



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 58566

C (45) Patentti jätetty 10.10.1981
Patent meddelat

(51) Kv. Ik. ³/Int. Cl. ³ G 01 N 33/54

(21) Patentihakemus — Patentansökan	790598
(22) Hakomispäivä — Ansökningsdag	22.02.79
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	22.02.79
(41) Tulut julkiseksi — Blivt offentlig	23.08.80
(44) Nähdävalokuvan ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.10.80
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	

(71) Orion-yhtymä Oy, Nilsiaankatu 10-14, 00510 Helsinki 51, Suomi-Finland(FI)

(72) Pertti Ilkka Väänänen, Helsinki, Suomi-Finland(FI)

(74) Fermion Oy, patenttiosasto

(54) Parannettu menetelmä valmistaa indikaattorijärjestelmä antigeeni-vasta-ainereaktioiden määrittämiseksi geelissä tapahtuvan hemolyysin avulla -
Förbättrat förfarande att framställa indikatorsystem för bestämning av antigen-antikroppsreaktioner med hjälp av hemolys i gel

Keksinnön tarkoituksena on esittää parannettu menetelmä valmistaa indikaattorijärjestelmä antigeeni-vasta-ainereaktioiden määrittämiseksi geelissä tapahtuvan hemolyysin avulla.

Hemolyysiä geelissä eli HIG-menetelmää käytetään sairaaloissa ja laboratorioissa osoittamaan, että jokin henkilö sairastaa tai on sairastanut tiettyä tautia. HIG-menetelmällä osoitetaan tällöin, että hankilön veressä tai seerumissa on kyseisen taudinaiheuttajan eli antigeenin vasta-ainetta. Tätä HIG-menetelmää voidaan myös käyttää tietyn antigeenin identifioimiseen tunnetulla vasta-aineella.

HIG-menetelmissä käytetään tietyissä puskurimiljöössä valmistettua agarosilevyä eli -geeliä, joka sisältää erytrosyyttejä, joihin on sidottu antigeeneja tai vasta-aineita. Erytrosyyttien ja antigeenien tai vasta-aineiden välinen sidos voidaan vielä vahvistaa kemiallisilla aineilla kuten kromitrikloridilla. Geeli sisältää myös komplementtia.

Tutkittava näyte, esimerkiksi seerumi, lisätään agarosigeelissä olevaan kuoppaan ja inkuboidaan. Levyllä tapahtuva hemolyysi kuopan ympärillä osoittaa, että tutkittava näyte sisältää määritettävää antigeenia tai vasta-ainetta. Hemolyysi perustuu seuraavaan mekanismiin. Tutkittavassa näytteessä oleva vasta-aine tai antigeeni reagoi agarlevyssä olevan antigeenin tai vasta-aineen kanssa ja herkistää komplementin, jolloin erytrosyytit hajoavat eli tapahtuu hemolyysiä.

HIG-menetelmään perustuvia indikaattorijärjestelmiä on kuvattu esimerkiksi saman hakijan aikaisemmassa ruotsalaisessa patenttihakemuksessa SE 7608297, Wellcome Foundation'in patenttijulkaisussa DE 2532283 sekä julkaisussa Schildt et al. Intern. Symp. on Immunity to Infections of Respiratory Systems in Man and Animals. Develop. Biol. Standard, vol. 28 ss. 253-272. Edellä mainituissa julkaisuissa kuvatuissa indikaattorijärjestelmissä komplementti on mukana geelissä. Tällöin agarlevyn säilyvyys on rajattu eli korkeintaan 3-4 viikkoa. Jos komplementti jätetään pois ja lisätään vasta kuten esillä olevassa keksinnössä levyä käytettäessä, indikaattorijärjestelmän säilyvyyttä voidaan lisätä 3-4 kuukauteen.

Skaug et al. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B vol. 83, ss. 367-372 ja Strannegård et al. J. Clin. Microbiol. vol. 1 (6), ss. 491-494 ovat esittäneet menetelmän, jossa komplementtiliuos kaadetaan levyn päälle. Skaug'in menetelmää käytettäessä lisätään ensin tutkittava näyte ja inkuboidaan muutama tunti. Tämän jälkeen kaadetaan komplementtiliuosta levyille ja inkuboidaan jälleen 20 tuntia. Strannegårdin menetelmässä inkubointiajat ovat vastaavasti 7-24 tuntia seerumin ja noin kaksi tuntia komplementin kanssa. Kun komplementtia lisätään liuoksena, sen tasainen levittäminen geelille, joka usein on reunoilta koholla, on hankalaa ja hemolyysirenkaat voivat tämän johdosta olla epätasaisia, mikä vuorostaan vaikeuttaa hemolyysirenkaiden läpimitan mittaamista. Tämän lisäksi kaksi eri inkubointia pitkittää tulosten saantia.

