



REGISTRO DE LA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 026 760

⑫ Número de solicitud: 9002568

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>: C12Q 1/34  
C12Q 1/54

⑭

PATENTE DE INVENCION

A6

⑮ Fecha de presentación: **10.10.90**

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.92**

⑰ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.05.92**

⑱ Titular/es:  
**Universitat Autònoma de Barcelona  
Bellaterra, Barcelona, ES**

⑲ Inventor/es: **Gella Tomás, Francisco J.**

⑳ Agente: **Ponti Grau, Ignacio**

㉑ Título: **Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano.**

㉒ Resumen:

Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, caracterizado porque en una primera fase, se incuba NADasa con el suero humano que contiene la antiNADasa para que interaccionen; en una segunda fase, se determina la actividad NADasa no inhibida por su interacción con antiNADasa mediante su actividad catalítica sobre el NAD; y en una tercera fase, se mide el NAD no hidrolizado por la NADasa utilizando una deshidrogenasa y su correspondiente sustrato. Se aplica en el diagnóstico de infecciones estreptocócicas en humanos.

## DESCRIPCION

Los estreptococos del grupo A son microorganismos capaces de infectar la faringe produciendo típicos síntomas que normalmente desaparecen en pocos días debido a la respuesta inmunológica del individuo infectado o a la administración de antibióticos. En unos pocos casos la infección persiste, infectando otros órganos y originando alteraciones crónicas de mayor gravedad como la fiebre reumática, glomerulonefritis aguda, artritis reumatoide y otras.

Cuando el microorganismo se desarrolla en el individuo infectado produce un gran número de proteínas exocelulares (exoencimas) cuya función no ha sido aclarada en muchos casos. Los principales exoenzimas secretados por el estreptococo son la estreptolisina O, Nicotinamida adenin dinucleótido hidrolasa (NADasa), estreptoquinasa, estreptodornasa e hialuronidasa, aunque se han identificado más de 20 distintos.

El propio microorganismo, así como los exoenzimas que secreta, son reconocidos como extraños por el sistema inmunológico del huésped que, en respuesta, produce anticuerpos específicos.

Los anticuerpos son proteínas que circulan en la sangre del huésped y que son capaces de unirse de forma específica al estreptococo o a los exoenzimas producidos (antígenos). En este último caso existen pues anticuerpos anti - estreptolisina O, anti - NADasa, anti - estreptoquinasa, anti - estreptodornasa, anti - hialuronidasa, etcétera.

El diagnóstico de la infección estreptocócica y de sus complicaciones, puede realizarse mediante el cultivo de frotis faríngeo, aunque en muchos casos resulta negativo sin que por ello pueda descartarse alguna de las complicaciones antes citadas. Es de mayor utilidad la determinación del título de alguno de los anticuerpos específicos frente a los exoenzimas secretados por el estreptococo. Cuando dicho título es superior al considerado normal, debe entenderse que ha existido una infección estreptocócica reciente. La valoración clínica junto con la elevación de los títulos de estos anticuerpos, será la que permita obtener el diagnóstico certero.

Se han descrito procedimientos para poder determinación el título de varios anticuerpos anti - exoenzimas en el suero humano, aunque el más popular sea el de anti -estreptolisina O (ASO). Algunos de estos procedimientos son cuantitativos y otros cualitativos. En este último caso se determina únicamente si el título de anticuerpo en el suero del paciente es superior o no a un nivel considerado límite de normalidad.

La mayor parte de procedimientos cuantitativos conocidos son complejos desde el punto de vista operativo, ya que implican la preparación de una serie de diluciones de la muestra y el ensayo posterior de cada una de las diluciones. La preparación de diluciones ocasiona un importante costo de tiempo al laboratorio y puede ser además fuente de errores.

Otro importante inconveniente de los procedimientos descritos es la dificultad (en muchos casos imposibilidad) de ser automatizados en los modernos analizadores de que disponen los laboratorios clínicos, por lo que este tipo de ensayo de-

ben ser realizados manualmente y al margen de los equipos instrumentales e informatizados del laboratorio. Ello redundaría en la necesidad de ocupar tiempo de técnicas expertos y en un mayor riesgo de errores de todo tipo.

La invención que se describe a continuación describe un procedimiento de ensayo y el correspondiente reactivo para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano mediante un método de inmunoinhibición y colorimétrico, que puede ser fácilmente automatizado.

