

**Vizsgálati eljárás újonnan szintetizálódott
ellenanyagok kimutatására**

K I V O N A T

A találmány tárgyát eljárás képezi immunogén hatására újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétének vagy mennyiségének kimutatására valamely mintában, amely szerint a felszabadult ellenanyagokat vagy azok fragmentumait mutatjuk ki limfocitákat tartalmazó mintában úgy, hogy a limfocitákat az azokkal asszociált, szintetizált ellenanyagok vagy azok fragmentumai felszabadítására roncsoljuk, és a mintában található újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétét vagy mennyiségét meghatározzuk. A találmány tárgyát képezik továbbá az eljáráson alapuló diagnosztikai eljárások, valamint annak kivitelezését megkönnyítő reagenskészletek. Az eljárást úgy is módosíthatjuk, hogy az alkalmas legyen nonspecifikus infekciós indikátorok kimutatására.

P0201001

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Vizsgálati eljárás újonnan szintetizálódott
ellenanyagok kimutatására**

A találmány tárgyát képezi eljárás ellenanyagok kimutatására, közelebbről, fertőzésre vagy vakcinázásra adott válaszként újonnan szintetizálódott ellenanyagok kimutatására mintákból, amely szerint az ellenanyagok jelenlétének kimutatását megelőzően a limfocitákat roncsoljuk.

Az ELISA-eljárást régóta alkalmazzák ellenanyagszintek (vagy antigénszintek) kimutatására és mérésére. Az ELISA-eljárást leggyakrabban szerológiai vizsgálatként alkalmazzák, de alkalmazzák antigének és ellenanyagok immunkémiai tulajdonságainak a vizsgálatára, és például gyakran alkalmazzák immunválaszok értékelésére és jellemzésére, sejtkultúrák ellenanyag-termelésének a vizsgálatára a hibridóma technológiában, és hasonlókra.

Az ELISA-eljárás alkalmazása egyszerű, érzékeny, és viszonylag gyors, azonban a céllenanyagnak csupán a jelenlétét képes mérni; nem tud különbséget tenni antigénre adott válaszként létrejött, folyamatban lévő ellenanyag-

válasz, vagy egy egykori fertőzésből visszamaradt, vagy passzív transzfer eredetű ellenanyagok között.

Míg bizonyos esetekben elegendő lehet egyszerűen csak az ellenanyag jelenlétéről információt gyűjteni, más esetekben szükség lehet arra, hogy képesek legyünk eldönteni, vajon a vizsgálat időpontjában a célellenanyag a limfociták által akutan szintetizálódott-e, például egy vakcinázás során, vagy újszülöttek fertőzéseinek diagnózisa során, hogy különbséget tehessünk saját és passzív módon átvitt anyai ellenanyagok között. Ez nem érhető el a klasszikus ELISA-eljárással.

Ennek megfelelően, további eljárásokat fejlesztettek ki, amelyek lehetővé teszik folyamatban lévő ellenanyag-szintézis kimutatását. Ebből a szempontból külön kiemelő az „enzimmel kapcsolt immunospot” („enzyme-linked immunospot”, ELISPOT) vizsgálat (nevezik még „spot ELISA” vagy „ELISA-plakk” vizsgálatnak), amelyet például Czerkinsky és munkatársai ismertetnek [„ELISA and other Solid Phase Immunoassays”, szerk.: D.M. Kennedy és S. J. Challacombe, 10. fejezet, 217-239 (1988)]. Ez az ELISA-technológián alapuló eljárás lehetővé teszi egy vagy több célantigén ellen ellenanyagokat szekretáló limfociták számának a meghatározását. Alapjában, az ELISPOT az ELISA-eljárás változata, amely szerint az ellenanyagszekretáló sejteket („antibody secreting cells”, ASC) úgy mutatjuk ki, hogy limfocitákat tenyésztünk speciálisan módosított, célantigénnel fedett ELISA-lyukakban, és a szokásos ELISA-reagenseket olyan enzim-szubsztrát komplexekre cseréljük,

amelyek színes precipitátumot („spot”-okat, foltokat) eredményeznek az ellenanyagszekretáló sejtek szomszédságában. A foltokat aztán megszámlolhatjuk, ezáltal az ellenanyagszekretáló sejtek számát meghatározzuk. Kontrollként proteinszintézist gátló reagenst adhatunk a tápközeghez, hogy meggyőződjünk arról, hogy az észlelt foltok valóban az *in vitro* inkubációs idő alatt létrejövő *de novo* ellenanyagszintézis eredményei.

Míg az ELISPOT eljárás nagyon hasznosnak bizonyult a humorális immunválaszok dinamikájának a tanulmányozására, és alkalmazzák immunizált egyének perifériás keringésében átmenetileg megjelenő spontán ASC-k kimutatására, az eljárás bizonyos jellemzői korlátozzák a klinikai diagnosztikában való alkalmazását. Először is, mivel minden mintában meg kell számolni az egyedi foltok számát, ami idő- és munkaigényes lehet, az eljárás nem különösebben alkalmas klinikai diagnosztikai laboratóriumokban előforduló nagyszámú minta vizsgálatára. Másodszor, az egyes mintákban csak az ellenanyagot szekretáló sejteket számoljuk meg, és általánosságban, ez elég nagy térfogatú, azaz több ml mintát igényel. Ezen felül, az ELISPOT lemezek költségesek, és az eljárást nehéz automatizálni.

A WO 96/26443 számú nemzetközi közzétételi iratban módosított ELISA-eljárást ismertetnek, amely alkalmas folyamatban lévő ellenanyag-szintézis kimutatására. Ezen eljárás szerint, a limfocitákat izolálásukat követően tenyésztik, és a tenyésztési idő alatt szekretálódott ellenanyag szintjét határozzák meg. Az eljárás során a vizsgálati minta

limfocitáit 37°C-on inkubálni kell, hogy az inkubálás alatt szekretálódott ellenanyagokat meghatározhassuk. Az átlagos inkubálási idő 2-5 óra, amely jelentősen korlátozza a vizsgálat kivitelezésének a gyorsaságát. Ezen túlmenően, az inkubáláshoz megfelelő felszerelésre van szükség a vizsgálat helyszínén, hogy az közvetlenül a vizsgálat előtt kivitelezhető legyen. Ez általánosságban azt jelenti, hogy a limfociták vizsgálatát röviddel azután kell elvégezni, hogy a mintát az egyéntől levették, mert a minták tárolása, például lefagyasztással, nem elfogadható a sejtek életképességének (viabilitásának) csökkenése miatt. Tisztított sejtek viszonylag rövid ideig életben tarthatók jégen, 0°C-on, vagy kevésbé előnyösen 4°C-on.

Ebből következik, hogy az ellenanyagok kimutatására alkalmas eljárások fejlődése ellenére szükség van további javított eljárásra, amely egyszerű, gyors, kivitelezése költségkímélő, megbízhatóan lehetővé teszi a spontán szekretált ellenanyagok pontos meghatározását, amellyel megkülönböztethető a *de novo* ellenanyag-szintézis, és amely minták, például vérminták alkalmazásával diagnosztikai célokat szolgálhat. Találmányunk ezeket az igényeket célozza meg.

A fent ismertetett eljárásban tenyésztési periódust alkalmaztak az elfogadott felfogás alapján abból kiindulva, hogy erre szükség van ahhoz, hogy immundiagnosztikai célokat kielégítő vizsgálati eredményt biztosító megfelelő ellenanyagtitert érjünk el.

A szakirodalomból ismeretes, hogy az ellenanyagok (immunglobulinok) bioszintézise B-sejtekben történik [Roitt I., Brostoff J. és Male D.: "Immunology", 4. kiadás, Mosby kiadó, London 6.12-6.13 (1996)], miután azok a véráramba szekretálódnak, hogy felvegyék a harcot a fertőzések ellen. Amikor az ellenanyagokat az ellenanyag-szekretáló sejtek (ASC-k) szekretálják, a molekulák teljesen összeállított és glikozilezett állapotban vannak (például az IgG-molekulát két nehézlánc és két könnyűlánc alkotja, amelyek diszulfidhidakkal vannak összekötve). Megállapítást nyert, hogy az ellenanyagok bioszintézise során a folyamatot korlátozó tényező az intracelluláris transzport, valamint az endoplazmás retikulumban és Golgi komplexben történő glikozilezés (amely 1 órát, vagy hosszabb időt vesz igénybe), míg az immunglobulinok különböző láncainak a bioszintézise csak percekig tart. Összességében, a szintézis és szekretálódás folyamatát nagyságrendben 2 órára becsülik [Melchers: Histochemical, J., 3, 389-397 (1971)]. Az immunglobulinok sejtből történő gyors szekretálódása miatt eddig senki sem gondolt arra, hogy funkcionális ellenanyagok, vagy akár részlegesen szintetizált ellenanyagok (például nem-glikozilezett ellenanyagok) lehetnek a sejtben jelentős mennyiségben. Nem gondolt továbbá senki arra, hogy limfociták roncsolása valamely mintában elegendő mennyiségű "újonnan szintetizált ellenanyagot" eredményezhet ahhoz, hogy lehetőség legyen annak immundiagnosztikai célú kimutatására.

Meglepetéssel tapasztaltuk azonban, hogy a limfociták celluláris bennéke? elegendő ellenanyagot tartalmaz ahhoz, hogy - amennyiben a vizsgálandó mintát az immunválasz akut fázisában vesszük le - lehetővé váljon egyének akut ellenanyag-szintézisének kimutatása, és akár az ellenanyagok mennyiségi meghatározása. Ez az idő általában nagyjából azal az időtartammal esik egybe, amely során az ellenanyag-szekretáló sejtek várhatólag a perifériás vérben megjelennek. Így tehát hasznos, diagnosztikailag alkalmazható információhoz jutunk.

Előnyösen, így elkerülhető a minta, például tisztított limfocitakészítmény hosszú inkubálása a vizsgálat előtt, mivel az eljárás egyáltalán nem igényli a limfociták inkubálását.

A találmány szerinti eljárás megbízható vizsgálat kidolgozására ad lehetőséget, amelyben a minták vizsgálat előtt például hűtve (előnyösen körülbelül 4°C-on) vagy fagyasztva, például 0°C alatt tárolhatók. Szakember számára nyilvánvaló, hogy a teljes vért előnyös inkább hűtve (amint azt a továbbiakban ismertetjük), mint fagyasztva tárolni, mivel a teljes vér fagyasztása a sejtek lízisét eredményezi. Olyan minták azonban, mint például a tisztított limfociták, a találmány szerinti vizsgálat elvégzése előtt fagyaszthatók vagy hűthetők anélkül, hogy a teszt eredményét hátrányosan befolyásolnánk. Ennek megfelelően, a mintákat a vizsgálat előtt huzamosabb ideig tárolhatjuk, akár olyan eljárásokkal is, amelyek befolyásolják a sejtek életképességét (például szérum- vagy plazmaminták tárolásához

hasznló módon). Ennek következtében, a találmány szerinti vizsgáló eljárás jelentős előnyöket nyújt a minta vétele, tárolása és kezelése vonatkozásában, és előnyösen lehetővé teszi a vizsgálat későbbi időpontban történő elvégzését, amire szükség lehet területen gyűjtött minták vizsgálata esetében.

A találmány egy szempontja szerint, a találmány tárgyat képezi eljárás adott immunogénre adott válaszként újonnan szintetizált ellenanyag jelenlétének kimutatására vagy mennyiségének meghatározására biológiai mintákból, amely szerint:

limfocitákat tartalmazó mintát veszünk le;

a limfocitákat roncsoljuk, ezáltal a limfocitákkal asszociált ellenanyagokat vagy fragmentumaikat felszabadítjuk; és

kimutatjuk a felszabadított ellenanyagokat vagy fragmentumaikat, miáltal meghatározzuk a mintában található, újonnan szintetizált ellenanyagok jelenlétét vagy mennyiségét.