Yllä mainittujen haittojen poistamiseksi on kehitetty keksinnön mukainen, nopea, luotettava ja pitemmän säilyvyyden omaava indikaattorijärjestelmä ja menetelmä tämän indikaattorijärjestelmän valmistamiseksi.

Keksinnön mukaisessa järjestelmässä valmistetaan tietyssä puskurimiljöössä agarosilevy, joka sisältää pelkästään erytrosyyttejä ja näihin kiinnitettyjä antigeeneja tai vasta-aineita, mikä sidos voidaan vielä vahvistaa kemiallisella aineella kuten kromitrikloridilla. Indikaattorijärjestelmään kuuluva komplementti imeytetään kastamalla sopivan huokoskoon $0.5-5\text{ }\mu\text{m}$, edullisimmin $1.2\text{ }\mu\text{m}$, omaava kalvo komplementtiliuokseen ja kuivaamalla kalvo. Kalvomateriaalina voidaan käyttää erilaisia selluloosaesteriseoksia tai selluloosatriasetaatia. Imeytetty kalvo kylmäkuivataan ja säilytetään $+4^{\circ}-6^{\circ}\text{C}$:ssa ja käytetään tarvittaessa.

Vaihtoehtoisesti komplementti voidaan imeyttää imupaperilevyyn. Kalvomateriaali on kuitenkin helpommin vakioitavissa ja komplementti leviää siitä tasaisemmin kuin imupaperista.

Keksinnön mukaista järjestelmää käytettäessä tutkittava näyte lisätään levyille ja inkuboidaan tunti. Tämän jälkeen asetetaan komplementtia sisältävä kalvo levyille ja inkuboidaan. Hemolyysirenkaat ovat tasaiset ja niitä on helppo mitata valkoista kalvoa vastaan.

Keksinnön mukaista järjestelmää on helppo käyttää. Ei tarvita erikoiskoulutettua henkilökuntaa eikä erikoislaboratorioita. Järjestelmää voidaan käyttää siellä missä sitä tarvitaan kuten sairaaloissa ja terveyskeskuksissa. Testin suoritus on nopeaa ja tulosten lukeminen yksinkertaista ja selvää.

Indikaattorijärjestelmän säilyvyyden parantuminen merkitsee sitä, että levyjä voidaan valmistaa suuremmissa erissä ja varastoida. Tämä helpottaa järjestelmän teollista valmistusta ja jakelua. Jos säilyvyys on huono, levyt on valmistettava juuri ennen käyttöä ja lisäksi on järjestettävä erikoiskuljetuksia. Parempi säilyvyys takaa myös sen, että käyttäjät, jotka harvemmin tarvitsevat järjestelmää, voivat hyödyntää sitä. Yllä mainitut seikat osoittavat, että tällaisella paremman säilyvyyden omaavalla indikaattorijärjestelmällä on suuri teknillinen ja taloudellinen merkitys.

Keksintöä valoitetaan seuraavilla influenssaa, sikotautia ja vihurirokkoa koskevilla suoritus-esimerkeillä:

Esimerkki 1HIG-levyn valmistaminen influenssavirusantigeeneilla

a) Levyn valmistaminen

Sekoitetaan koeputkessa 0.5 ml kukon punasoluja, 0.5 ml influenssaviruspitoista allantoisnestettä, jonka hemagglutinaatiotitteri on 640 HAU/ml sekä 0.5 ml 0.1 % $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.15 M NaCl:ssä.

Viiden minuutin kuluttua lisätään 30 ml 0.05 M fosfaattipuskuria pH 7.2, jossa on 0.15 M NaCl, 0.003 M CaCl_2 ja 0.001 M MgCl_2 sekä 0.2 % naudan albumiinia.

Sentrifugoidaan ja solut pestään vielä kerran samalla puskurilla. Tämän jälkeen sentrifugoidaan ja solupakka suspensoidaan 10 %:ksi edellä mainittuun puskuriin ilman naudan albumiinia.