Esto se consigue mediante un ensayo que consta de tres fases primordiales, aunque pueden reducirse a dos, como se verá más adelante. Las tres fases son (figura 1):

1. Reacción de la antiNADasa con una concentración constante de NADasa. La antiNADasa (anticuerpo) se encuentra en una concentración desconocida en el suero del paciente y la NADasa (antígeno) se obtiene por purificación a partir de un medio donde se ha cultivado estreptococo y se encuentra contenida en un reactivo. Cuando se mezclan e incuban ambos, se produce la reacción antígeno-anticuerpo, resultando una inhibición de la actividad enzimática de la NADasa. La concentración de NADasa no inhibida (remanente) es mayor cuanto mayor sea la concentración de antiNADasa en el suero analizado.

2. Reacción de la NADasa remanente con el Nicotinamida adenin dinucleótido (NAD). Una vez ocurrida la reacción NADasa-antiNADasa, puede determinarse la actividad NADasa remanente por su capacidad de actuar, de forma catalítica, sobre el NAD, hidrolizándolo a nicotinamida y ADP-ribosa. Para ello, se incubaba la mezcla obtenida en la fase 1 con una cantidad apropiada de NAD, durante un tiempo determinado.

3. Medición del NAD. Finalmente, es necesario poder medir el NAD que no ha sido hidrolizado por la NADasa. Ello puede conseguirse mediante alguna reacción catalizada por una deshidrogenasa, que transforman el NAD en NADH, el cual puede medirse fotométricamente al absorber luz a 340 nm. También puede medirse el NAD mediante un sistema cíclico de reacciones como el de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa/diaforasa u otros que están ampliamente descritos y que tienen la ventaja de aumentar extraordinariamente la sensibilidad del ensayo.

En cualquier caso, cuanto mayor es la concentración de NAD no hidrolizado (y por consiguiente, la señal fotométrica), menor es la concentración de NADasa remanente y, por tanto, mayor la concentración de antiNADasa en el suero del paciente. Es decir que existe una relación proporcional y directa entre la señal fotométrica finalmente medida y la concentración del anticuerpo objeto de análisis.

Con objeto de abreviar el procedimiento y facilitar su automatización, es posible realizar las fases 2 y 3 conjuntamente, de tal forma que se determina el NAD no hidrolizado durante un periodo de tiempo en el que la NADasa remanente está también hidrolizando NAD. Para ello es especialmente conveniente, según la invención, emplear un sistema cíclico amplificador, por su gran sensibilidad (figura 2).

Un sistema cíclico amplificador conveniente

para este ensayo, según la presente invención, que permite determinar la concentración de NAD es el basado en las reacciones de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la diaforasa. El primer enzima transforma el NAD y glucosa-6-fosfato en NADII y 6-fosfogluconato. El segundo enzima hace reaccionar el NADH formado con INT para originar un formazón coloreado y NAD. En presencia de exceso de glucosa-6-fosfato e Iodo nitro tetrazolio (INT), el NAD experimenta sucesivos ciclos de reacciones, acumulándose 6-fosfogluconato y formazán. La señal fotométrica que se puede medir es la formación de formazán, de intenso color rojo.

Para aplicar el procedimiento de la invención es necesario obtener en primer lugar el antígeno (NADasa). Esto se consigue cultivando estreptococo A en un medio de cultivo adecuado, que contiene los diversos nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo y que están bien descritos en la literatura. En su crecimiento, el estreptococo secreta exoenzimas entre los que se encuentra la NADasa. Este antígeno se purifica entonces por precipitación con sulfato amónico al 70% a pH 6,5 y con polietilenglicol 6000 al 20% a pH 7,4. La NADasa puede todavía purificarse más por cromatografía en CM-Sepharosa u otra resina de características iónicas semejantes. Aunque resulta conveniente, no es esencial para los propósitos de la invención una purificación tan elevada de la NADasa.

Para la primera fase del procedimiento de ensayo de antiNADasa es necesario mezclar el suero problema con una concentración precisa y constante de NADasa y por ello es necesario valorar la NADasa purificada con objeto de conocer su concentración catalítica. La valoración consiste en incubar a 30°C la NADasa con NAD 1 mmol/l, Tris 50 mmol/l, pH 8,0 durante un tiempo cronometrado. Al cabo de este tiempo se para la reacción y determina el NAD mediante la adición de 9 volúmenes de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 10 U/ml, glucosa-6-fosfato 22 mmol/l. Tris 100 mmol/l, pH 7,8. La mezcla de reacción se lee entonces a 340 nm. A partir de la lectura pueden calcularse las UI/ml de NADasa contenidas en la preparación purificada.