A leírásban az "újonnan szintetizált ellenanyag" kifejezésen antigenikusan aktív ellenanyagot (azaz, az immunogénnek megfelelő antigént felismerni és megkötni képes ellenanyagot) értünk, amely limfocitasejt által és limfocitasejten belül, immunogénre adott válaszként, *in vivo*, folyamatban lévő immunválasz részeként termelődött vagy szintetizálódott. Az ellenanyagot tehát limfocita szintetizálta *in vivo*, prezentált immunogén által kiváltott immunválasz létrejötte során, azaz az ellenanyag a

limfocitát tartalmazó mintának adott állatból történő levétele időpontjában és azt megelőzően szintetizálódott.

A limfocitákkal asszociált ellenanyagokon és fragmentumaikon olyan újonnan szintetizált ellenanyagokat és fragmentumokat értjük, amelyek antigenikusan aktívak (azaz képesek az immunogént felismerni és megkötni), és amelyek még nem szekretálódtak a sejtéből. Amint azt a korábban ismertettük, ezek általában megfelelnek a mintavételt megelőző 2 órában termelődött ellenanyagoknak (amely termelés kizárólag *in vivo*, vagy részben, a roncsolást megelőzően *in vitro* történhet, amennyiben a sejteket megfelelő körülmények között tartjuk), bár a szekréciós folyamat időbeli lefolyása változó lehet. Míg ellenanyagok gyorsan termelődhetnek a sejtekben (például 1-2 perc alatt - bár a szekretálódás valamivel lassúbb), a limfocitákban jelen lehetnek az ellenanyagokat felépítő szabad láncok, glikozilezetlen vagy részlegesen glikozilezett ellenanyagok vagy ellenanyag-láncok, amelyek roncsolás hatására kiszabadulhatnak. Kívánt esetben, ezek a "fragmentumok" kimutathatók és bevonhatók az újonnan szintetizált ellenanyagok jelenlétének vagy mennyiségének a meghatározásába, feltéve, hogy antigenikusan aktívak, amint azt fent ismertettük. A limfocitákból kiszabaduló ellenanyagok újonnan szintetizálódott ellenanyagoknak felelnek meg. Az ilyen, újonnan szintetizálódott ellenanyagok szintjének meghatározása viszonylagos információt nyújt adott immunogénre adott válasz során bekövetkező aktív ellenanyag-termelés mértékére vonatkozólag, azaz egy folyamatban lévő, krónikus vagy akut

immunválasz részeként termelődő ellenanyagok termelődésére vonatkozólag. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát képező eljárás aktív ellenanyag-termelés jelenlétének vagy mennyiségének meghatározására újonnan szintetizálódott ellenanyagok szintjével fennálló korreláció alapján, megfelelő kontroll mintákhoz történő viszonyítással.

A limfocitákat tartalmazó mintát bármely állatból levehetjük, előnyösen emlősből, például emberből, amelynek a mintavételt megelőzően immunogént prezentáltunk. Általánosságban, az immunválaszt akkor előnyös a találmány szerinti eljárással kimutatni, ha azt egy közelmúltban bekövetkezett fertőzés vagy vakcinázás váltotta ki, és tanácsos a mintát az immunogénnel történt érintkezést követő néhány héten vagy néhány napon belül levenni. Az alanytól történő mintavétel optimális időpontja függ a fertőzés természetétől, vagy az alkalmazott vakcina típusától, továbbá függ az alany immunválasz-mechanizmusának hatékonyságától, ami egyénenként változó lehet. Szükséges azonban, hogy a mintát akkor vegyük le, amikor az alany immun-rendszerének limfocitái a kérdéses immunogénre adott válasz során az akut ellenanyag-szintézis fázisában vannak. Általánosságban úgy találtuk, hogy előnyös, ha a mintát az alanyak az immunogénnel történt prezentálódását követő 3 héten belül, előnyösebben a fertőzést vagy vakcinázást követő 8-12 napon belül vesszük le, azonban néhány esetben elegendő ellenanyag-termelés jelentkezik 1-5 napon belül, közelebbről 2-3 nappal a fertőzést vagy vakcinázást követően ahhoz, hogy a

találmány szerinti eljárással értékelhető eredményt kapjunk.

A minta lehet vérminta, vagy származhat az alany nyirokrendszeréből. Általában megfelel bármely testfolyadék vagy szövetminta, amely az alany immunrendszeréből származó limfocitákat tartalmaz. Közelebbről, klinikai vagy kísérletes körülmények között egyszerűen vehetünk az alanytól perifériás vért vagy nyiroknedvet, azonban éppúgy megfelel bármely limfatikus vagy limfoid szövet vagy bármely, limfocitákat tartalmazó vérsejtforrás, például nyirokcsomókból vagy mirigyekből vagy nyirokcsomócskékból származó minták, például mandulából származó minták. Kifejlesztettek olyan sebészeti beavatkozásokat is, amelyek lehetővé teszik biopsziás anyag vételét az alanyból, és ezeket a beavatkozásokat szükség esetén alkalmazhatjuk a találmány szerinti eljárásban történő alkalmazásra szánt minták vételére. A limfocitaforrástól függően, a találmány szerinti eljárás során végzett vizsgálatot megelőzően szükség lehet a limfociták elválasztására és tisztítására. Amennyiben azonban szükséges, vagy kívánt esetben, a limfocitákat tisztíthatjuk. Ennek megfelelően előnyösen, a vizsgálatban limfocitakészítményt alkalmazunk mintaként, amelyet a fent ismertetett források egyikéből állítunk elő szakember számára ismert eljárásokkal.

A limfociták „roncsolásán” azt értjük, hogy a sejtmembránon és belső membránstruktúrákon belüli sejttartalmat, beleértve az újonnan szintetizált ellenanyagokat kiszabadítjuk úgy, hogy azok bármely megfelelő biokémiai vagy

kémiai vizsgálattal kimutathatóak legyenek. Ismeretes, hogy az immunglobulinok szintetizálódása és szekretálódása az endoplazmatikus retikulumon és Golgi komplexen át vezető út során történik. Ahhoz, hogy az immunglobulinokat ezen belső struktúrákból felszabadítsuk, azokat szükségszerűen roncsolnunk kell. A limfocitákat a sejtroncsolás olyan ismert eljárásaival roncsolhatjuk, amelyek lehetővé teszik a membránnal határolt terek (membránkompartmentek) tartalmának a kiszabadulását, például sejtlízissel, például fizikai roncsolással, mint például fagyasztás-olvasztás ciklusokkal, vagy kémiai eljárásokkal, sejtroncsoló pufferek vagy oldatok alkalmazásával.

A leírás szerinti értelemben „kimutatás” és „jelenlétének vagy mennyiségének a meghatározása” kifejezések az ellenanyag-termelődés szintjének mind mennyiségi (kvantitatív), mind minőségi (kvalitatív) meghatározására vonatkoznak, amely értelemben a mintában termelődött ellenanyagok mennyiségére vonatkozólag kaphatunk abszolút értéket, továbbá indexet, arányt, százalékot, vagy hasonló utalást az ellenanyag termelődésének szintjére, valamint szemi-kvantitatív és kvalitatív becsléseket. A „jelenlétének meghatározása” kifejezés olyan helyzeteket is magában foglal, amelyekben egy negatív eredmény, a szintetizált ellenanyagok hiányára utalva értékes információt nyújt az alany immunválaszának értékelése során. Például, negatív eredmény utalhat a kérdéses immunogén elleni immunválasz hiányára, vagy utalhat krónikus fertőzésre, ha a kérdéses immunogén elleni ellenanyagok jelen vannak a szérumban.

Az újonnan szintetizált ellenanyagok kimutatása inkább teszi lehetővé egy vagy több immunogénre specifikus ilyen ellenanyagok szintjének felbecsülését, mintsem a sejtekben jelenlévő összes ellenanyag szintjének felbecsülését.

A szintetizált ellenanyagok kimutatása bármely olyan eljárással történhet, amely lehetővé teszi az immunválaszt kiváltó, kérdéses immunogénhez kötődő ellenanyagok azonosítását. Ennek megfelelően, alkalmazható bármely kimutatási eljárás, amely a céllenanyag jelenlétét tükröző szignál létrejöttét eredményezi. Alkalmazhatók például enzimmel történő jelölésen alapuló eljárások, amelyekben egy szubsztrátból olyan oldható vagy oldhatatlan termék képződik, amelynek a mennyisége meghatározható.

A szintetizált ellenanyagok egyszerűen kimutathatók például szilárd fázisú kötődési eljárásokkal, például ELISA-eljárással, amely szerint az ellenanyagok a vizsgálatban alkalmazott antigénhez kötődnek, bár az alkalmazott antigén eltérhet az immunválaszt eredetileg kiváltó immunogéntől. Ennek megfelelően, míg mind a vizsgálatban alkalmazott antigén, mind az ellenanyagok *in vivo* termelődését a múltban vagy jelenleg stimuláló immunogén köti a kimutatni szándékozott ellenanyagokat azonos vagy hasonló epitópok jelenléte miatt, egyéb tekintetben, az antigén és az immunogén lehet nem azonos. Ennek megfelelően, míg a találmány szerinti eljárás során alkalmazott antigének lehetnek a releváns immunogén egészét vagy egyes részeit tartalmazó, például fertőzött egyénekből származó molekulák, vagy ugyanabból vagy hasonlóból tisztított részek; hasonlóképp,

az antigént előállíthatjuk szintetikus úton, például kémiai szintézissel vagy rekombináns expresszálassal, a natív antigénhez képest deletált vagy hozzáadott részekkel. Ennek megfelelően, antigénként alkalmazhatunk fúziós proteineket, vagy csak a megfelelő epitópot vagy epitópokat expresszáló molekulákat.

A találmány szerinti megoldás számos előnnyel bír a technika állása szerint ismert ellenanyag-vizsgálati technológiákhoz képest. Először, a szérumszintek kiutatásán alapuló technológiákkal (például szérums ELISA-val) szemben az új eljárással aktuális fertőzésre / immunstimulációra utaló ellenanyagokat mutathatunk ki, vagy - újszülöttek esetében - lehetőség van az anyai és magzati ellenanyagok elkülönítésére. Ez azért lehetséges, mert a találmány szerinti eljárásban közvetlenül a mintából származó limfocitákat használjuk fel, bármely megelőző kezelés vagy stimuláció, például antigénnel történő *in vitro* stimuláció nélkül. Ezáltal, a limfociták által a mintavétel időpontjában szintetizált ellenanyagokat mutathatjuk ki. (Ily módon, akár kis térfogatú minták alkalmazásával, megkülönböztethetővé válik a kérdéses immunogén hatására végbemenő spontán ellenanyagszintézis a limfociták „bystander” aktivitásától.) Ezen felül, az eljárást olyan limfociták alkalmazásával végezzük, amelyek a spontán ellenanyagtermelés vagy -szekretálás stádiumában, vagy az ellenanyagszekréció kezdeti stádiumában lettek roncsolva, anélkül, hogy a sejteket valamilyen immunmemória felélesztése irányába stimuláltuk volna. Ez eltér a szakirodalomban korábban leírt el-

járások menetétől, amelyekben *in vitro* antigénstimulációt alkalmaznak, amely növelheti ugyan az eljárás érzékenységet, viszont feléleszti a sejtmemóriát, illetéknépp nem pontos vagy alkalmas technológia új fertőzés vagy közel-múltbeli vakcinázás hatására akut módon vagy újonnan szintetizálódó ellenanyagok kimutatására.

