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos y en oscuridad. Se distribuyen 200 microlitros de solución de parada, constituida por una solución de ácido sulfúrico 1N. Se lee en un espectrofotómetro, a 450 nm usando de referencia 620 nm. Los anticuerpos IgG anti-Toxoplasma gondii y anti-virus de la rubeola se expresan en U.I. por ml, teniendo en cuenta la curva obtenida con los

estándares. Los sueros que por su gran cantidad en anticuerpos IgG específicos sobrepasan las 150 U.I./ml en el caso de Toxoplasma gondii, o de 100 U.I./ml en el caso del virus de la rubeola, se diluyen 1/10 para determinar con exactitud su título. Simultáneamente se repite el ensayo pero con la variante de la adición de la sustancia desnaturalizante a todos los pocillos, excepto los controles y el blanco, durante un tiempo después de que terminara la primera incubación. Para esto se aspira previamente el contenido de los pocillos, y se deja actuar la sustancia desnaturalizante, y posteriormente se efectuaron los 5 lavados pertinentes. La presencia de anticuerpos IgG de baja avidéz fue definida cuando la cantidad de anticuerpos IgG tras tratamiento con la sustancia se redujo un 55% o más.

Determinación de los anticuerpos IgG de baja avidéz anti-virus del herpes simple, citomegálico y Epstein-Barr mediante un ensayo de ELISA. Se emplea los reactivos de un ELISA indirecto de Behringwerke (Alemania), en el cual los pocillos se encuentran recubiertos de antígenos constituidos por fibroblastos humanos infectados por citomegalovirus (cepa Ma 23), células de riñón de mono infectadas por virus herpes simple (cepa Vero), y linfoblastos infectados por VEB (cepa B95-9). Se incluye en la técnica un control antigénico formado por pocillos recubiertos de células no infectadas, para estudiar la reactividad por anticuerpos frente a antígenos celulares.

Se depositan en los dos primeros pocillos y en los dos últimos de la microplaca, 100 microlitros de control positivo de anticuerpos IgG específicos con título conocido, y en el resto 100 microlitros de muestra por duplicado diluida 1/231 y 1/1155, para obtener el punto final de anticuerpos. El diluyente es TRIS, borato sódico, Tween 20, anfotericina y gentamicina. Se incuban en cámara húmeda a 37°C durante una hora. Se lava 5 veces con solución de lavado, añadiéndose 100 microlitros de anti-IgG humana marcada con peroxidasa de rábano y se incuban a 37°C durante una hora, lavándose a continuación 5 veces. Finalmente, se añade 100 microlitros del substrato compuesto por tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno y se incuban la placa 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 100 microlitros de solución de parada (ácido sulfúrico 0.5 N). Se lee a una longitud de onda de 450 nm y 650 nm de referencia. La titulación exacta de los anticuerpos se realiza por el sistema ALFA-MÉTODO desarrollada por Behringwerke. Simultáneamente se realiza otro ensayo similar al anterior pero incorporando la sustancia desnaturalizante en el pocillo, tras la previa extracción del contenido de muestra. Posteriormente se continúa el procedimiento de la misma forma ya descrita. Se considera la presencia de anticuerpos de baja avidéz en la muestra si hubo un descenso del título de anticuerpos de más del 55% en placa con sustancia desnaturalizante con respecto a la muestra procesada normalmente.

Determinación de los anticuerpos IgG de baja avidéz frente virus herpes humano 6 mediante un ensayo de inmunofluorescencia. La determinación de dichos anticuerpos se realiza mediante

