

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 159175 B

(21) Patentansøgning nr.: 1059/84

(22) Indleveringsdag: 27 feb 1984

(41) Alm. tilgængelig: 08 okt 1984

(44) Fremlagt: 10 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 07 apr 1983 US 483055

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/544
G 01 N 33/52
G 01 N 31/22

(71) Ansøger: *Microbiological Associates, Inc.; 5221 River Road; Bethesda; Maryland 20816, US

(72) Opfinder: Richard A. *Harte; US, Anthony B. *Chen; US, Nancy B. *Kaufman; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Materiale til fluorescensimmunbestemmelse af biologiske væsker

(56) Fremdragne publikationer

DE off. g. skrift nr. 2733380, 2849995
DE pat. nr. 2605004
US pat. nr. 4061466

(57) Sammen drag:

1059-84

Der beskrives et substrat til fluorimmunbestemmelse omfattende et kvældbart, rehydratiserbart, polymert proteinbindende materiale, som danner en tredimensional grundmasse, partikelformede, ikke-specifikke lysspredende centre fordelt i den polymere grundmasse, og som er i stand til at sprede synligt lys, og partikelformede, specifikke lysspredende centre fordelt i den polymere grundmasse, og som er i stand til at reflektere specifikt fluorescerende, stimulerende lys og absorbere uspecifikt lys. Substratet binder effektivt proteiner og forøger transmitteret fluorescerende lys og forøger således følsomheden af bestemmelser, der indebærer fluorescensmålinger.

DK 159175 B

Den foreliggende opfindelse angår et materiale til fluorescensimmunbestemmelse af biologiske væsker, med et kvældbart, rehydratiserbart polymert proteinbindende materiale, som danner en tredimensional grundmasse.

5

Et sådant materiale er kendt fra DE-OS 26 03 004. I den deri beskrevne porøse polyvinylchloridgrundmasse er indlejret finkornet siliciumdioxid.

10

Også US-PS 4.061.466 beskriver et sådant materiale, hvori der dog er immobiliseret et biologisk aktivt makromolekulært stof.

15

DE-OS 28 47 995 beskriver som substratmateriale et på bærerlegemet anbragt lag af syntetisk polymert materiale og på laget afsat dobbelthelix-DNS. Anvendelsen af acrylcopolymere som substratmateriale er kendt fra DE-OS 27 33 380 og fra ovennævnte US-PS 4.061.466.

20

Fluorescensbestemmelse er en virkningsfuld teknik til at påvise små mængder af stoffer i en kompleks blanding. Den er særligt nyttig til fluorescensimmunbestemmelse (FIA) af legemsvæsker såsom blod, hvor der skal påvises små mængder af et antigen og antistoffer, som genkender det.

25

FIA er nyttig til diagnose af en sygdom, når den er specifik for et særligt antigen eller antistof, der er karakteristisk for sygdommen. For at give en pålidelig diagnose skal FIA imidlertid også være ikke blot specifik, men også meget følsom, fordi stoffet, der skal påvises, ofte findes i meget små mængder i væsken, der skal analyseres.

30

Tidligere forsøg på at forøge følsomheden af FIA indbefatter udviklingen eller brugen af substrater, der selektivt binder proteiner. Disse substrater kan være immobiliseret på faste overflader, således at immunreaktionen mellem antigen og antistof lettere kan iagttages.

35

Da FIA indebærer påvisning af lys udsendt af en særlig fluorofor, afhænger følsomheden også af intensiteten af det således udsendte lys og dets relation til baggrunden eller spredt lys. Valg af en indfaldende bølgelængde, der passer til stimuleringsfrekvensen af fluorofor, er en vigtig faktor til forøgelse af følsomheden. Harte m.fl. i amerikansk patent nr. 4.340.564 beskriver et fastfase-immunsubstrat, der omfatter en overbelægning af polymere perler med lysspredende centre og bindemidler, som forøger spredt lys. Andre måder til at forbedre substrater og forøge mængden af transmitteret lys er blevet søgt (se f.eks. amerikansk patent nr. 4.258.002).