Másrészt, a találmány szerinti megoldás a spontán ellenanyag-szekréció alapján, a tesztantigén alkalmazásával mutatja ki a vérben jelenlévő, aktuális fertőzésre utaló ellenanyagokat. A plazmalimfociták a fertőzést vagy vakcinázást, stb. követő első néhány hétben szekretálnak ellenanyagokat a tesztantigénnel szemben. Az ilyen ellenanyagok kimutatása a találmány szerinti eljárással lehetővé teszi a fertőzés diagnosztizálását vagy igazolását, vagy a vakcinázásra adott ellenanyagválasz monitorozását, stb.

A találmány egy további szempontja szerint tehát a találmány tárgyát képezi eljárás immunogén által kiváltott fertőzés diagnosztizálására vagy monitorozására humán vagy nem-humán állatban vagy annak részében, amely eljárásban a fertőzés tényét és mértékét határozzuk meg az említett immunogén alkalmazásával, megfelelő kontrollokhoz és/vagy referenciamintákhoz történő viszonyítással.

A találmány szerinti eljárás különösen előnyösen alkalmazható csecsemőkben és újszülöttekben, ahol fontos az újonnan szintetizálódott ellenanyagok elkülönítése a passzív módon átkerült anyai ellenanyagoktól. Ugyanazt a limfocitataralmú mintát több releváns antigén alkalmazásával több különböző fertőző ágenssel szemben termelődött el-

ellenanyagokra nézve is vizsgálhatjuk - több vizsgálatban vagy ugyanabban a vizsgálatban -, ily módon a beteg klinikai tünetegyüttesével összeegyeztethető releváns antigéneket alkalmazhatunk az érintkeztetésre.

Fertőzések diagnosztizálásánál az is lényeges, hogy képesek legyünk különbséget tenni az aktuális ellenanyag-szintézis és egy korábbi fertőzés hatására már jelen lévő ellenanyagok közt. Az immunológiai memória felélesztése *in vitro* antigénstimulációval nem egyeztethető össze egy, folyamatban lévő akut fertőzés kimutatására irányuló vizsgálattal, illetéknépp, a korábbi, antigénstimuláción alapuló eljárások nem rendelkeznek a találmány szerinti eljárással kapcsolatban említett előnyökkel. Az említetteken felül, az antigénstimulációs lépés beiktatása veszélyeztetné a találmány szerinti vizsgálati eljárás időfaktorával kapcsolatos előnyöket, amely eljárás igen gyorsan kivitelezhető a technika állása szerint ismert eljárásokhoz képest.

Másodszor, az ellenanyagszekretáló sejtek vagy aktív módon szekretálódott ellenanyagok kimutatásán alapuló vizsgálatokhoz képest, a találmány szerinti eljárásban - bár az akut ellenanyagszintézis igazolása a kimutatás lényegi paramétere - nem szükséges a mintát az ellenanyagszintézist és/vagy szekréciót lehetővé tevő körülmények mellett tartani. Ez nagymértékben leegyszerűsíti a vizsgálatot, és különösen előnyös a korábban ismert, a WO 96/26 443 számú nemzetközi közzétételi iratban ismerttetett vizsgálati eljárásokhoz képest, amelyben a limfocitákat a mintavételt követően inkubálni kell, és a vizsgálat alatt a limfociták fo-

lyamatos ellenanyag-szekrécióját lehetővé tevő körülményeket kell fenntartani.

A találmány szerinti megoldás alkalmazásának különösen váratlan előnye az ilyen inkubációs lépés vagy különleges körülmények elhagyása, ami azt jelenti, hogy a minták a mintavételt követően egyszerűen kezelhetők úgy, hogy a sejtek roncsolódjanak vagy lizálódjanak, ezután a lizátum például fagyasztva vagy hűtve tárolható a vizsgálat elvégzéséig.

A korábbiakban már említettek szerint eljárhatunk úgy is, hogy a mintát, például teljes vért vagy tisztított készítményt például fagyasztva vagy hűtve tároljuk (a mintától függően) egy ideig, például néhány órától több napig terjedő időtartamig, például több mint 4 órán át, mielőtt a sejteket roncsolnánk. Például, tisztított limfocitakészítményt szükség szerint vagy kívánt esetben tárolhatunk például fagyasztva - például több óráig vagy napig -, vagy hűtve - több óráig -, mielőtt a mintát a sejtek roncsolása céljából kezelnénk. Tisztított limfocitákat tárolhatunk például 4°C-on több óráig, például 4-6 óráig, mielőtt azokat a sejtek roncsolása vagy lizáltatása céljából kezelnénk.

Meglepő módon azonban azt találtuk, hogy egyes minták, például teljes vérkészítmények hosszabb ideig is tárolhatók hűtve anélkül, hogy a sejtek károsodnának, és a vizsgálat eredményét hamis irányban befolyásolnánk. Azt találtuk például, hogy teljes vérminták hűtve (például 4°C-on) legalább hat napig tárolhatók, és kívánt esetben a minták alkalman-

ként legalább hat órán át szobahőmérsékleten (18-25°C-on) tarthatók mielőtt a limfocitatisztítás lépését megkezdénénk, anélkül, hogy a teszt eredményét hátrányosan befolyásolnánk. Ez különösen előnyös akkor, amikor vérminták vizsgálatát felfüggesztik a laboratóriumban, és azokat hűtve tárolják, amíg a rutin vagy kiegészítő plazma/szérum vizsgálatok eredményei meg nem születnek. Ez váratlan és meglepő, mivel azt jelenti, hogy a limfociták fizikai integritása megmarad a tárolás során, a későbbiekben lehetővé téve (kívánt esetben) a limfociták tisztítását a tárolt vérből, valamint a limfociták roncsolását, a kimutatott ellenanyagok szintjének jelentős csökkenése nélkül.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint tehát, a limfociták roncsolását megelőzően a mintát - például vérmintát - több napig, például akár körülbelül 6 napig vagy tovább tárolhatjuk, különösen ha a tárolás hűtve, körülbelül 4°C-on történik, és a tárolási idő során még a minták hűtött környezetből történő eltávolítása is megengedett megszakításokkal, például két vagy több alkalommal, 4-6 órás időtartamra, szobahőmérsékletre, anélkül, hogy ezzel hátrányosan befolyásolnánk a vizsgálat eredményeit. Ez különösen előnyös, ha vérmintákat hűtve tárolunk, de elkerülhetetlen, hogy azokat rövid ideig a munkaasztalon szobahőmérsékleten hagyjuk. Meglepő módon azt találtuk, hogy a sejtek életképessége nem károsodik olyan mértékben hogy az a találmány szerinti vizsgálati eljárás eredményét hátrányosan befolyásolja, vagy megakadályozza, hogy azzal elfogadható eredményt kapjunk. A találmány egy további előnyös

megvalósítási módja szerint, amennyiben tisztított limfocitakészítményeket alkalmazunk, a minták 4°C alatt tárolhatók (például több napig vagy annál tovább), vagy 4°C felett tárolhatók (akár hat óráig). Annak lehetősége, hogy a különböző vizsgálandó mintákat tárolhatjuk, a találmány szerinti eljárás alkalmazását különösen előnyössé teszi nagyobb diagnosztikai laboratóriumok számára, ahol a költséges automatizált laboratóriumi készülékek, például ELISA-hardware a leghatékonyabban nagyszámú minta egyidejű futtatásával működtethetők. Ez azt is jelenti, hogy a mintavétel számos különböző helyen történhet, és a minták a vizsgálat-hoz központi diagnosztikai laboratóriumba postázhatók vagy szállíthatók, hasonló módon az egyéb típusú vizsgálatok esetében alkalmazott, szérumminták más típusú kémiai analízisére kidolgozott eljárásokhoz.

Más szemszögből, a találmány tárgyát képezi eljárás immunogén hatására újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétének kimutatására vagy mennyiségének meghatározására mintában, amely szerint:

limfocitákat tartalmazó mintában, a limfociták roncsolását, ezáltal a limfocitákkal asszociált, szintetizálódott ellenanyagok vagy azok fragmentuma felszabadítását követően kimutatjuk a felszabadult ellenanyagokat vagy azok fragmentumait; és

következtetünk az újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétére vagy mennyiségére a mintában.

A találmány szerinti megoldás jelentős előnye, hogy kivitelezéséhez csupán kis térfogatú mintákra van szükség. A találmány szerinti eljárásban már 100 000 limfocita, vagy akár kevesebb mint 50 000 limfocita vizsgálata eredményezhet kimutatható szignált. Tekintve, hogy például 1 ml vér 1×10^6 limfocitát tartalmaz, amennyiben a találmány szerinti eljárást vérből származó limfociták vizsgálatára alkalmazzuk 50-100 μ l vér megfelelő számú limfocitát tartalmazhat a találmány szerinti eljárás kivitelezéséhez. Még akkor is, ha a megfelelő kontroll vizsgálatokat [például vak („blank”) és pozitív minták] is figyelembe vesszük, 150-300 μ l minta alkalmazásával diagnosztikus értékű eredményt kaphatunk. Nyilvánvaló, hogy a teszt standardizálását követően a kontrollminták legalább egy része elhagyható. Ennek megfelelően, a találmány szerinti eljárásban a vizsgálathoz 50-500 μ l, előnyösen 100-300 μ l, és tipikusan 100-200 μ l limfocitataralmú minta szükségeltetik a teljes mintaforráshoz hasonló térfogatban. A találmány szerinti eljárásban tehát például 5×10^4 - 5×10^5 , előnyösen, 1 - 2×10^5 limfocitát alkalmazunk. Ezzel szemben, a klasszikus diagnosztikai vizsgálatokban általában több ml szérummintára vagy más folyékony mintára van szükség. Ez különösen előnyös olyan vérvételnél, ahol csak kis térfogatú minta áll rendelkezésre, például újszülötteknél, mivel a találmány szerinti eljárásban csak μ l térfogatú minták alkalmazására van szükség, amelyet például kapilláriscsővel nyerhetünk megfelelő helyről, például fülcimpából, ujjbegyből vagy sarokból.

A találmány szerinti eljárás tehát lehetővé teszi kis térfogatú vérminták (például μ l nagyságrendű, 1 ml-nél kisebb térfogatú, előnyösen, 500 μ l-nél kisebb térfogatú, például 100 μ l-nél kisebb térfogatú) minták közvetlen alkalmazását stimulálatlan limfociták spontán vagy *de novo* ellenanyag-termelésének kimutatására anélkül, hogy a vizsgálat előtt a limfocitákat tenyészténénk.

A találmány szerinti eljárással kimutatott ellenanyagok termelődését kiváltó antigének vagy immunogének lehetnek bakteriális vagy virális antigének. Klinikai szempontból jelentős antigének például, de anélkül, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk, a herpes simplex vírus, citomegalovírus, humán immundeficiencia vírus (HIV), bármely hepatitis vírus, valamint toxoplasma vagy Epstein-Barr vírus (EBV). Általánosságban, a találmány szerinti eljárással bármely, fertőzéssel vagy vakcinázással kapcsolatos, egyértelmű ellenanyagválaszt (például az akut fázis során) kiváltó immunogén kimutatható. Azokban az esetekben, ahol valamely krónikus fertőzés kimutatható szintű célellenanyag jelenlétéhez vezet a limfocitákban, azok szintén kimutathatók a találmány szerinti eljárással. Ennek megfelelően, hagyományos ELISA-eljárásokkal kimutatható bármely immunogénnel szemben termelődött ellenanyag meghatározható a találmány szerinti eljárás alkalmazásával. Ilyen antigénekkal szemben irányuló ellenanyagok kimutatásával gyorsan megállapítható, hogy a betegek fertőzöttek-e, például vérek szűrvizsgálata során, vagy fertőzés kimutatás és/vagy követése során.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi eljárás baktérium vagy vírus okozta fertőzés diagnosztizálására vagy követésére humán vagy nem-humán állatban vagy annak részében, amely szerint limfocitátartalmú mintát veszünk az állattól; a találmány szerinti eljárással meghatározzuk a limfocitákkal asszociált, a baktérium vagy vírus ellen irányuló újonnan szintetizálódott ellenanyagok vagy azok fragmentumai jelenlétét vagy mennyiségét; és megfelelő kontroll és/vagy referenciamintákhoz történő viszonyítás alapján megállapítjuk baktérium vagy vírus által kiváltott fertőzés tényét vagy kiterjedtségét.