Sekoitetaan 0.6 g agaroosia 39 ml:aan 0.05 M fosfaattipuskuriin pH 7.2, jossa on 0.15 M NaCl ja kuumennetaan vesihauteella, kunnes agaroosi on sulanut. Jäähdytetään agaroosi 43°C:een ja lisätään siihen edellä valmistettu 10 %:nen soluerä (5 ml). Välittömästi valetaan agaroosipunasoluseoksesta esim. 7.5 ml muovilevylle, jossa on 1.5 mm syvä ja 6 x 8 cm:n kokoinen syvennys. Kun agaroosi on jähmettynyt, stanssataan siihen Ø 2 mm:n reikiä seeruminäytteitä varten.

b) Komplementtikalvon valmistaminen

Komplementti (marsun seerumi) laimennetaan 1:3 0.05 M fosfaattipuskurilla pH 7.2, jossa on 0.15 M NaCl.

1.2 µm:n huokoskoolla varustetusta membraanisuo datinkalvosta, joka on valmistettu selluloosaesteriseoksesta, leikataan 6 x 8 cm:n kokoisia paloja, jotka asetetaan vuorollaan kellumaan komplementtiliuoksen päälle. Imettyään komplementin (n. 0.7 ml/pala) kalvo asetetaan teräsalustalle, jolla se siirretään kylmäkuivuriin. Kylmäkuivatut kalvot voidaan säilyttää esim. kuumasaumatussa muovipussissa jääkaapissa.

c) Käyttö

HIG-levyn kuoppaan tiputetaan seerumia 5 μ l ja annetaan diffundoitua 1 tunti. Sen jälkeen asetetaan komplementtikalvo agaroosin pinnalle ja suljetaan levyn kansi jälleen. Inkuboidaan 18 tuntia 37°C lämpökaapissa, jonka jälkeen mitataan kuopan ympärille muodostunut hemolyysirengas, joka erottuu helposti levyn takaa valkoista kalvoa vasten. Hemolyysirenkaan läpimitta on suhteessa näytteen vasta-ainepitoisuuteen.

Esimerkki 2HIG-levy vihurirokko vasta-ainemääritykseen

Levyt valmistetaan kuten esimerkissä 1 a), mutta influenssa-antigeenin tilalla on rubellaviruskasvatusnestettä, jonka hemagglutinaatiotiitteri on 512 HAU/ml.

Komplementtikalvon valmistamiseen voidaan käyttää myös 1.2 μ m huokoskoon omaavaa selluloosatriasettaattikalvoa, joka käsitellään kuten esimerkissä 1. Tämä kalvo ottaa itseensä noin 0.85 ml komplementtiä.

Käytetään esimerkissä 1 c) kuvatulla tavalla.

Esimerkki 3HIG-levy sikotautivasta-ainemääritykseen

HIG-levy valmistetaan esimerkin 1 a) mukaisesti, mutta influenssa-antigeenin tilalla on sikotautivirusta sisältävää allantoisnestettä, jonka hemagglutinaatiotiitteri on 640 HAU/ml.

Komplementtikalvona voi myös käyttää 0.8 μ m:n huokoskoolla olevaa selluloosaesteriseoksesta valmistettua membraanisuodatuskalvoa. Tämä kalvo imee itseensä komplementtiä noin 0.65 ml.

Käytetään esimerkissä 1 c) kuvatulla tavalla.

Patenttivaatimukset

1. Parannettu menetelmä valmistaa indikaattorijärjestelmä antigeeni-vasta-ainereaktioiden määrittämiseksi geelissä tapahtuvan hemolyysin avulla, t u n n e t t u siitä, että indikaattorijärjestelmään kuuluva komplementti kiinnitetään erilliseen kalvoon ja kylmäkuivataan.
2. Vaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvona käytetään selluloosaesteriseoksia tai selluloosatriasetaatia.
3. Vaatimusten 1-2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvon huokoskoko on 0,5-5 μm .
4. Vaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalvon huokoskoko on 1,2 μm .

Patentkrav

1. Förbättrat förfarande att framställa ett indikatorsystem för bestämning av reaktioner mellan antigener och antikroppar med hjälp av hemolys i gel, k ä n n e t e c k n a t av att indikatorsystemets komplement fästes vid en separat membran och lyofiliseras.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att membranen består av celluloosaesterblandningar eller cellulosatriacetat.
3. Förfarande enligt patentkrav 1-2, k ä n n e t e c k n a t av att membranens porer är av storleken 0,5-5 μm .
4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t av att membranens porer är av storleken 1,2 μm .

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 532 283 (G 01 N 33/16).