Materialet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved (1) partikelformede ikke-specifikke lysspredende centre fordelt i den polymere grundmasse, og som er i stand til at sprede synligt lys, og (2) partikelformede specifikke lysspredende centre fordelt i den polymere grundmasse, der er i stand til at reflektere specifikt fluorescerende stimuleringslys og absorbere uspecifikt lys.

De partikelformede, ikke-specifikke lysspredende centre i materialet forøger følsomheden af fluorescensimmunbestemmelse med materialet ifølge opfindelsen ved at sprede både indfaldende synligt lys og emitteret fluorescerende lys.

I det optiske fluorescensimmunbestemmelsseskema bærer antigenet eller antistoffet et fluorescerende farvestofmolekyle som et identificerende mærke, idet dette farvestofmolekyle bliver anslået med bølgelængder af lys, som passer til farvestoffets lysabsorberende spektrum. Når farvestofmolekylet absorberer en foton af lys inden for dets specifikke stimuleringscentrum, hæves en elektron til en højere energitilstand, og en foton med mindre energi (længere bølgelængde) bliver derefter genudsendt. En specifik lysspreder i forbindelse med fluorescens ville fremme overføring af sådant lys til en detektor. Sådanne partikler ville imidlertid også absorbere og derfor slukke det oprindelige stimulerende lys og derved gøre det umuligt at

anslå farvestoffet. De uspecifikke lysspredere ifølge den foreliggende opfindelse er derfor valgt således, at de er uspecifikke for ikke at absorbere det stimulerende lys, men stadig være i stand til at sprede det udsendte fluorescerende lys fra farvestoffet.

De specifikke lysspredende centre i materialet spreder kun det snævre bånd af lys, som svarer til farvestoffets fluorescerende stimuleringsbølgelængde. Disse specifikke lysspredere er pigmenter, hvis lysspredende spektrum passer til det lysabsorberende spektrum af det fluorescerende farvestof. Overføring af indfaldende lys, der har bølgelængder inden for dette spektrale område, som stimulerer det fluorescerende mærke, forøges derved. På et eller andet tidspunkt absorberes generende baggrundslys med anden bølgelængde og slukkes derved af disse specifikke lysspredere. Da overføringen af fluorescerende lys forøges, medens baggrundslys reduceres af disse specifikke lysspredere, forbedres følsomheden af FIA med materialet ifølge den foreliggende opfindelse.

Det proteinbindende polymere materiale er fortrinsvis en acrylcopolymer, f.eks. især en emulsion på vandbasis af en acrylpolymerharpiks.

De uspecifikke lysspredende partikelformede centre er fortrinsvis partikler af zinkoxid eller titandioxid (fortrinsvis i rutil-formen), enten hver for sig eller kombineret. I almindelighed kan de uspecifikke lysspredende partikler dog være uorganiske, såsom anatas- eller rutilformerne af titandioxid, zinkoxid, calciumcarbonat, eller de kan hidrøre fra ler, såsom kaolin (porcelænsler), bentonit eller Fuller-jord, eller de kan være af organisk oprindelse, såsom stivelser. Disse lysspredere er partikelformede, er ensartet fordelt og spreder alt lys effektivt.

De specifikke lysspredende centre er også partikelformede, tilfældigt fordelt i den proteinbindende polymere latex og er