Az eljárás különösen előnyös egyszerűségénél fogva, és különleges felszerelés hiányában, például területen is alkalmazható. Mivel a találmány szerinti eljárás során nincs szükség a minták inkubálására, az könnyen adaptálható automatizált rendszerekhez, de viszonylag elég gyors és egyszerű ahhoz, hogy a sejtek lizáltatása és az ellenanyagkimutatás olyan helyzetekben is elvégezhető legyen, amikor nem áll rendelkezésre bonyolult felszerelés.

A találmány szerinti eljárást az alábbiakban részletesen is ismertetjük. Az első lépés előnyösen a limfociták izolálása a mintából. A korábbiakban már említettek szerint azonban, nincs feltétlenül szükség tisztított limfocitakészítményre, és olyan készítményt alkalmazhatunk, amelyből a plazma-ellenanyagok nagyobb része el lett távolítva. Előnyösen, ilyen készítmények a mintában található plazma-ellenanyagok kevesebb mint 15%-át tartalmazzák, például kevesebb mint azok 5%-át, és előnyösen kevesebb mint 1%-át

tartalmazzák. Ezt egyszerűen elérhetjük lényegében plazma-mentes (például kevesebb, mint 5 térfogat-% plazmát tartalmazó) készítmény, például szérummentes készítmény alkalmazásával. Limfocitakészítményt a technika állása szerint ismert eljárásokkal állíthatunk elő, például szűrésen vagy abszorbens anyag alkalmazásán alapuló eljárásokkal, vagy limfocitatisztító reagenskészletek alkalmazásával. Limfociták izolálására előnyösen alkalmazhatunk például különböző teljes vér készítményeket, például heparinezett vért, EDTA-val kezelt vért, stb., amelyeket szokásos módon készítenek a klinikai laboratóriumokban. Nyilvánvaló, hogy valamennyi dúsított vagy tisztított készítménynek tartalmaznia kell a limfociták eredetű szolgáló mintában jelenlévő limfocitákat, hogy a spontán vagy *de novo* ellenanyag-termelés kimutatható legyen.

A limfocitákat előnyösen ismert limfocitaizoláló közeg, például Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Osló, Norvégia), vagy immunmágneses elválasztási technológia (IMS), vagy hasonló, szilárd fázison alapuló szeparáló rendszer vagy egyéb ismert eljárás alkalmazásával választjuk külön. IMS vagy hasonló elválasztási technológiák esetében, szilárd fázist, például fehérvérsejtek bizonyos csoportjára specifikus ellenanyagokkal bevont mágneses gyöngyöket alkalmazhatunk a kívánt limfociták szelektív izolálására. Amennyiben izolált limfocitákat alkalmazunk, a sejteket ismert eljárásokkal moshatjuk a felhasználást megelőzően. Előnyösen, a limfocitákat a sejtszeparálást követően esetlegesen visszamaradó plazmaeredetű ellenanyagok eltávolítá-

sa céljából mossuk. Általánosságban, a találmány szerinti eljárás alkalmazásához a limfocitasejtek plazma-ellenanyagokkal történő kontaminációját minimális szinten tartjuk, előnyösen, kevesebb mint 20 ng plazma-IgG jelenlétét engedjük meg 100 μ l mintában, ami körülbelül 1:50 000 végső hígítási faktornak felel meg plazma vonatkozásában; például, legfeljebb mintegy 0,5 ng szérum-IgG lehet jelen 100 μ l mintában. Megfigyeltük azonban, hogy ennek eléréséhez nincs szükség a sejtek túlzott vagy nagyon alapos mosására. Azt találtuk például, hogy amennyiben pufferrel hígított vért háromszor, körülbelül azonos centrifugálási paraméterek mellett egyszerűen centrifugálunk, kontamináló szérum-/plazma-ellenanyagoktól megfelelően mentes limfocitakészítményt kaphatunk. További részleteket lásd a 3. példa ismertetésénél.

Általánosságban, a találmány szerinti eljárás szükségtelessé teszi a mintából származó limfociták inkubálását a vizsgálat kivitelezését megelőzően. Világos azonban, hogy amennyiben a limfociták roncsolását megelőzően a sejteket rövid ideig ellenanyagok folyamatos termelését vagy szekrécióját lehetővé tevő körülmények mellett tartjuk, a találmány szerinti eljárással még mindig lehetséges a limfocitákkal asszociált, újonnan szintetizálódott ellenanyagok kimutatása.

A vizsgálandó mintát, amelyet kívánság szerint, szeparált limfociták kinyerésére a fent említettek szerint kezeltük, roncsoljuk, és az újonnan szintetizálódott ellenanyagokat felszabadítjuk. Ezt bármely, a technika állása

szerint ismert eljárással végezhetjük, amely a külső és belső membránstruktúrák hatékony roncsolódását eredményezi anélkül, hogy a felszabadult ellenanyagok komplementer epitóphoz történő kötődését befolyásolná; például detergensek, kaotrop ágensek, roncsoló pufferek, például EDTA-t tartalmazó pufferek, vagy egyéb roncsoló eljárások, például ultrahangkezelés vagy nyírófeszültség létrehozásán alapuló fizikai roncsoló eljárások alkalmazásával. Előnyösen azonban roncsoló puffert alkalmazunk, mivel általában ez a legegyszerűbb és legkézenfekvőbb eljárás; alkalmazhatunk például az 1. példában ismertetett puffert, azaz detergenst, például 0,5% dezoxikolátot tartalmazó puffert. Megfelelő roncsoló puffer alkalmazásával a felszabadult ellenanyagok stabilizálhatók, például a pH szabályozásával vagy a lebomlás megakadályozásával. Szükség szerint, alkalmazhatunk például proteázgátlókat tartalmazó puffereket. A roncsolást elérhetjük továbbá fagyasztási/olvasztási ciklusok alkalmazásával, vagy akár folyékony nitrogén alkalmazásával. Ily módon olyan lizátumot kapunk, amelyben a felszabadult ellenanyagok oldatban vannak, és amelyet a következő lépésekben felhasználhatunk. Világos, hogy a kimutatáshoz megfelelő mennyiségű újonnan szintetizálódott ellenanyagot úgy kaphatunk a mintából, ha a lehető legtöbb limfocitát roncsoljuk, ezáltal azokból az ellenanyagokat felszabadítjuk. Ezután előnyösen, ennek a célnak megfelelő roncsoló eljárást alkalmazunk, és a mintában található limfociták legalább 40%-át vagy 50%-át, még előnyösebben azok legalább 60%-át, 70%-át vagy 80%-át, és legelőnyöseb-

ben azok legalább 90%-át vagy 95%-át roncsoljuk. A limfociták roncsolását követően, a minta ellenanyag-tartalmát a célellenanyag kimutatását lehetővé tevő megfelelő eljárással meghatározzuk. Ezt elérhetjük úgy, hogy a mintát megfelelő kötőpartnert tartalmazó szilárd fázissal érintkeztetjük, ezáltal a kimutatandó ellenanyagot vagy ellenanyagokat immobilizáljuk. Kötőpartnerként előnyösen a kimutatandó ellenanyag vagy ellenanyagok vagy azok fragmentumai által felismert antigént (immunogént) vagy antigéneket (azaz egy vagy több antigént) alkalmazunk. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képező eljárás újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétének kimutatására vagy mennyiségének meghatározására valamely mintában, amely szerint:

a minta egy részét vagy - adott esetben - a mintából közvetlenül izolált limfociták egy részét - amelyeket a limfocitákkal asszociált ellenanyagok vagy azok fragmentumai felszabadítására roncsoltunk - egy vagy több, előnyösen szilárd fázison hordozott, a kimutatandó ellenanyag vagy ellenanyagok által felismert antigénnel érintkeztetünk;

kimutatjuk az ellenanyagok kötődését az antigénhez (antigénekhez); és

az ellenanyag-kötődést kontroll és/vagy referenciaminták kötődéséhez viszonyítjuk, ezáltal kimutatjuk az antigén (antigének) hatására újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétét, vagy meghatározzuk azok mennyiségét. A fenti eljárásban kontroll vagy referenciamintákként megfelelő negatív vagy pozitív kontrollokat alkalmazhatunk, például vak

(„blank”) mintákat, normális tartományba eső és/vagy magas értékeket adó mintákat.

Alkalmazhatunk egyéb kötőpartnereket is, például protein-A-t, protein-G-t vagy a kimutatandó ellenanyagot felismerő vagy azokhoz kötődő ellenanyagokat. Az utóbbi esetben nem szükségszerűen kell nagymértékben specifikus kötődésnek létrejönnie, mivel a találmány eme előnyös megvalósítási módja szerint a specifikitást a vizsgálati eljárásban a kimutatandó ellenanyagokhoz specifikusan kötődő antigének későbbi kötődése biztosítja. A találmány valamennyi előnyös megvalósítási módja szerint, specifikus antigén-ellenanyag komplex jön létre. Az ilyen komplexek, előnyösen szilárd hordozón immobilizált komplexek jelenlétét az eljárás kimutatási lépésében határozzuk meg. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, az eljárás kimutatási lépésében a felszabadult ellenanyagokat vagy azok fragmentumait mutatjuk ki ellenanyag:antigén komplexek képződésének detektálásán keresztül, ahol az antigén (amely előnyösen nem ellenanyag) tartalmazza vagy magában foglalja az immunogént, vagy az immunogén legalább egy epitópját tartalmazó részét.

A szilárd fázis, amennyiben ilyet alkalmazunk, bármely jól ismert, immobilizációra, szétválasztásra, stb. széles körben alkalmazott vagy ilyen alkalmazásra javasolt hordozó vagy kötőanyag lehet. Azok lehetnek részecskék, lemezek, gélek, szűrők, membránok, vagy mikrotitráló csíkok, csövek vagy lemezek, stb., és azok a legkézenfekvőbb módon polimer anyagból készülnek. A könnyű kivitelezés és egyszerűség

kedvéért azonban szokásos mikrotitráló lemezeket és vájulatokat alkalmazhatunk, előnyösen szokásos ELISA-lemezeket.

A szilárd fázist ugyancsak módosíthatjuk úgy, hogy azok különböző antigénekre specifikus ellenanyagok kimutatását tegyék lehetővé. Eljárhatunk például úgy, hogy szilárd fázisnak alkalmas anyagból, például nitrocellulózból vagy hasonlóból készült korongokat vagy csíkokat, stb. különböző antigénekkkel vonunk be, és azokat egyszerre adjuk érintkező antigént egyáltalán nem tartalmazó mikrotitráló lyukakhoz vagy más alkalmas vájulatokhoz. Ezután, ellenanyag-kötődésen alapuló kimutatási eljárásokat alkalmazhatunk a különböző antigének közti különbségtételre. Amennyiben szendvics típusú vizsgálatot alkalmazunk, a szilárd fázis egy vagy több, a kimutatandó ellenanyag vagy ellenanyagok (célellenanyagok) vagy azok fragmentumai által felismert antigént (szilárd fázishoz kötött antigént) tartalmaz. További lehetőség szerint, a szilárd fázis hordozhat egy vagy több ellenanyagot (szilárd fázisú ellenanyagokat), amely a kimutatandó ellenanyagot vagy ellenanyagokat (célellenanyagokat) vagy azok fragmentumait ismeri fel. A tárlalmány szerinti eljárás kimutatási lépésében, attól függően, hogy a szilárd fázis a már ismertettek szerint ellenanyagokat vagy antigéneket hordoz, egy vagy több, a szilárd fázison immobilizált célellenanyagok által felismert antigént érintkeztetünk a szilárd fázissal; vagy egy vagy több, a szilárd fázison immobilizált célellenanyagot felismerő ellenanyagot érintkeztetünk a szilárd fázissal. Ezek, a

szilárd fázishoz lekötődő antigének vagy ellenanyagok alkalmas módon jelölhetők, lehetővé téve azok kimutatását az alább ismertettek szerint.