el uso de reactivos para Inmunofluorescencia Indirecta de los laboratorios Stellar (Alemania). El procedimiento es: las muestras se diluyen progresivamente, comenzando con una dilución inicial de 1/40. Se depositan 25 microlitros de la dilución en cada porta. Se deja incubar durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente los portas se lavan. Se secan los portas al aire. Se añade 25 microlitros de conjugado compuesto por una anti-IgG de cabra marcada con isotiocianato de fluoresceína. El conjugado se incuba durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Se procede a lavar la preparación así como a su secado al aire. La preparación se monta con aceite de inmersión, colocando posteriormente un cubre y se observa con objetivo 40x en un microscopio de fluorescencia. Se determina que una muestra es positiva si se objetiva fluorescencia positiva en el 50% de las células infectadas, obteniéndose el título de dicha muestra. Simultáneamente se repite la misma inmunofluorescencia, con los mismos reactivos y las muestras a las mismas diluciones; con la variante de la adición, después de la primera incubación, de un lavado con la sustancia desnaturalizante. Se da un resultado positivo de baja avidez cuando la reducción del título en la inmunofluorescencia lavada con la sustancia desnaturalizante con respecto a la realizada normalmente fue superior a 2 diluciones.

Método reivindicado

Se quiere reivindicar un método de laboratorio para el cálculo del porcentaje de anticuerpos IgG que tienen baja avidez por el antígeno que se producen en las primoinfecciones por virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, *Toxoplasma gondii*, virus de la rubeola y virus del herpes humano tipo 6, así como la relación que se establece entre la cantidad de IgG de baja avidez y el diagnóstico de primoinfección por uno de los microorganismos. En el caso de virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr se realiza, simultáneamente, una prueba de ELISA comercial de los laboratorios Behringwerke para el cálculo de los anticuerpos IgG específicos y otra similar a la anterior pero modificada en la siguiente forma: tras la incubación de la muestra de suero durante una hora se aspira del pocillo y se añade manualmente 100 microlitros de urea 8 molar durante 5 minutos a 37°C. A continuación se sigue con el proceso para el cálculo de los anticuerpos IgG según se indica por el laboratorio. El ensayo se repite en dos ocasiones, utilizándose el valor medio obtenido, siempre que no hubiera dispersión superior al 10%. Se calcula de forma manual el porcentaje de IgG con baja avidez:

$$\% \text{ de IgG con baja avidez: } \frac{\text{IgG total} - \text{IgG obtenida con urea}}{\text{IgG total}}$$

Cantidades de IgG de baja avidez superiores al 55% se asocia a primoinfección por ese microorganismo. Es un criterio de primoinfección reciente:

* Niveles de IgG con baja avidez superiores al 55%.

* Si es inferior al 55% y la primoinfección es sos-

pechada, el diagnóstico se puede establecer mediante el estudio secuencial de la IgG de baja avidez hasta la normalización de la misma. En el caso de *Toxoplasma gondii* y virus de la rubeola se realiza, simultáneamente, una prueba de ELISA comercial de los laboratorios Sorin para el cálculo de los anticuerpos IgG específicos y otra similar a la anterior pero modificada en la siguiente forma: tras la incubación de la muestra de suero durante una hora se aspira del pocillo y se añade manualmente 100 microlitros de urea 8 molar durante 5 minutos a 37°C. A continuación se sigue con el proceso para el cálculo de los anticuerpos IgG según se indica por el laboratorio. El ensayo se repite en dos ocasiones, utilizándose el valor medio obtenido, siempre que no hubiera dispersión superior al 10%. Se calcula de forma manual el porcentaje de IgG con baja avidez:

$$\% \text{ de IgG con baja avidez: } \frac{\text{IgG total} - \text{IgG obtenida con urea}}{\text{IgG total}}$$

Cantidades de IgG de baja avidez superiores al 55% se asocia a primoinfección por ese microorganismo. Es un criterio de primoinfección reciente:

* Niveles de IgG con baja avidez superiores al 55%.

