

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

49963

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 03.XII.1962 (P 100 212)

Pierwszeństwo: 15.XII.1961 Holandia

Opublikowano: 10.IX.1965

Kl. 30 h, 2/04

MKP A 61 k

23/00

UKB

Twórca wynalazku: Jacobus Polderman

Właściciel patentu: N. V. Organon, Oss (Holandia)

BIBLIOTEKA

Urzędu Patentowego
Państwowej Służby Patentowej (Ludowa)

Sposób wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropin

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropin.

R. Weinbach opisał (Z. Path. Bakt. 22, 1/1959), że erytrocyty traktowane formaliną i taniną są odpowiednimi nośnikami dla antygenów. Erytrocyty z osadzonymi na nich antygenami reagują z odpowiednim obecnym antyserum (przeciw — surowica) tworząc jasnożółty, rozproszony osad (aglutynacja).

Wychodząc z tej zasady L. Wide i C. A. Genzell otrzymali odczyn na ciążę, (Acta Endocrinal 35, 261/1960). Jeżeli stosuje się ludzką kosmówkową gonadotropinę jako antygen, wyżej wymienionej reakcji można zapobiec przez dodanie dodatkowej ilości antygeny do mieszaniny reakcyjnej. Stosując więc mocz ciężarnej kobiety jako antygen łatwo jest stwierdzić ciążę, gdyż przy znacznej ilości kosmówkowej gonadotropiny w tym moczu, wolne erytrocyty osiadają na dnie naczynia reakcyjnego nie jako rozproszony osad, lecz w postaci ciemno-brunatnego pierścienia, co wskazuje na ciążę.

Metodę tę można również stosować przy stawianiu diagnozy zjawisk patologicznych, w którym to przypadku gonadotropiny również występują w moczu, i do oznaczania innych gonadotropin, jak gonadotropin, serum w serum ciężarnych kłacz i gonadotropin przysadkowych w wyciągach przysadki. Te dwa ostatnie oznaczenia są bardzo ważne jeżeli chodzi o selekcję surowego materiału do wytwarzania tych hormonów.

2

Znany sposób wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropiny polega na zmieszaniu korzystnie w próbówce, wodnego roztworu antyserum przeciwko oznaczanej gonadotropinie i wodnej zawiesiny erytrocytów uczulonych tą gonadotropiną. Jako płynną zawiesinę dla erytrocytów można stosować fizjologiczny roztwór soli kuchennej (chloru sodowego) lub buforu fosforanowego. Te same rozpuszczalniki można stosować do antyserum.

Stwierdzono jednakże, że w niektórych przypadkach stosowanie odczynnika wytworzonego w znany sposób prowadzi do fałszywych wniosków, w innych przypadkach wyniki są wątpliwe, zwłaszcza, gdy badania prowadzi się nie nad świeżym moczem.

Stwierdzono, że dotychczasowe oznaczenia prowadziły do fałszywych wniosków, gdy zawartość jonów wapnia w cieczy poddawanej badaniu, była wyższa od normalnej. Zawartość tych jonów w świeżym moczu jest raczej niska rzędu około 0,1 mg/ml, przy całkowitej ilości wapnia około 0,24 mg/ml.

Prawdopodobnie wapń w świeżym moczu jest w znacznym stopniu związany z proteinami, tak że mała ilość pozostałych wolnych jonów wapnia nie może przeszkadzać próbie. Jednakże, gdy mocz pozostawi się na parę dni, zawartość jonów wapnia może wzrosnąć do wartości około 0,2 mg/ml, który to wzrost jest prawdopodobnie spowodowany rozkładem kompleksów wapnia i proteiny. Nadmiar

jonów wapnia powoduje samorzutną aglutynację erytrocytów niezależnie od obecności gonadotropiny kosmówkowej i moczu dodatni (zawierający gonadotropinę kosmówkową) zachowuje się w wyniku jak mocz ujemny (nie zawierający gonadotropiny kosmówkowej).

Stwierdzono, że dokładność oznaczania gonadotropin można znacznie zwiększyć przez wytworzenie odczynnika do ich oznaczania w nowy sposób wprowadzając w jego skład jeden lub kilka związków zdolnych do wiązania jonów wapnia w rozpuszczalny związek kompleksowy. Czynniki wiążące jony wapnia stosuje się w sposobie według wynalazku w takiej ilości, żeby został związany nadmiar jonów wapnia. Nadmiar czynnika wiążącego nie wpływa na oznaczenie gonadotropiny.

Wytworzony sposobem według wynalazku odczynnik może być stosowany do jakościowego i ilościowego oznaczania gonadotropin w moczu kobiet ciężarnych, w serum ciężarnych klaczy i w wyciągach przysadki.

Sposób wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropiny według wynalazku, polega na tym, że w próbówce miesza się wodny roztwór antyserum przeciwko gonadotropinie i wodną zawiesinę erytrocytów uczulonych tą gonadotropiną i do jednego z tych składników, dodaje się czynnika chelatującego odpowiedniego do wiązania jonów wapnia, występujących w badanej cieczy.

Obydwa składniki odczynnika stosuje się korzystnie w postaci zliofilizowanej, a czynnik chelatujący w wodnym roztworze lub zliofilizowany razem z jednym ze składników.