Bizonyos klinikai állapotokkal vagy tünetegyüttesekkel asszociált releváns antigénekkal bevont korongok sorozatát alkalmazhatjuk annak megállapítására, hogy a gyanított ágensek melyike okozza a betegséget. A korongokat ezután egyenként dolgozzuk fel, külön lyukakban. Ez különösen anyagtakarékos eljárás, mivel a vizsgálat ugyanazon kis térfogatú vérminta alkalmazásával lehetővé teszi sok különböző (ugyanabból a fertőző ágensből vagy az egyes klinikai szindrómákra vagy állapotokra jellemző több különböző ágensből származó) antigén egyidejű tesztelését. Eljárhatunk továbbá úgy, hogy a roncsolt limfociták több mintáját használjuk fel, különböző kötőpartnerekkel, például antigénekkal vagy ellenanyagokkal bevont külön lyukakban, és a tesztet ennek megfelelően hívjuk elő.

A kötőpartner megkötésére alkalmas technológiák, például antigének szilárd fázishoz történő kötésére alkalmas technológiák a technika állása szerint ugyancsak alaposan ismertek, és azokra vonatkozólag a szakirodalomban bő ismeretanyag áll rendelkezésre. Számos szokásosan alkalmazott antigénkötő eljárás leírása megtalálható például az alábbi szakirodalmi helyen: „ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects”, szerk.: Kemeny D.M. & Challacombe S.J., John Wiley & Sons (1988). Kívánt esetben a lemezek moshatók és blokkolhatóak, ugyan- csak ismert eljárások szerint. Eljárhatunk például úgy,

hogy egyszerűen, szokásos mikrotitráló lemezeket, például ELISA-lemezeket vonunk be a kötőpartnerrel oly módon, hogy a lemezeket egy éjszakán át, 4°C-on, a kötőpartnert például 0,01-150 µg/ml proteinkoncentrációban tartalmazó megfelelő pufferben például foszfát-pufferes fiziológiás sóoldatban (PBS-ben) inkubáljuk; megfelelő blokkolóanyag (általában blokkoló proteint, például borjúsérumot vagy szárított tejproteint tartalmazó semleges puffer, például PBS) alkalmazásával blokkoljuk; majd például 1-5 órán át, 37°C-on inkubáljuk. A blokkoló oldat eltávolítását követően a lemezek készen állnak a felhasználásra.

Az egyszerűség kedvéért azonban, a találmány szerinti eljárás kivitelezéséhez szükséges anyagokat reagenskészlet formájában is kisserelhetjük, ahol a szilárd hordozót készen, kötőpartnerrel bevont, és megfelelően blokkolt formában biztosítjuk.

Előnyös lehet, ha a roncsolt limfocitaminta-oldatot az érintkeztetést megelőzően hígítjuk, és sejt/mintahígítás sorokat alkalmazunk. Hígítópufferként tipikusan a limfociták roncsolására alkalmazott puffert alkalmazzuk.

Ezután kimutatjuk az ellenanyagok kötődését az antigénekhez. A kimutatási lépésben a jel detektálása általában oldatban történik. Keletkezhet azonban oldhatatlan termék vagy jel, amely oldatban nem észlelhető. Alkalmazható bármely, ellenanyag-kötődés kimutatására alkalmas ismert eljárás, amennyiben detektálható jel keletkezik; a detektálható szignált eredményezheti például fluoreszcencia, kemiluminiscencia, kolorimetriás reakció vagy enzimreakció. Ameny-

nyiben szilárd fázist nem alkalmazunk, a felszabadult ellenanyagok bármely más érzékeny szerológiai eljárással kimutathatók, például fényszóródás detektálásával (például nefelometriával) és rezonancia eljárásokkal. A kimutatásra előnyösen alkalmazhatunk immunvizsgálati eljárást, és előnyösebben enzimhez kötött immunszorbens eljárást (ELISA). A találmány szerinti megoldással összhangban azonban, az ellenanyagok kimutatására alkalmazhatunk egyéb eljárásokat is. Alkalmazhatunk például roncsolt limfociták szuszpenziójával elárasztott bevont korongok vagy üveglemezek alkalmazásán alapuló technológiákat is. A találmány szerinti eljárásban történő alkalmazásra módosítható bármely, a technika állása szerint ismert, ellenanyagok kimutatására alkalmas technológia - például oldhatatlan vagy oldható termék képződéséhez vezető technológiák -, úgy, hogy az eljárás mennyiségi (kvantitatív) analízisre vagy minőségi (kvalitatív) (például igen/nem) típusú tesztre legyen alkalmas.

Immunológiai vizsgáló eljárások, és közelebbről ELISA-technológiák, a technika állása szerint jól ismertek, és leírásuk megtalálható a szakirodalomban (lásd például a következő szakirodalmi helyet: „ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects”, szerk.: Kemeny D.M. & Challacombe S.J., John Wiley & Sons (1988).

Miután a roncsolt limfocitamintát érintkeztettük, a rendszerhez - például az ELISA kimutatási eljárásban - a szilárd fázishoz kötődő antigénhez kapcsolódó ellenanyaghoz kötődő enzim-ellenanyag konjugátumot adhatunk. Hasonlóképp, ha a kimutatandó ellenanyag nem-specifikus módon, kötőpart-

neren - például különböző fajú ellenanyagok elleni ellenanyagon - keresztül kötődött a szilárd fázishoz, a kimutatandó immobilizált ellenanyaghoz specifikus módon kötődő enzim-antigén konjugátumot adhatunk a rendszerhez. Ezután, a detektálható jel előhívására enzimszubsztrátot adunk a rendszerhez. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, tipikusan szolubilis szubsztrátot alkalmazunk, amely oldatban detektálható szignált eredményez. Ez azért előnyös, mert gyorsítja és egyszerűsíti nagyszámú minta kezelését és feldolgozását, és lehetővé teszi az ellenanyag-termelés meghatározását, bár a már említettek szerint pontos mennyiségi meghatározásra nincs szükség, és kívánt esetben kvalitatív vagy szemikvantitatív eredményeket kaphatunk. Az egyszerűség kedvéért, a szubsztrátot úgy választhatjuk meg, hogy spektrofotometriás úton kimutatható szignált kapjunk, amely egyszerűen detektálható a fényelnyelés mérésével, például szokásos ELISA-olvasó alkalmazásával. Szokásosan alkalmazott ELISA-reagenseket is alkalmazhatunk, amelyek előnye, hogy a találmány szerinti eljárást kompatibilissé teszik a már alkalmazott eljárásokkal és klinikai laboratóriumokban szokásosan alkalmazott technológiákkal. Alkalmazhatunk azonban egyéb kimutatási/jel-előállítási rendszereket is, amelyek fluoreszcencia, kemilumineszcencia, stb. alapján kimutatható szignált hoznak létre.

A jel fokozására és az érzékenység növelésére alkalmazhatunk továbbá immun-enzimatisz amplifikálási eljárásokat is, például avidin-biotin eljárásokat, mint például a

Sigma cégtől hozzáférhető Extravidin rendszert. Biotinezett második ellenanyagokat alkalmazhatunk ELISA-reagensekként, peroxidáz-avidin komplexszel kombinálva. Mivel egy avidin molekula több biotin molekula megkötésére képes, az avidin-peroxidáz komplexek alkalmazása növeli a peroxidáz molekulák felszíni koncentrációját, még nagyobb érzékenységet kölcsönözve az eljárásnak.

A limfocitaroncsoláshoz és az ellenanyag-kötődés kimutatásához szükséges anyagok és eszközök ugyancsak biztosíthatók reagenskészlet formájában, a kötőpartnerrel bevont szilárd fázissal együtt.

A találmány szerinti eljárással kapott információkat kiegészíthetjük egyéb vizsgálati eljárásokkal kapott információkkal. További és használható adatokat kaphatunk a már korábban is jelenlévő szérum-/plazma-ellenanyagról klasszikus ELISA-eljárásokkal. Ezen felül, a limfocitáknak a vérmintából történő izolálását követően visszamaradó plazmafrakció alkalmas a már korábban is meglévő ellenanyagok kimutatására, a találmány szerinti eljárásban is alkalmazott kötőpartnerrel bevont szilárd fázis alkalmazásával.

A találmány szerinti eljárás megbízható működéséről úgy bizonyosodhatunk meg, ha megfelelő kontrollokat iktatunk be, és alkalmazunk újonnan szintetizálódott ellenanyagok jelenlétének kimutatására, vagy azok mennyiségének meghatározására. Azt például, hogy a tesztlyukakban kimutatott jel nem sporadikusan és nem-specifikus módon aktiválódott ("bystander") limfociták jelenlétének tudható be, negatív kontroll antigén alkalmazásával ellenőrizhetjük. Ez

az antigén olyan fertőző ágensből származhat, amely igen valószínűtlen, hogy a beteg akut betegségéért felelőssé tehető, az lehet például tetanusztoxoid. Az ilyen "bystander" aktivált limfociták száma minden esetben, minden körülmények mellett sokkal kisebb, mintsem az a találmány szerinti eljárás alkalmazásakor pozitív teszteredményhez vezethetne. A találmány szerinti megoldás kidolgozásánál figyelembe vettük ezt a szempontot.

A fent említettek szerint, a kivitelezés egyszerűsége és gyorsasága folytán a találmány szerinti eljárás alkalmasnak ígérkezik diagnosztikai vagy más klinikai, vagy állatorvosi alkalmazásra, például haltenyésztésnél történő alkalmazásra. A kis mintatérfogatokon felül további előny, hogy csak egy mintára van szükség, és nincs szükség a legtöbb hagyományos szerológiai tesztnél szokásos, 2-3 hetes időközönként levett szérumpárra. Nincs szükség különleges felszereltségre, és az eljárás könnyen automatizálható. Ezen felül, kívánt esetben lehetőség van különböző immunoglobulin-izotípusok tesztelésére.

A fent ismertetettek szerint, a találmány szerinti eljárás lehetőséget ad aktuális fertőzés létének kimutatására vagy mértékének meghatározására adott antigén elleni specifikus ellenanyagok spontán expressziójának analízisével. Ilyen eljárás nyilvánvalóan alkalmazható ismert betegségállapotok kimutatására, amelyek esetében a releváns immunogénre jellemző antigének rendelkezésre állnak, és a fertőzés specifikus markereiként szolgálhatnak. Egyes klinikai szituációkban azonban a specifikus betegség vagy fer-

tőzés nem azonosítható, és/vagy a megfelelő antigén nem áll rendelkezésre a vizsgálatban történő alkalmazásra.

Ilyen esetekben, a vizsgálati eljárás úgy módosítható, hogy a fertőzés nem-specifikus indikátorainak jelenlétét vagy mennyiségét mutassuk ki. Vizsgálhatunk például limfocitátartalmú mintákat, például teljes vért vagy abból előállított, tisztított vagy dúsított limfocitakészítményeket infekciós markerek, például citokinek vagy interferonok, például IL-2, IL-4 vagy interferon- γ termelésére.

A találmány egy további szempontja szerint tehát, szintén a találmány tárgyát képezi eljárás valamely immungén hatására termelődő infekciós indikátorok jelenlétének kimutatására vagy azok mennyiségének meghatározására mintában, amely szerint:

limfocitákat tartalmazó mintát nyerünk;

a limfocitákat roncsoljuk, ezáltal a kimutatandó infekciós indikátorokat felszabadítjuk, és

a felszabadult infekciós indikátorokat kimutatjuk, ezáltal meghatározzuk az infekciós indikátorok jelenlétét vagy mennyiségét a mintában.