fortrinsvis en pigmenteret forbindelse med specifik ønskelig spektralreflektans. Mest foretrukket er et metallisk phthalocyaninsalt, kobber-phthalocyanin; f.eks. er phthalocyaninforbindelsen (ofte omtalt som "pigmentet") en specifik absorber af lys, hvis spektrale spredningsfordeling er afpasset til stimuleringspektret for det anvendte fluorescerende farvestof og reducerer således eventuelt lys af uønsket bølgelængde, hvad enten det skyldes autofluorescens eller baggrundsspredning. Når man således anvender fluoresceinisoethioscyanat (FITC) som det farvestof, hvis spektrale absorbanstop er i det "blå" område af spektret ved 470 nanometer, vil man anvende partikler af kobberphthalocyanin, hvis spektrale reflektans eller spredning er påvist at være optimal ved 470 nanometer. Hvis det anvendte farvestof er et rhodaminderivat, som absorberer i det "grønne" område af spektret og fluorescerer i det "orange" område af spektret, skal man anvende det passende pigment til at maksimere spredning ved ca. 530 nanometer bølgelængde.

Det foretrækkes at anvende uspecifikke lysspredende centre i et vægtforhold på ca. 30:1 i forhold til de specifikke lysspredende centre.

I foretrukne udførelsesformer ifølge opfindelsen findes det immunadsorptive materiale i kombination med en fast bærer. Mere foretrukket omfatter den faste bærer en i det væsentlige flad overflade, f.eks. overfladen af en prøveglasplade. Mest foretrukket findes det immunadsorptive materiale som et forholdsvis tykt lag (40 - 50 mikron i dybden) på den i det væsentlige flade bund af prøvefordybninger i den faste bærer. Prøvefordybningerne er fortrinsvis af cirkulær dimension med stejlt skrånende vægge.

Det immunadsorptive materiale ifølge opfindelsen kan desuden omfatte et immunogent reagens, enten antigen eller antistof. Materialet i disse udførelsesformer er særligt nyttigt til analyse af blod eller andre legemsvæsker for immunogene rea-

genser, der er karakteristiske for en sygdom, især de der forårsages af virale bakterielle eller parasitiske infektioner. Eksempler herpå er: katteleukæmivirus, katteinfektøs peritonitis, toxoplasmose, katteinfektøs anæmi, hjerteorm, hundebrucellosis, hundeparvovirus, antinukleare antistoffer, reumatoid faktor og hundesyge, diagnose af heste og beslægtede dyr for hesteinfektøs anæmi, hestesvangerskab, kværke, hestepneumonitis, hestemetritis og hesteinfluenza, virale programmer for laboratoriemus og -rotter, oksebrucellosis, fuglesygdomme, herunder Newcastle's sygdomsvirus, psittacosis og leukosis, sygdomme hos svin såsom trichinosis, gastroenteritis, pseudo-rabies og afrikansk svinefeber.

Endvidere er mængdebestemmelser af IgG, IgA, IgM og IgE, serumproteinkomponenter af komplementærsystemet og andre serumproteiner mulig.

Det proteinbindende immunsubstrat kan fremstilles ved at blande et acrylcopolymermateriale omfattende 50% harpiks og 50% vand ved en pH-værdi på ca. 8 - 9 (bestanddel A) med en emulsion af acrylcopolymer og vand blandet med en suspension af titandioxid og zinkoxid (bestanddel B) og en emulsion af acrylcopolymer og vand blandet med en suspension af titandioxid og kobberphthalocyanin (bestanddel C). Bestanddel B kan desuden omfatte et strømningsfremmende middel, f.eks. en tallesterharpiks. Fortrinsvis omfatter bestanddel B ca. 3 - 5% tallesterharpiks. Bestanddelene kombineres fortrinsvis i forholdet A:B:C = 2,5:2,5:1 og fortyndes før brugen i 5 dele destilleret vand.

Acrylcopolymeren kan være afledt af methacrylsyre eller polymethylmethacrylat eller copolymere af kombinationer deraf.

Materialet kan også være afledt af vinylacetater og -derivater eller af butadien-styren og copolymere af disse med andre polymere. Det kan være et epoxypolymermateriale, vinylchloridmateriale eller copolymer af de monomere komponenter af vilkårlige to eller flere af de ovennævnte.