* Si es inferior al 55% y la primoinfección es sospechada, el diagnóstico se puede establecer mediante el estudio secuencial de la IgG de baja avidez hasta la normalización de la misma. En el caso del virus de herpes humano tipo 6 se realiza, simultáneamente, una prueba de inmunofluorescencia comercial de los laboratorios Stellar para el cálculo de los anticuerpos IgG específicos y otra similar a la anterior pero modificada en la siguiente forma: tras la incubación de la muestra de suero durante una hora se lava el porta con tampón de sales de fosfato de pH 7,2 durante 5 minutos, se seca al aire y se incuba manualmente en un baño de urea 8 molar durante 5 minutos a 37°C. A continuación se sigue con el proceso para el cálculo de los anticuerpos IgG según se indica por el laboratorio tras el paso de la incubación del suero. Si es inferior al 55% y la primoinfección es sospechada, el diagnóstico se puede establecer mediante el estudio secuencial de la IgG de baja avidez hasta la desaparición de la misma. Se da un resultado positivo de baja avidez cuando la reducción del título en la inmunofluorescencia lavada con la sustancia desnaturalizante con respecto a la realizada normalmente fue superior a 2 diluciones. Si es inferior y la primoinfección es sospechada, el diagnóstico se puede establecer mediante el estudio secuencial de la IgG de baja avidez hasta la desaparición de la misma.

Bibliografía

1. - Steele, E. J., ed. Somatic hypermutation in V-regions. Fl. CRC Press, 1990; 1-185.
2. - Thomas, H. I. J.; Morgan-Capner, P. The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella. *Rev. Med. Virol.*, 1991; 1:41-50.
- 3.- Kangro, H.O.; Manzoor, S.; Harper, D.R. Antibody avidity following varicella-zoster virus infections. *J. Med. Virol.*, 1991; 33:100-105.
- 4.- Schoub, B.D.; Blackburn, N.K.; Jhonson, S.;

McAnerney, J.M.; Miller B. Low antibody avidity in elderly chickenpox patients. *J. Med. Virol.*, 1992; 37:113-115.

5.- Meurman, O.; Waris, M.; Hedman, K. Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30:1479-1484.

6. - Remington, J. S.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of fetus and newborn infant*, 1990; 98-195.

7.- Ades, A.E. Evaluating the sensitivity and predictive value of test of recent infection: toxoplasmosis in pregnancy. *Epidemiol. Infect.*, 1991; 107:527-535.

8.- Hedman, K.; Lappalainen, M.; Mäkelä, O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity specific IgG. *J. Infect. Dis.*, 1989; 159:736-740.

9. - Camargo, M. E.; da Silva, S. M.; Leser, P. G.; Granato, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infeccao primaria recente pelo toxoplasma gondii. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1991; 33:213-218.

10.- Joynson, D.H.M.; Payne, R.A.; Rawal, B.K. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxo-

plasma. *J. Clin. Pathol.*, 1990; 43:1032-1033.

11.- Thomas, H.I.J.; Morgan-Capner, P. Rubeolla-specific IgG subclass avidity Elisa and its role in the differentiation between primary rubeolla and rubeolla reinfection. *Epidemiol. Infect.*; 1988; 101:591-598.

12.- Thomas, H.I.; Morgan-Capner, P. Rubeolla-specific IgG1 avidity in comparison of methods. *J. Virol. Meth.*, 1991; 31:219-228.

13.- Hedman, K.; Seppälä L. Recent rubeolla infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Clin. Immunol.*, 1988; 8:214-221.

14.- Ory, F.; Antonaya, J.; Fernández, V. Echevarría J.M. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31:1669-1671.

15.- Blackburn, N.K.; Besselaar, T.G.; Schoub, B.D.; O'Connell, K.F. Differentiation of primary Citomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J. Med. Virol.*, 1991; 33:6-9.

16. - Hedman, K.; Vaheri, A.; Brumemmer-Korvenkontio, M. Rapid diagnosis of Hantavirus disease with an IgG-avidity assay. *Lancet*, 1991; 338:1353-1356.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección en suero y cálculo de la rentabilidad diagnóstica de los anticuerpos IgG con baja avidéz por el antígeno frente a patógenos infecciosos humanos, esencialmente **caracterizado** porque en el mismo se establecen las siguientes etapas o fases operativas:

1.1. Detección de los anticuerpos IgG específicos mediante una prueba inmunoenzimática o de inmunofluorescencia que permite su cuantificación.