A fenti eljáráshoz, a szilárd fázist megfelelő befogó molekulákkal, például a kimutatandó infekciós indikátor elleni ellenanyagokkal vonjuk be. A szilárd fázison immobilizált infekciós indikátorok jelenlétét a fent ismertetett eljárásokkal mutathatjuk ki, például jelölt ellenanyagok vagy ligandumok alkalmazásával. Ezzel az eljárással, az immobilizáló egység vagy kimutató molekula megfelelő megválasztásával, specifikus markereket azonosíthatunk.

Eljárhatunk például úgy, hogy a mintában található valamennyi molekulát a szilárd fázison immobilizáljuk, és a kimutatást jelölt, specifikus ellenanyag vagy ligandum alkalmazásával végezzük. További lehetőség szerint, specifikus kötőpartnert alkalmazhatunk megfelelő infekciós indikátorok immobilizálására, melyeket ezután kívánság szerint, pozitív vagy negatív módon jelölhetünk; az előbbi esetben eljárhatunk például úgy, hogy a jelölést az infekciós indikátoron jelenlévő, de azon kívül elő nem forduló doménhoz kötjük, a második esetben pedig a szilárd fázison található, le nem kötött kötőpartnert láthatjuk el jelöléssel. Szintén a találmány tárgyát képezik a fenti eljárás kivitelezésére alkalmas reagenskészletek.

Az 1. ábrán influenzavakcina klinikai kipróbálásának eredményeit ábrázoltuk, amelyben 9 egyéntől származó mintákat (2-10. személyektől származó mintákat) teszteltünk a limfocitaroncsolási eljárással. Valamennyi oszlopgrafikonon, a bal oldali skálán, H3N2 elleni IgG mennyiségét ábrázoltuk ng egységekben, a horizontális skálán pedig a vakcinázástól számított napok számát jelöltük. Mindegyik oszlopgrafikonra pontozott vonallal felvittük az A/Nanchong vírus elleni HI-titerek, amelyek a jobb oldali skálán olvashatók le. További részleteket lásd az 1. és 2. példa ismertetésénél.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban a csatolt konkrét megvalósítási példákon keresztül részletesen is ismertetjük, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk.

1. példa

A vizsgált alany 25 éves férfi volt, nevének kezdőbetűi LOH. A vérmintát klasszikus klinikai influenza-szerű megbetegedést követő 9. napon vettük le. A helyi közösségben influenza A és B vegyes járványt jegyeztek fel.

Limfociták szeparálása. Perifériás vénás vérmintát vettünk le, a véralvadást heparinnal gátoltuk. A limfocitákat Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo) készítményen választottuk el a gyártó utasításai szerint, kivéve, hogy a heparinizált vért az első centrifugálás előtt kétszeres térfogatú foszfátpufferes fiziológiás sóoldattal (PBS, pH=7,2) elegyítettük, azonos térfogatú helyett. A sejttöledéket két további mosási ciklusnak vetettük alá. A limfociták számát hemocitóméterben határoztuk meg, kék dextrán kizárásos eljárással.

Limfociták roncsolása. Limfociták fokozatosan emelkedő mennyiségét roncsolópufferben roncsoltuk [10 mmol/l Tris-HCl (pH=7,4), 0,5% dezoxikolát, 2 µg/ml pepsztatin A [Sigma P-4265, gyártási szám (gy. sz.): 18H0551], 2 µg/ml leupeptin (Sigma, L-0649, gy. sz.: 77H86221), 0,5% aprotinin (Sigma, A-6279, gy. sz.: 87H86221), 1 mmol/l PMSF (Sigma P-7626, gy. sz.: 48H1265)] az alábbi referencia alapján: Spector DL, Goldman RD és Leinwand LA: "Cells. A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998), 1. kötet, 74.6 fejezet, majd az így kapott mintát ELISA-vizsgálatnak vetettük alá (lásd az 1. táblázatot).

ELISA-lemezek érzékenyítése és blokkolása. Greiner gyártmányú, F-formájú, közepes kötőkapacitású [Cat #655001 (gy. sz.: 98 26 01 48), D-72636 Frickenhausen, Németország] mikrolemezeket alkalmaztunk. Influenza elleni ellenanyagok vizsgálatához A/Nanchang/933/95 (H3N2) felszíni vírus-antigén (10 µg/ml, PBS-ben) 100 µl-ét, valamint B/Harbin/07/94 felszíni vírusantigén (10 µg/ml, PBS-ben) 100 µl-ét mértük a lyukakba. Általános IgG ellenanyagok vizsgálata céljából kecskében termelt, humán IgG elleni (γ-láncra specifikus) (Sigma I-7883, gy. sz.: 76H8895) szérum 100 µl-ét (1:500 hígítás, PBS-ben) mértük be a lyukakba. Az érzékenyítést 4°C-on végeztük, éjszakán át. A blokkolást 10% magzati borjúsérumot (FCS) tartalmazó PBS-sel végeztük egy órán át, szobahőmérsékleten. Az egyes, egymást követő lépések között a lemezeket 0,05% Tween-20 reagenssel kiegészített PBS-sel ötször mostuk.

A minták felhelyezése a lemezekre. Az influenza elleni IgG ellenanyagokat, az általános IgG ellenanyagokat, valamint humán IgG standardokat azonos immunlemezen vizsgáltunk. Minden vizsgálatot két párhuzamossal végeztünk.

A vizsgálati minták. A vizsgálati minta a LOH "szérum" (plazma 1:3 hígítása) volt. Tömény és tízszeres hígítások (a hígítóoldat 0,05% Tween-20 reagenssel és 5% FCS-sel kiegészített PBS volt) 100 µl-ét mértük be a lyukakba.

Az IgG standard (Sigma I-4506, gy. sz.: 96H8840) 10 µg/ml koncentrációjú és tízszeres hígításainak (a hígítóoldat 0,05% Tween-20 reagenssel és 5% FCS-sel kiegészített PBS volt) 100 µl-ét mértük a lyukakba.

A végső sejtüledék 300 μ l-e 1:9,368 hígítású szérumot tartalmazó PBS oldatban volt. Ehhez az üledékhez 700 μ l PBS-t adtunk (= 1:3,33 hígítás). A végső üledék $2,0 \times 10^7$ sejtet és 1:31,200 hígítású szérumkontaminációt tartalmazott. A vizsgált végső felülúszó a szérum 1:9,370 hígításával volt ekvivalens.

A sejtlizátumokat úgy állítottuk be, hogy lyukanként 800 000 vagy 200 000 vagy 50 000 sejt legyen jelen, 100 μ l térfogatban.

1. táblázat

Sejtlizátumok elegyének vizsgálata

Sejt-szám/lyuk	Sejt-üledék μ l	Roncsoló puffer μ l	Hígító puffer μ l	Össz-térfo-gat μ l	Hígítás a végső sejtmosáshoz képest
800,000	240	240	126	606	1: (2,53x3,33)
200,000	60	60	486	606	1: (10,1x3,33)
50,000	15	15	576	606	1:40,4x3,33

A sejt készítményeknek a végső sejtmosáshoz viszonyított szérum-ellenanyagokkal való kontaminációját az alábbiak szerint számoltuk:

800 000 sejt esetében 1:8,4 (10,6%)

200 000 sejt esetében 1:33,7 (2,9%) és

50 000 sejt esetében 1:134,8 (0,7%).

Minden ellenanyag-mintát 90 percen át inkubáltunk szobahőmérsékleten.

Második ellenanyagként biotinnal jelölt, kecskében termelt, humán IgG elleni ellenanyagot (γ -lánc specifikus, Sigma E-2886, gy. sz.: 28H4824) alkalmaztunk, 0,05% Tween-20 reagenssel és 5% FCS-sel kiegészített PBS-ben 1:500 arányban hígítva, lyukanként 100 μ l térfogatban. Az inkubálás 60 percen át tartott, szobahőmérsékleten.

Konjugátumként ExtrAvidin-peroxidáz konjugátumot alkalmaztunk (Sigma E-2886, gy. sz.:28H4824), 0,05% Tween-20 reagenssel és 5% FCS-sel kiegészített PBS-ben 1:1000 arányban hígítva, lyukanként 100 μ l térfogatban. Az inkubálást 60 percen át végeztük, szobahőmérsékleten.

Az előhívást orto-fenilén-diamin-dihidroklorid szubsztráttablettákkal (Sigma P-8287, gy. sz.: 88H8250) végeztük. Egy tablettát (10 mg) 25 ml, 0,1 mol/l koncentrációjú foszfát-citrát pufferben (pH=5,0) oldottunk, amelyet 20 μ l perhidrollal (30% H₂O₂) egészítettünk ki. Száz (100) μ l szubsztrát oldatot mértünk be lyukanként, és a reakciót 10 perc múlva állítottuk le, lyukanként 50 μ l térfogatnyi, 1 mol/l koncentrációjú H₂SO₄ hozzáadásával. Az optikai denzitást 492 nm hullámhosszon olvastuk le „Titertek Multiscan PLUS” leolvasó berendezéssel (Flow Laboratories).

Az IgG mennyiségét az IgG standard hígításaiból kapott standard görbére alapozott interpolációval határoztuk meg. Minden vizsgálati mintát két párhuzamos alkalmazásával vizsgáltunk, és az átlagos optikai denzitás értékeket vettük figyelembe a számítások során.

2. táblázat

Szérum IgG ellenanyagok

Ellenanyagok	Szérum ellenanyagok (µg/ml)	%
IgG általában	2,365	100,0
Influenza B elleni	70	3,0
Influenza A elleni	112	4,8

3. táblázat

IgG-ellenanyagok kiszabadulása roncsolt limfocitákból

Specificitás	Lukaként 100 µl-ben található limfociták száma	A lukakban kimutatott IgG (ng)	A sejtek szérum-IgG kontaminációja (ng)	A lukakban mért limfocitákból származó összes IgG (ng)	Az egyes limfocitákból származó összes IgG (10 ⁻⁵ ng)
Influenza A	50	1.06	$0.338/134.8 = 2.5 \cdot 10^{-3}$	1.06	2.12
	200	10.72	$0.338/33.7 = 10.0 \cdot 10^{-3}$	10.71	5.35
Influenza B	200	0.38	alul detektálva	0.38	0.19
	800	1.29	alább detektálva	1.29	0.16
IgG generális	50	13.29	$10.6/134.8 = 0.08$	13.21	26.42
	200	44.6	$10.6/33.7 = 0.32$	44.28	22.14



4. táblázat

Összefoglalás: IgG kimutatása perifériás vér eredetű
limfocitákból és szérumból

Ellen- anyag specifíci tás	A limfociták összes IgG- tartalma lyukan- ként (10-5 ng)	%	Szérum IgG (µg/ml)	%
Influenza A	3,74	15,4	112	4,8
Influenza B	0,18	0,7	70	3,0
IgG álta- lában	24,28	100,0	2.365	100,0

Vizsgálatainkból azt a következtetést vontuk le, hogy LOH alanyunk influenza A vírussal fertőződött, amint azt a 3. táblázat mutatja. Ezen adatok szerint feltételezzük, hogy lyukanként 105 limfocita körülbelül 20 ng/ml influenza A elleni IgG ellenanyagokat ad, szemben a körülbelül 2 ng/ml influenza B elleni ellenanyaggal. A sejtek előző mennyisége gyakorlati célra olyan influenza A specifikus ellenanyag ELISA-szignált ad, amely kényelmesen mérhető, nem így az influenza B elleni ellenanyagok. Ez ellentmondást mutat a szérumban mért influenza elleni ellenanyagok szintjével (2. táblázat), amely szerint az influenza A és B elleni ellenanyagok szintje nagyon hasonló. Az ilyen szé-

rum-ellenanyagok nagy valószínűséggel már meglévő, kereszt-reagáló ellenanyagok, amelyek korábbi fertőzésekből származnak. Évek óta ismert és kimutatott jelenség, hogy az influenza elleni memória reaktiválódhat heterológ vírusokkal történő későbbi fertőzés révén, az úgynevezett "antigénbűn" ("antigenic sin") jelenség szerint, valószínűleg abban a limfoid szövetben bekövetkező "bystander" (közvetlen környezetet érintő) hatásra, amelyben a kezdeti immunfolyamat lezajlik.