Harpiksen i bestanddelene A, B og C er fortrinsvis i perleform, hvor perlerne har en diameter fra 0,1 til 1,0 mikron, fortrinsvis ca. 0,2 mikron. Oxiderne i bestanddelene B og C er partikler, der er valgt til at være ca. af størrelse som
5 havldelen af bølgelængden af lys, som rettes mod prøven. Til flourbestemmelser ifølge den foreliggende opfindelse er partiklerne f.eks. fortrinsvis ca. 0,2 mikron. Phthalocyaninforbindelserne, der er tilfældigt fordelt i den polymere grundmasse, er i almindelighed mindre end 0,1 mikron og er for-
10 trinsvis mellem 0,05 og 0,1 mikron.

En foretrukket udførelsesform omfatter FITC som farvestofmærket og kobberphthalocyanin som den spredende pigmentpartikel. Optimalt størrelsesvalg af partiklerne er baseret på spredningsteorien og indicerer, at optimal spredning sker, når partikeldiameteren er ca. halvdelen af lysets bølgelængde. Da der med FITC som farvestofsmølekyle rettes "blåt" lys med bølgelængder på 420 - 480 nanometer mod filmen, ville det være ideelt at have partikler med diameter på 0,2 - 0,3 mikron.

20 Acrylpolymerperlerne og titandioxidet har fortrinsvis diameterfordelinger, som er maksimum ved ca. 0,2 mikron. Kobberphthalocyanidet omfatter fortrinsvis partikler, der er noget mindre, men som stadig repræsenterer et effektivt spredningstværsnit.

Foretrukne materialer ifølge opfindelsen er immobiliseret på en fast bærer. Den faste bærer har fortrinsvis en i det væsentlige flad overflade, hvorpå substratet aflejres i i det
30 mindste ét tydeligt adskilt område. Mest foretrukket omfatter den faste bærer desuden en eller flere prøvefordybninger med i hovedsagen flad bundoverflade og divergerende sidevægge. Substratet immobiliseres fortrinsvis på fordybningernes flade bundoverflader. Fordybningerne med substratet aflejret derpå
35 frembyder således et afgrænset område, hvori bestemmelser af en væske kan ske. Immobiliseret under regulerede temperatur- og fugtighedsbetingelser (f.eks. 20°C og 70% fugtighed) dannes

en kolloid film med en tykkelse på 40 - 50 mikron, og som er vandpermeabel.

5 Med kontrollerede tørringshastigheder (temperatur og fugtighed må ikke svinge eller være ekstreme, og der tolereres ingen udsættelse for træk) og med den passende fortynding med destilleret vand, som vist i sammensætningen, bringes en flydende aflejring af emulsionen med en højde på ca. 75 mikron til at flyde sammen til en tyk film på ca. 40 - 45 mikron, som vist i
10 elektronmikrografer.

Når en typisk film er tør, vejer den fra 60 til 65 mg. Efter 10 minutters udsættelse for vandige opløsninger (f.eks. efter udblødning i vand eller aflejringer af legemsvæsker) vokser
15 filmens vægt til 115 milligram, en 75%'s forøgelse på grund af vandindhold. Selv efter 1½ times påfølgende tørring ved stuetemperatur findes der et resterende overskud på 6 - 7% vandindhold, som forsvinder eksponentielt.

20 De følgende eksempler illustrerer brugen af materialerne ifølge opfindelsen til immunbestemmelse af væsker ved diagnose af sygdomme.

EKSEMPEL 1.

25 -----

Katteleukæmi-bestemmelse.

Bestemmelse af opbrug af antistof:

30

Materiale ifølge opfindelsen blev immobiliseret på bunden af prøvefordybninger i en fast bærer. P-27-antigen, et af kerneantigenerne i katteleukæmivirus, blev høstet fra en voksende cellelinie F1-74 og aflejret på en første prøvefordybning.