El procedimiento para la determinación de antiNADasa en suero humano se inicia incubando dicho suero con 5 a 45 UI de NADasa por ml de suero. Según la presente invención, se prepara un primer reactivo (REACTIVO A) que contiene entre 0,05 y 2,00 U/ml de NADasa. Para la correcta interacción del antígeno con el anticuerpo, es conveniente incluir también un tampón como el Tris a un pH entre 6 y 8. Pueden también estar presentes en este primer reactivo componentes de la segunda y tercera reacciones, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 a 6 U/ml Iodo nitro tetrazolio (INT) (u otras sales de tetrazolio) 0,5 a 1,0 mmol/l, diaforasa 0,5 a 1,6 U/ml o Cremophor (u otro detergente) 0,5 a 3,0 g/l. Las concentraciones de estos componentes no son tan críticas como la de NADasa, siempre que se encuentren en un exceso suficiente.

Después de unos minutos de incubación, se hace reaccionar la NADasa no inhibida por el anticuerpo con NAD.

En una primera versión del procedimiento, se

incuba la NADasa con NAD 0,05 a 0,50 mmol/l (preferentemente 0,18 mmol/l) durante unos minutos y, a continuación, se añade glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en concentraciones suficientes para transformar todo el NAD en NADH. Finalmente se lee la absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm. Esta lectura es proporcional a la concentración de antiNADasa en el suero del paciente. Según el procedimiento de esta invención, ello se consigue preparando un REACTIVO B que contiene NAD 2 a 6 mmol/l y un tampón como el Tris que mantenga el pH entre 6 y 9, y un REACTIVO C que contiene concentraciones de glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa suficientes para transformar todo el NAD en NADH en un corto periodo de tiempo.

Otras alternativas que no difieren significativamente de la descrita en la invención, son la utilización de otras deshidrogenasa para transformar el NAD en NADH o el acoplamiento de una reacción de reducción de una sal de tetrazolio, para aumentar la sensibilidad.

En una segunda versión del procedimiento, se realiza la incubación de la NADasa con NAD y la medición del NAD simultáneamente. Para ello y según el procedimiento de la invención, se prepara un REACTIVO B que contiene glucosa-6-fosfato 0,15 a 0,80 mol/l, NAD 2 a 40  $\mu$ mol/l y un tampón como el Tris, que mantenga el pH entre 6 y 9. El resto de componentes necesarios para las reacciones, se incluyen en el REACTIVO A, tal como se describió anteriormente. Finalmente se lee la absorbancia de la mezcla de reacción a 500 nm. Esta lectura es proporcional a la concentración de antiNADasa en el suero del paciente.

En lugar de las reacciones descritas para el sistema de amplificación cíclico, pueden utilizarse otras semejantes sin que ello modifiquen esencialmente el presente invento. También pueden utilizarse otras sales de tetrazolio en lugar del INT. El Cremophor EL se utiliza para mantener solubilizado el formazán y pueden ser sustituido por otros detergentes.

Por lo tanto el procedimiento de la invención representa un avance significativo en el estado actual de los métodos para la determinación cuantitativa de anticuerpos frente a los exoenzimas de estreptococo, permitiendo obtener un reactivo para la determinación de antiNADasa en suero humano que puede ser fácilmente automatizado.

La invención también se refiere a la utilización del reactivo obtenido por el procedimiento citado, para el diagnóstico de la infección estreptocócica en humanos.

Los reactivos necesarios para el procedimiento de la invención pueden prepararse como se describe en los siguientes ejemplos no limitativos de procedimiento para la determinación de antiNADasa en suero humano:

Ejemplo 1

El antígeno (NADasa) se obtiene mediante precipitación con sulfato amónico al 70% y pH 6,5 del caldo donde se ha cultivado estreptococo A durante 10 horas. El precipitado se centrifuga y resuspende en tampón fosfatos 5 mmol/l. EDTA 0,5 mmol/l, pH 7,4 y se dializa durante 12 horas frente al mismo tampón. Seguidamente se precipita con polietilenglicol 6000 al 20%. El nuevo

precipitado se centrifuga y se resuspende en el mismo tampón para una concentración final de proteína de 60 g/l. Este concentrado se cromatografía en una columna de CM -Sephara CL-6B equilibrada en el mismo tampón a pH 5,5 y se eluye con un gradiente de NaCl.

Se prepara un REACTIVO A con la siguiente composición: NADasa 0,6 U/ml, Tris 75 mmol/l, pH 7,7.

Se prepara un REACTIVO B con la siguiente composición: NAD 4 mmol/l, Tris 50 mmol/l, pH 8,0.

Se prepara un REACTIVO C con la siguiente composición: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 200 U/ml, glucosa-6-fosfato 400 mmol/l, Tris 50 mmol/l, pH 8,0.