Annak oka, hogy vizsgálatunkban a roncsolt limfocitákból származó ellenanyagok is mérhető, bár alacsony ELISA-szignált mutatnak az influenza B antigénre, azaz nem a LOH alanyunkat megtámadó vírusra, lehet memória-limfociták ilyen nem-specifikus reaktiválódása az influenza A vírus támadása következményeként. A memóriasejtek ilyen szokatlan reaktiválódása azonban az influenzával összefüggő jelenség, és más fertőző ágensekre nem jellemző. Ennek megfelelően arra lehet számítani, hogy a kérdéses fertőző ágensből, és más ágensekből származó antigénre adott szignálok között még tisztább elkülönülést figyelhetünk meg.

Eljárásunk az egyes vizsgálni szándékozott antigén-specifikus ellenanyagonként 100 µl heparinnal kezelt vért (ez megfelel 105 limfocitának) igényel, ami lehetővé teszi kapillárisal levett vérminták alkalmazását.

2. példa

Az alábbiakban egy klinikai, influenza elleni vakcinázási vizsgálatot ismertetünk.

Kilenc egészséges alanyt, hat 24-27 éves nőt (átlagéletkoruk 26,2) és három 24-31 éves férfit (átlagéletkoruk 28,3) vontunk be a vizsgálatba. A vizsgálatot vezető orvos tájékoztatta őket a vakcinázás megfelelő ellenjavallatairól, és ők közölték, hogy ilyen ellenjavallatokról nem tudnak. Korábban egyikőjük sem volt influenza ellen vakcinázva. Minden vakcinázott alany végigcsinálta a vizsgálatot, és hozzájárult az alábbiakban ismertetett eljárással történő, perifériás vérminta levételéhez. Az alanyok engedélyezett, trivalens, inaktivált, teljes vírust tartalmazó vakcinát kaptak (Vaxigrip), amely a következőket tartalmazott:

dózisonként 15 µg hemagglutinint tartalmazó
A/Sydney/5/97(H3N2) szerű vírust;

dózisonként 15 µg hemagglutinint tartalmazó
A/Beijing/262/95(H1N1) szerű vírust;

dózisonként 15 µg hemagglutinint tartalmazó
B/Beijing/184/93 szerű vírust;

a vakcinák a Mérieux Sérums & Vaccines cégtől származtak (Franciaország).

Heparinozott vérmintákat vettünk az 1. példában ismertettek szerint. Minden eljárást az 1. példában ismertettek szerint végeztünk, kivéve, hogy a limfocitákat fagyasztással és olvasztással (kétszer) roncsoltuk úgy, hogy a limfocitákat tartalmazó csöveket folyékony nitrogénbe mártottuk, majd csapvíz alá tartottuk.

Végeztünk továbbá hemagglutinációgátlási vizsgálatot receptorroncsoló enzimmel kezelt plazmamintákkal, Kendal és munkatársai standard eljárásával [“Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance;”, Viral Disease Unit, WHO, Genf], A/Nanchang vírus 4 hemagglutináló egységgel és 0,7% pulykaeredetű eritrocitával. A plazmákat kétszeres tova futó hígításban vizsgáltuk és titerként annak a legmagasabb hígításnak a reciprokát jelöltük meg, amely a vírus-hemagglutináció teljes gátlását okozta.

A vakcinázás napján, 7 nap múlva és 13 nap múlva vett mintákat vizsgáltuk.

Az 1. ábra a rokon A/Nanchang/933/95(H3N2) (lásd az 1. példát) eredetű felszíni antigén elleni IgG mennyiségét mutatja (ng egységekben), 300 000 roncsolt limfocitából előállított oldatot alkalmazva, mind a 9 vakcinázott alany esetében (oszlopok). Az ábrákat a roncsolt limfocitákból nyert, influenza-specifikus IgG ellenanyagok mennyisége szerint raktuk sorba (1/5-5/5). A baloldali, ng IgG-skála alanyonként nem azonos. Az ábrákon felül nyomással ábrázoltuk az A/Nanchang vírus elleni HI-titerek (pontozott vonal). Nemzetközi konszenzus szerint a 40-es értéknél nagyobb vagy egyenlő titer protektív hatással van.

Klasszikus értelemben, a HI ellenanyagokat “arany standard” influenza elleni ellenanyagoknak tekintik, a vírus-neutralizáló ellenanyagokkal együtt. A 40-es értéknél nagyobb, vagy egyenlő titereket nemzetközi konszenzus szerint protektívnek tekintik. Az 1. ábra azt mutatja, hogy a 9 alanyból 4 (2, 5-7 személyek) mutat ilyen ellenanyagokat

a 7. napon, és minden alany, kivéve a 3-as és 10-es, rendelkezett ilyen HI-titerekkel a 13. napon. Minden alany esetében, már a 7. napon találtunk magas szintű, roncsolt limfocitákból kimutatható, influenza-specifikus IgG-t, és 5 alanyból (a 3-as, 4-es és 8-10-es személyekből) csak roncsolt limfocitából származó ellenanyagokat és nem protektív HI-ellenanyagokat mutattunk ki a 7. napon.

Ráadásul, az influenza elleni IgG-ellenanyagok specifitása nyilvánvaló volt az ilyen ellenanyagok 7. napon történő megjelenése, valamint a 13. napon történő eltűnése alapján, mivel a 13. napon a legtöbb alany a szérum-ellenanyagok jelentős szintjét mutatta.

A 2. példa világosan mutatja, hogy a roncsolt limfocitákból kimutatott ellenanyagok nem kontaminálódtak a sejttöredékekben rekedt szérum-ellenanyagokkal, amint azt az 1. példában is világosan kimutattuk.

3. példa

Egyszerűsített eljárás limfociták szérum- és plazma-nyomoktól történő megtisztítására

Limfocitáknak kontamináló szérum- és plazma-ellenanyagoktól lényegében történő megtisztítása jellemzően három egymást követő centrifugálással lehetséges. Háromszáz µl teljes vért 10 ml olyan hígítóval elegyítünk, amely két rész PBS-t és 1 rész desztillált vizet tartalmaz. Az elegyet 20 percen át 400 g mellett centrifugáljuk, szobahőmérsékleten. A felülúszót elöntjük, és az üledékhez 10 ml PBS-t adunk. A szuszpenziót a fentiek szerint centrifugáljuk,

és a ciklust még egyszer ismételjük. A végső sejttöledéket 100 μ l PBS-ben szuszpendálva, limfocitaforrásként alkalmazzuk a későbbi vizsgálatokban.

4. példa

Vér tárolása limfociták tisztítása előtt

Férfi alanyunknak (EJAa, 20 éves) engedélyezett, inaktivált, trivalens influenzavakcinát adtunk a gyártó cég utasításai szerint (lásd a 2. példát). Öt ml heparinózott vért vettünk a vakcinázás napján (0. nap) és 9 nappal a vakcinázást követően. Háromszáz (300) μ l vért a levételt követően azonnal három mosási és centrifugálási ciklusnak vetettünk alá, amint azt a 3. példában ismertettük, és a limfocitákat az 1. példában ismertettek szerint roncsoltuk. A maradék vérmintát 4 napon át 4°C-on tároltuk, ezt követően 4 órán át szobahőmérsékleten tároltuk, mielőtt újra elkezdtük a limfocita-tisztítást. Minden ezt követő ELISA-vizsgálatot az 1. példában ismertettek szerint végeztünk. A hemagglutinációgátlási (HI) vizsgálatokat homolog vakcinatörzsekkel végeztük, amint azt a 2. példában ismertettük.

5. táblázat

Vér tárolása 4 napon át, 4°C-on, majd 4 órán át szobahőmérsékleten. A tárolás hatása a roncsolt limfocitákból származó ellenanyagokra

Vakcinálás után eltelt napok száma		H3N2		H1N1		B	
		Azonnali	Négy nap elteltével	Azonnali	Négy nap elteltével	Azonnali	Négy nap elteltével
0. nap	HI	640		<10		<10	
	Sejtek	704	5698	058	060	224	210
9. nap	HI	640		20		40	
	Sejtek	811	901	091	100	466	446

A táblázat minden adata 492 nm-en mért optikai denzitás ezerszerese és plazma-ellenanyagok HI-titere. A "sejtek" 100 µl vérből kapott, roncsolt limfocitákból származó ellenanyagok.

Ennek az alanyunknak már a vakcinázást megelőzően jelentős titere volt az A/Sidney/5/97(H3N2) vakcinakomponens ellen, és a limfocitákból kiszabaduló ellenanyagok, valamint a HI titer nem emelkedtek jelentősen a 0. és a 9. nap között. Az A/Beijing/262/95 vírus H1N1-komponense elleni HI vakcinaválasza gyenge volt, és ez meglátszott a sejtes vizsgálat esetében is. A legegységesebb válasz a B/Beijing/184/93 influenza B komponens ellen volt kimutat-

ható, ahol a HI-titerek <10-ről 40-ig emelkedtek. Ezt a sejtes vizsgálat is tükrözte.

A vérminta 4°C-on, 4 napon át tartó tárolása, amelyet 4 órán át, szobahőmérsékleten való tárolás követett, nem volt hatással a roncsolt limfocitákból származó, feljegyzett ellenanyag-aktivitásra. Az azonnali eredmények, és a négy napos tárolás utáni eredmények nem tértek el lényeges mértékben.

Más vizsgálatok szintén azt mutatták, hogy hasonló körülmények mellett, hat nap elteltével (hűtés, amelyet 6 órás, szobahőmérsékleten történő tárolás követ), nem befolyásolja a roncsolt limfocitákból történő ellenanyag-meghatározást.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás újonnan szintetizálódott, immunogénre adott válaszként képződött ellenanyagok jelenlétének kimutatására vagy mennyiségének meghatározására testfolyadék-mintában vagy nyirokrendszerből származó mintában, azzal jellemezve, hogy:

- limfocitákat tartalmazó mintában, amelyeket a limfocitákkal asszociált, szintetizált ellenanyagok vagy fragmentumaik felszabadítására roncsoltunk, kimutatjuk a felszabadult ellenanyagokat vagy fragmentumaikat, ezáltal a mintában kimutatjuk az újonnan szintetizált ellenanyagok jelenlétét vagy mennyiségét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy:

- limfocitákat tartalmazó mintát nyerünk;
- a limfocitákat roncsoljuk, ezáltal a limfocitákkal asszociált ellenanyagokat vagy fragmentumaikat felszabadítjuk; és

- kimutatjuk a felszabadult ellenanyagokat vagy fragmentumaikat, miáltal meghatározzuk a mintában található, újonnan szintetizált ellenanyagok jelenlétét vagy mennyiségét.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyagokat nyirokszövetből, nyirokfolyadékból vagy vérmintából mutatjuk ki.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ellenanyagokat perifériás vérből mutatjuk ki.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy annak alkalmazását megelőzően a mintát nem inkubáljuk az ellenanyagok szintézisének vagy szekréciójának elősegítésére.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a limfocitákat fizikai roncsolással, vagy sejtroncsoló pufferekkel vagy oldatokkal roncsoljuk.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ellenanyagokat vagy fragmentumaikat egy vagy több, az ellenanyagokat vagy fragmentumaikat felismerő antigénhez történő kötődés alapján mutatjuk ki.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a felszabadított ellenanyagokat szilárd fázisú kötődési vizsgálattal mutatjuk ki.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szilárd fázisként egy vagy több, a kimutatandó ellenanyag vagy ellenanyagok vagy fragmentumaik (célellenanyagok) által felismert antigént (szilárd fázisú antigéneket) hordozó fázist alkalmazunk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szilárd fázisként egy vagy több, a kimutatandó ellenanyagot vagy ellenanyagokat vagy fragmentumaikat (célellenanyagokat) felismerő ellenanyagot (szilárd fázisú ellenanyagot) hordozó fázist alkalmazunk.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ellenanyagokat újszülött- vagy csecsemőeredetű vérmintákból mutatjuk ki, miáltal különbsé-

get teszünk az újonnan szintetizálódott és passzív módon átvitt, anyai ellenanyagok között.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a limfociták roncsolását megelőzően vagy a roncsolást követően, de a kimutatást megelőzően a mintát körülbelül 4°C-on vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten tároljuk.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárásban vérmintaként vagy a limfociták izolálására alkalmazott mintaként kevesebb, mint 1 ml térfogatú vérmintát alkalmazunk.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárásban a mintából közvetlenül izolált limfocitákat alkalmazunk.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kimutatást immunvizsgálattal, előnyösen ELISA-vizsgálattal végezzük.