35

I en anden prøvefordybning blev en prøve indeholdende P-27-antigen inkuberet med anti-P-27-antistof, der var udviklet i

kaniner. Efter 10 minutters inkubation blev en del af denne blanding overført til den første forsøgsfordybning for at lade eventuelt frit antistof, der ikke allerede var bundet til antigenprøven, gå i forbindelse med P-27-antigenet i substratet.

5 Efter 15 minutters inkubation og en kort vask blev gede-anti-kanin-immunoglobulin G (IgG), som var mærket med fluorescein-isothiocyanat (FITC), sat til substratet. Efter 10 minutters inkubation blev substratet vasket og indsat i et Daryl "TRACK XI"-apparat og målt for transmitteret fluorescerende lys. Kalibreringsprøver af leukæmivirus var normal kattesera indeholdende kendte koncentrationer af P-27-antigenet.

10

Kliniske forsøg med 104 tidligere frosne katteserumprøver viste en specificitet på 85% og en følsomhed på 95% over for en sammenlignet ELISA-subjektiv "sandwich"-bestemmelse.

15

EKSEMPEL 2.

20 Fluorescensimmunbestemmelse af katteinfektøs peritonitis (FIP).

Til alternative fordybninger indeholdende materiale ifølge opfindelsen blev anvendt kontrolpræparat og antigenpræparat.

25 Kontrolpræparatet var overliggende væske, der var fremkommet af dyrkede svinenyreceller (PK), fortyndet 1:3 med 0,1 M bicarbonatstødpude, pH 9. Antigenpræparatet var TGE-virioner fremkommet af overliggende væske fra dyrkede PK-celler, der var inficeret med TGE-virus (Miller-stammen). Katteinfektøs peritonitis-antistoffer krydsreagerer kraftigt med TGE-virus.

30

En katteblodprøve blev indført i både kontrol- og antigenfordybningen og inkuberet i 10 minutter. Efter en vask blev kanin-anti-kat-IgG med FITC-mærke derefter indført i fordybningerne. Efter 10 minutters inkubation og en endelig vask med vand blev fordybningerne undersøgt for fluorescens i måleapparatet. Ved analyse af resultaterne trækkes fluorescensen af

35

kontrollen fra den fra antigenfordybningen fremkomne fluorescens af begge kalibrerede prøver og ukendte prøver for at få en netto-fluorescensaflæsning. - Kalibrerede prøver er sammenblandede sera med kendt FIP-titer bestemt ved anden teknik.

- 5 Kliniske forsøg med 124 prøver af forud frosne katteserumprøver visete en specificitet på 80% sammenlignet med den kendte kinetiske enzymbundne bestemmelse (KELA) og en følsomhed på 90%.

10 EKSEMPEL 3.

Fluorescensimmunbestemmelse af Toxoplasma gondii.

- 15 Toxoplasma gondii kan påvirke mange forskellige dyr, men katten tjener som det naturlige reservoir. Den er af alvorlig klinisk betydning, idet overføring fra en huskat til en gravid ejer kan føre til katastrofale fødselsdefekter hos fosteret. Både den svangre kvinde og hendes kat skal derfor undersøges
- 20 periodisk ved serologi under svangerskabet.

- Til understøttet materiale, som anvendt i eksempel 1, sættes opløselige antigener, der er ekstraheret fra sprængte Toxoplasma gondii-organismer. Substrat og antigen immobiliseres i
- 25 prøverfordybninger. En dråbe fuld, ufortyndet serum eller blod anbringes i hver fordybning. Fordybningerne inkuberes i 10 minutter ved stuetemperatur for at tillade reaktionen mellem antistoffer for T. gondii og det immobiliserede antigen. Fordybningerne vaskes og bringes så i kontakt med anti-katte-
- 30 antistoffer mærket med fluoresceinisothiocyanat (FITC). Efter 10 minutters inkubation blev fordybningerne vasket og iagttaget for fluoresens. Kontrolprøver med kendt titer blev behandlet samtidig for at skabe en kalibreringsprøve.

EKSEMPEL 4.