Wnioski dotyczące obecności lub nieobecności gonadotropiny wyciągnięte z oznaczeń za pomocą odczynnika wytworzonego sposobem według wynalazku, są zawsze pewne we wszystkich tych przypadkach, gdy wyniki otrzymane znanymi metodami były fałszywe lub niepewne. W zależności od ilości stosowanego antyserum można łatwo stwierdzić ilość około 100 jednostek kosmówkowej gonadotropiny na litr moczu i więcej. Ponadto można obecnie przeprowadzić dokładne oznaczenia w moczu przechowywanym przez pewien czas, co dotychczas nie było możliwe. Dalszą korzyść stosowania sposobu według wynalazku stanowi to, że dodanie czynnika chelatującego do mieszaniny reakcyjnej powoduje związanie występującego w badanej cieczy cynku, który również może przeszkadzać w oznaczeniu.

Przykładami czynnika wiążącego jony wapnia są: kwas etylenodwuaminoczworowocowy, kwas cytrynowy, kwas winowy, kwas glukoronowy, kwas cukrowy i odpowiednie sole tych kwasów, np. sole metali alkalicznych, sole amonowe i podstawione sole amonowe, glikole, polietylenowe i poliaminokarboksylany, oraz pochodne kwasu etylenodwuaminoczworowocowego jak kwas metyloaminodwuocowy, kwas (2-karboksyfenylo) — iminodwuocowy, kwas uramilo — N, N — dwuocowy, kwas nitrylotrójocowy i ich odpowiednie sole. Korzystnie jednak stosuje się kwas etylenodwuaminoczworowocowy, kwas cytrynowy i ich sole metalu alkalicznego i amonowe.

Przykładowo w sposobie według wynalazku stosuje się czynnik wiążący jony wapnia w ilości 0,2% wagowo w stosunku do 0,4 ml roztworu antyserum w buforze fosforanowym. W praktyce we wszystkich przypadkach ta ilość jest w zupełności wystarczająca do wiązania wapnia, znajdującego się w moczu. Bufor fosforanowy można wytworzyć np. przez rozpuszczenie 2,9 g fosforanu jedno-potasowego, 9,6 g fosforanu sodu i 4,5 g chlorku sodowego w destylowanej wodzie i uzupełnienie wodą do 1 litra objętości.

Można również stosować bufor cytrynianowy zamiast fosforanowego, który może równocześnie służyć jako czynnik wiążący jony wapnia. Przeprowadzono różne liczne badania porównawcze z próbkami moczu, o którym wiadano napewno, że jest dodatni. W zależności od czasu przechowywania moczu i temperatury, w której był przechowywany, stosując odczynnik wytworzony znaną metodą otrzymano w 5—10% przypadków wątpliwe lub ujemne wyniki. Wszystkie te same próbki badano znowu stosując odczynnik wytworzony sposobem według wynalazku, przy czym próbki wątpliwe i rzekomo ujemne, dały wyniki pewne i dodatnie.

Następujące przykłady wyjaśniają sposób wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropiny.

Przykład I. Wytwarza się roztwór buforowy, zawierający następujące związki w 1 litrze:

2,88 g fosforanu jednopotasowego
9,62 g fosforanu dwupotasowego
4,5 g chlorku sodowego.

Do tego roztworu dodaje się 2,0 g dwusodowej soli kwasu etylenodwuaminoczworowocowego.

Następnie wytwarza się w tym roztworze buforowym roztwór liofilizowanego antyserum w ilości 0,05% wagowo, poczym 0,4 ml roztworu antyserum dodaje się do liofilizowanej zawiesiny erytrocytów uczulonych ludzką kosmówkową gonadotropiną, zawierającej 1% objętościowo erytrocytów w 0,25 ml destylowanej wody. Otrzymaną mieszaninę można stosować jako odczynnik do określania ciąży. W tym celu do odczynnika dodaje się 0,1 ml badanego moczu.

Przykład II. 0,5 g antyserum rozpuszcza się w 100 ml buforu cytrynianowego, zawierającego 11,13 g kwasu cytrynowego i 8,53 g wodorotlenku potasowego na 1 litr. Po rozdzieleniu w równych ilościach na 100 fiolek, roztwór liofilizuje się. Przed rozpoczęciem oznaczenia dodaje się do każdej fiołki po 10 ml destylowanej wody, po czym 0,4 ml tego roztworu dodaje się do liofilizowanej 1%-wej objętościowo zawiesiny uczulonych erytrocytów, w 0,25 ml destylowanej wody. Tym odczynnikiem prowadzi się oznaczenie.

Przykład III. 10 ml zawiesiny o stężeniu 10% objętościowych erytrocytów uczulonych gonadotropiną, zawieszona w 33 ml destylowanej wody, zawierającej 0,9% chlorku sodowego i 2% wagowych surowicy królika, podczas dodawania 66,7 mg soli dwusodowej kwasu etylenodwuaminoczworowocowego. Następnie 0,05 ml tej zawiesiny

dodaje się do roztworu buforowego, podanego w przykładzie I. Otrzymana mieszanina jest odpowiednim odczynnikiem do oznaczania gonadotropiny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania odczynnika do oznaczania gonadotropin przez zmieszanie wodnego roztworu antyserum przeciwko gonadotropinie i wodnej zawiesiny erytrocytów uczulonych na tę gonadotropinę, **znamienny tym**, że do jednego z tych składników dodaje się czynnika chelatującego, odpowiedniego do związania jonów wapnia występujących w badanej cieczy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że czynnik chelatujący dodaje się do wodnego roztworu antyserum przeciw gonadotropinie, po czym, jeżeli to jest pożądane, roztwór liofilizuje się.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że czynnik chelatujący dodaje się do wodnej zawiesiny erytrocytów uczulonych gonadotropiną, po czym o ile to jest pożądane, roztwór liofilizuje się.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że jako czynnik chelatujący stosuje się kwas etylenodwuaminoczterooctowy, kwas cytrynowy lub sole tych kwasów z metalem alkalicznym albo amonowe.