El procedimiento para la determinación de la antiNADasa se realiza, con estos reactivos, de la siguiente forma: Se mezclan 2,0 ml de Reactivo A con 0,1 ml de suero problema y se incuba durante 15 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo se añaden 0,1 ml de Reactivo B y se incuba durante otros 10 minutos a 37°C. Transcurrido este periodo, se añaden 0,1 ml de Reactivo C y se deja la mezcla unos 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lee la absorbencia a 340 nm frente a un blanco en el que se ha sustituido el suero problema por agua.

Ejemplo 2

El antígeno (NADasa) se obtiene tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

Se prepara un REACTIVO A con la siguiente composición: NADasa 0,15 U/ml, glucosa-6 - fosfato deshidrogenasa 3 U/ml, seroalbúmina bovina 0,5 g/l, \*INT 0,5 mmol/l, diaforasa 0,8 U/ml, Cremophor EL 2 g/l, Tris 75 mmol/l, pH

7,7.

Se prepara un REACTIVO B con la siguiente composición: glucosa-6-fosfato 300 mmol/l. NAD 6,4  $\mu$ mol/l. EDTA 0,1 mmol/l, Tris 75 mmol/l, pH 8,0.

El procedimiento para la determinación de la antiNADasa se realiza, con estos reactivos, de la siguiente forma: Se mezclan 2,0 ml de Reactivo A con 0,05 ml de suero problemas y se incuba durante 10 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo se añaden 0,1 ml de Reactivo B y se incuba durante otros 30 minutos a 37°C. Finalmente, se lee la absorbencia a 500 nm frente a un blanco en el que se ha sustituido el suero problema por agua. Ejemplo 3

El antígeno (NADasa) se obtiene tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

Se prepara un REACTIVO A con la siguiente composición: NADasa 0,30 U/ml, glucosa-6 - fosfato deshidrogenasa 6 U/ml, seroalbúmina bovina 0,5 g/l, INT 1,0 mmol/l, diaforasa 1,6 U/ml, Cremophor EL 2 g/l, Tris 75 mmol/l, pH 7,7.

Se prepara un REACTIVO B con la siguiente composición: glucosa-6-fosfato 600 mmol/l NAD 13  $\mu$ mol/l, EDTA 0,1 mmol/l, Tris 75 mmol/l, pH 8,0.

El procedimiento para la determinación de la antiNADasa se realiza, con estos reactivos, de la siguiente forma: Se mezclan 1,0 ml de Reactivo A con 0,04 ml de suero y problema y se incuba durante 10 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo se añaden 0,1 ml de Reactivo B y se incuba durante otros 10 minutos a 37°C. Finalmente, se lee la absorbencia a 500 nm frente a un blanco en el que se ha sustituido el suero problema por agua.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, **caracterizado** porque en una primera fase, se incuba NADasa con el suero humano que contiene la antiNADasa para que interaccionen; en una segunda fase, se determina la actividad NADasa no inhibida por su interacción con antiNADasa mediante su actividad catalítica sobre el NAD; y en una tercera fase, se mide el NAD no hidrolizado por la NADasa utilizando una deshidrogenasa y su correspondiente sustrato.

2. Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la NADasa se obtiene mediante el cultivo de estreptococo  $\beta$ -hemolítico y se purifica mediante precipitación con sulfato amónico al 50-80%, precipitación con polietilenglicol al 15-40% y cromatografía de intercambio iónico a pH ácido.

3. Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la deshidrogenasa es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y su sustrato es la glucosa-6-fosfato.

4. Procedimiento para la determinación cuan-

titativa de antiNADasa en suero humano, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque, de acuerdo con una variante de realización, en una primera fase, se incuba NADasa con el suero humano que contiene la antiNADasa para que interaccionen; y en una segunda fase, se determina simultáneamente: la actividad NADasa no inhibida por su interacción con antiNADasa, y el NAD no hidrolizado, la primera mediante su actividad catalítica sobre el NAD y el segundo mediante un sistema cíclico de reacciones que emplea una deshidrogenasa, su correspondiente sustrato, diaforasa y una sal de tetrazolio.

5. Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la NADasa se obtiene mediante el cultivo de estreptococo  $\beta$ -hemolítico y se purifica mediante precipitación con sulfato amónico al 50-80%, precipitación con polietilenglicol al 15-40% y cromatografía de intercambio iónico a pH ácido.

6. Procedimiento para la determinación cuantitativa de antiNADasa en suero humano, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la deshidrogenasa es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, su sustrato es la glucosa-6-fosfato y la sal de tetrazolio es el cloruro de iodonitrotetrazolio.