De følgende bestemmelser blev udført ved anvendelse af den almene fremgangsmåde, og materialet og udstyret, der er beskrevet i eksempel 1 - 3. Katte-IgG blev fremstillet som i eksempel 3, men intet antistof eller antigen blev forud tilført det kolloide substrat. Serum blev anbragt i fordybninger i 10 minutter. Alle serumproteiner blev absorberet. Efter vask blev anti-katte-IgG-antistof med FITC-mærke tilført. Det reagerede kun med det bundne IgG. Efter 10 minutters inkubation blev overskud af anti-katte-IgG vasket bort, og fluorescensen blev aflæst. Kalibreringer gav kvantificering i mg IgG pr. 100 ml blod.

Heste-IgG-bestemmelse blev udført på samme måde som katte-IgG-bestemmelsen, men blev kalibreret til lave niveauer for at bestemme, om et nyfødt føl var immunodefekt, da det ikke havde taget råmælken fra hoppen.

Hundesygge-antistof, hundeparvovirus-antistof og hunde-antistof mod Brucella blev alle anvendt i "sandwich"-teknik, udført som i eksempel 3, og rettet mod de pågældende antigener. Alle anvendte to 10 minutters inkubationer og to korte vaskninger. Ingen krævede brug af kontrolfordybninger således som FIP-prøven i eksempel 2. Til en prøve for reumatoide faktorer i hunde var antigenet "ændret" kanin-IgG, hvortil der i nogle hunde rettes IgM-antistoffer. Et anti-hund-IgM-antistof med FITC-mærke blev anvendt på samme måde som i eksempel 1 - 3. Til en hunde-antinuklear antistofprøve blev dobbeltstrenget og enkeltstrenget DNA plus ribonuklear protein kombineret som antigen. Prøven blev udført som i eksempel 1 - 3.

P a t e n t k r a v.

1. Materiale til fluorescensimmunbestemmelse af biologiske
5 væsker, med et kvældbart, rehydratiserbart polymert protein-
bindende materiale, som danner en tredimensional grundmasse,
k e n d e t e g n e t ved, (1) partikelformede ikke-speci-
fikke lysspredende centre fordelt i den polymere grundmasse,
og som er i stand til at sprede synligt lys, og (2) partikel-
10 formede specifikke lysspredende centre fordelt i den polymere
grundmasse, der er i stand til at reflektere specifikt
fluorescerende stimuleringslys og absorbere uspecifikt lys.
2. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
15 det polymere proteinbindende materiale er en acrylcopolymer.
3. Materiale ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at
acrylcopolymeren består af methacrylsyre og polymethylmeth-
acrylat.
20
4. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
de ikke-specifikke lysspredende centre er oxider af titan og
zink hver for sig eller i kombination.
- 25 5. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
det specifikke lysspredende centrum er en phthalocyaninforbin-
delse.
6. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at
30 det er immobiliseret på en fast bærer.
7. Materiale ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at
den faste bærer har en i det væsentlige flad overflade.
- 35 8. Materiale ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at
det omfatter en eller flere prøvefordybninger, der har i ho-
vedsagen flad bund og udadskrånende sidevægge og hvor materia-
let er immobiliseret på bunden.

9. Materiale ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at substratet er et lag med en dybde fra 40 til 50 mikron på den flade overflade.

5 10. Materiale ifølge et af de foregående krav, k e n d e - t e g n e t ved, at det har bundet deri og dertil et første stof, som er i stand til at reagere med et eller flere følgen- de stoffer til dannelse af et fluorescerende produkt.

10 11. Materiale ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at det første stof er et antigen eller antistof.

15 12. Materiale ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at antigenet eller en fraktion deraf er TGE-virioner, P-27-anti- genet eller katteleukæmivirus, Toxoplasma gondii, hundesyge- virus, hundeparvovirus, hunde-Brucella-organismer, Brucella abortus-organismer, hjerteorm eller Trichinella.

20

25

30

35