1.1.1. Prueba inmunoenzimática: se trata de un método indirecto que consta de las siguientes fases: adición de la muestra de suero durante, 1 hora, sobre la base antigénica; lavados de la reacción con solución de lavado; adición de la solución de conjugado (anti-IgG humana marcada con peroxidasa) durante 1 hora; lavados de la reacción con solución de lavado; adición de la solución de cromógeno que es degradado y modificado su color por la acción de la peroxidasa; y adición de la solución que detiene la reacción química anterior. Se procede, finalmente, a la lectura espectrofotométrica de la reacción coloreada.

1.1.2. Prueba de inmunofluorescencia: se trata de un método indirecto que consta de las siguientes fases: adición de la muestra de suero, durante 30 minutos, sobre la base antigénica; lavados de la reacción con solución de lavado; adición de la solución de conjugado (anti-IgG humana marcada con fluorocromo) durante 30 minutos; lavados de la reacción con solución de lavado. Se procede, finalmente, a la lectura de la reacción en microscopio de fluorescencia.

1.2. Detección de los anticuerpos IgG específicos mediante una prueba similar a la anterior

pero adicionando urea 8 molar durante 5 minutos tras la incubación de la muestra con el antígeno.

1.3. Sustraer el resultado obtenido en presencia de urea del obtenido cuando no se emplea esta sustancia. El valor resultante se refiere porcentualmente a la cantidad de IgG específica que existe.

1.4. Resultados mayores o iguales al 55 % mediante el método inmunoenzimático se considera primoinfección reciente. En el caso de la inmunofluorescencia, si se obtiene reducciones dobles en el título de IgG calculado con urea, se asocia a primoinfección reciente.

2. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** por la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el diagnóstico de la infección por virus de la Rubeola y sus aplicaciones, mediante enzimoimmunoensayo.

3. Un método según reivindicación 1 **caracterizada** por la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el diagnóstico de la infección por virus Citomegálico y sus aplicaciones, mediante enzimoimmunoensayo.

4. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** por la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el diagnóstico de la infección por virus del herpes simple y sus aplicaciones, mediante enzimoimmunoensayo.

5. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** por la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el diagnóstico de la infección por virus del herpes humano tipo 6 y sus aplicaciones, mediante inmunofluorescencia.

6. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** por la investigación de los anticuerpos IgG de baja avidéz en el diagnóstico de la infección por virus de Epstein-Barr y sus aplicaciones, mediante enzimoimmunoensayo.

7. Un método según reivindicación 1 **caracterizado** por la investigación de los anticuerpos IgG en el diagnóstico de la infección por *T. gondii* y sus aplicaciones, mediante enzimoimmunoensayo.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/53, 33/569, 33/571

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	FERNANDO DE ORY et al. Application of fluoroinmunoassay to the identification of low avidity specific IgG against pathogenic human viruses and Toxoplasma gondii. Clinical and Diagnostic virology 3 (1995), páginas 323-332	
X	FERNANDO DE ORY et al. Application of Low-Avidity Inmunoglobuline 6 Studies to Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infection Mononucleosis. Journal of Clinical Microbiology, June 1993, páginas 1669-1971	1-7
X	FERNANDO DE ORY et al. Application of fluoroinmunoassay to the identification of low avidity specific-IgG against pathogenic human Viruses and Toxoplasma gondii. European Group for rapid viral diagnostics society against virus diseases. Progress in Clinical Virology, Stockholm, Sweden. 14-18.08.1994, página 293	1-7
X	FERNANDO DE ORY. Aplicación de los ensayos de Avidéz de IgG para el Diagnostico de mononucleosis infecciosas por virus Epstein-Barr. III Congreso Nacional de Virologia, Barcelona 21-25.09.92	1-7
A	US-4612281-A (GEORGES DESMONTS, JACK S. REMINGTON) 16.09.86	1-7

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

24.04.97

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1