16. Az 8-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy vagy több antigént, amelyet vagy amelyeket a szilárd fázisra immobilizált céllenanyagok felismernek, érintkeztetünk a szilárd fázissal.

17. Az 8-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy egy vagy több ellenanyagot, amely vagy amelyek felismerik a szilárd fázisra immobilizált céllenanyagokat, érintkeztetünk a szilárd fázissal.

18. Az 1-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kimutatáshoz spektrofotometriás úton kimutatható szignált eredményező oldható szubsztrátot alkalmazunk.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy negatív kontroll antigént alkalmazunk.

20. Az 8-19. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy többféle, különböző célantigéneket hordozó szilárd fázist alkalmazunk.

21. Eljárás immunogén által kiváltott fertőzés diagnosztizálására vagy monitorozására humán vagy nem-humán állatban vagy annak részében, *azzal jellemezve*, hogy:

limfocitataralmú mintát veszünk az állattól///;

az 1-20. igénypontok bármelyike szerinti eljárással meghatározzuk a limfocitákkal asszociált, az immunogén ellen irányuló, újonnan szintetizálódott ellenanyagok vagy azok fragmentumai jelenlétét vagy mennyiségét; és

megfelelő kontroll és/vagy referenciamintákhoz történő viszonyítás alapján megállapítjuk az immunogén által kiváltott fertőzés tényét vagy mértékét (súlyosságát).

22. Az 1-21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az immunogén bakteriális vagy virális antigén, és az eljárással olyan baktérium vagy vírus által kiváltott fertőzést diagnosztizálunk vagy monitorozunk, amelyből az immunogén származik.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy herpes simplex vírus, citomegalovírus, humán immundeficiencia vírus (HIV), valamely hepatitis vírus, Toxoplasma vagy Epstein-Barr vírus (EBV) eredetű antigén által kiváltott fertőzést diagnosztizálunk vagy monitorozunk.

24. Eljárás immunogén hatására termelődő infekciós indikátorok jelenlétének kimutatására vagy mennyiségének meghatározására valamely mintában, *azzal jellemezve*, hogy:

limfocitákat tartalmazó mintát nyerünk;

a limfocitákat roncsoljuk, ezáltal a kimutatandó infekciós indikátorokat felszabadítjuk, és

az 1-20. igénypontok bármelyike szerinti eljárással kimutatjuk a felszabadult infekciós indikátorokat, ezáltal meghatározzuk az infekciós indikátorok jelenlétét vagy mennyiségét a mintában.

BS+T=Held



2005.07.11.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

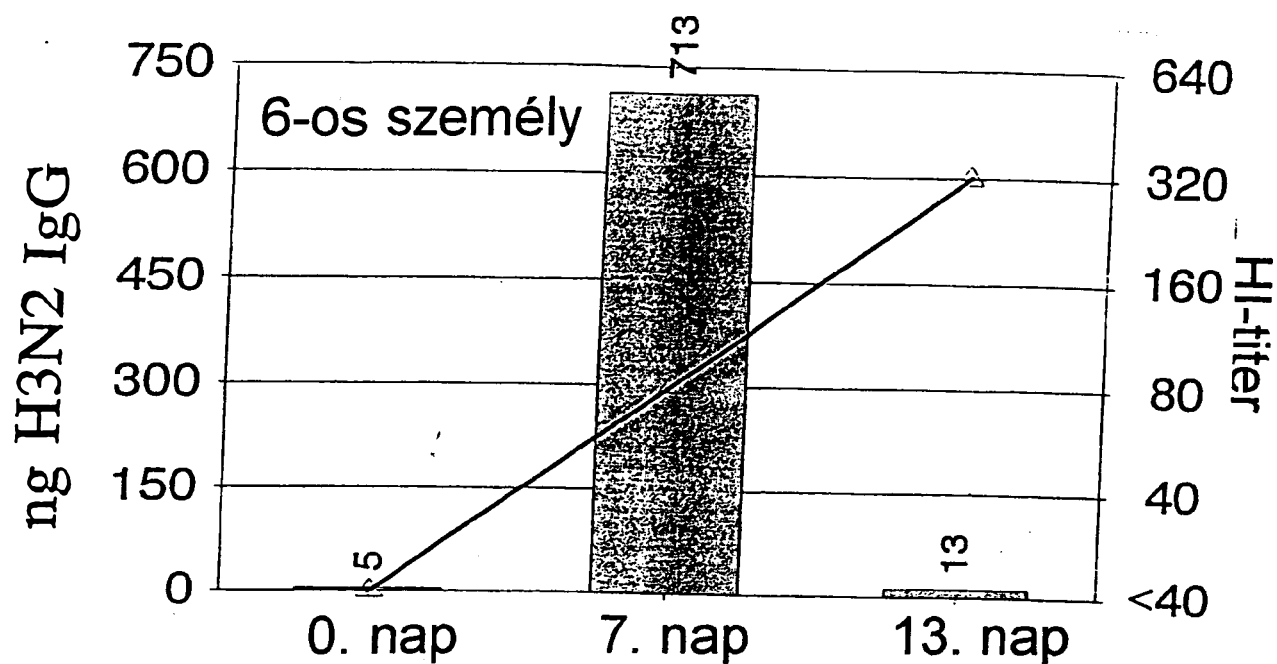


Svingor Ádám

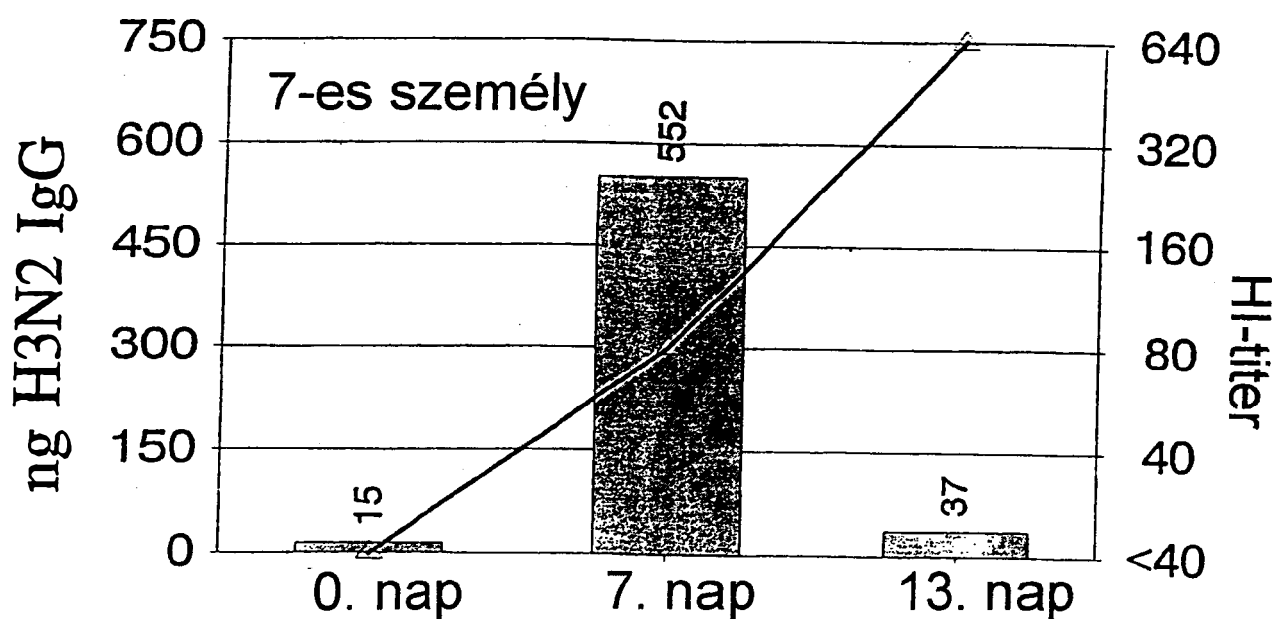
szabadalmi ügyvivőjelölt

PCT/GB00/02316

1/5

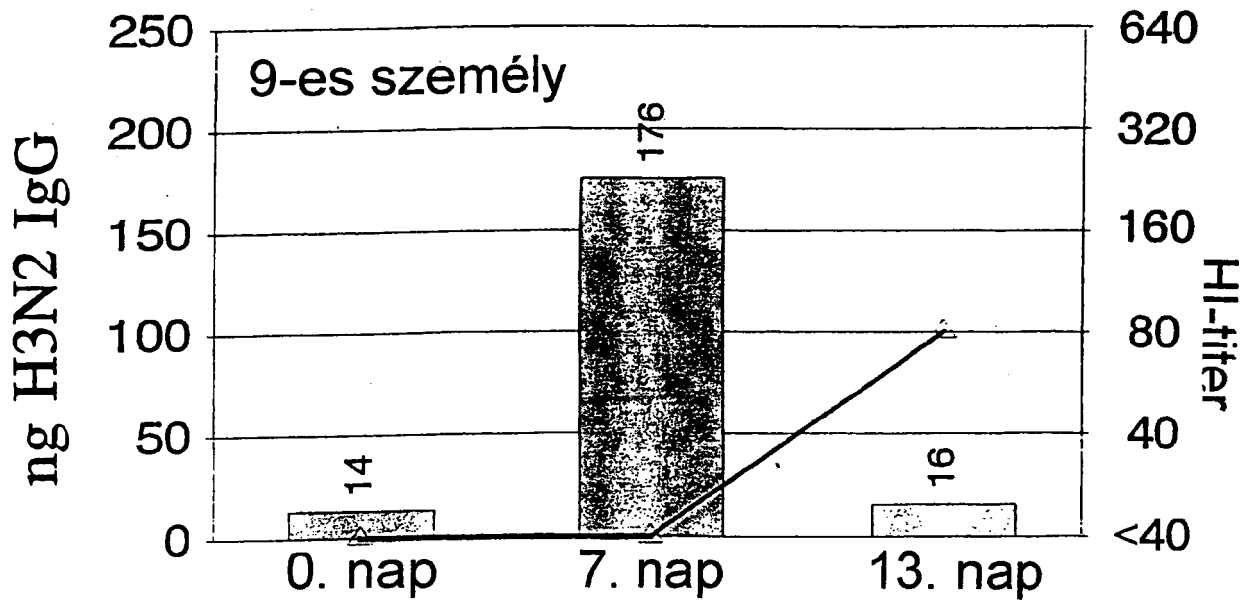
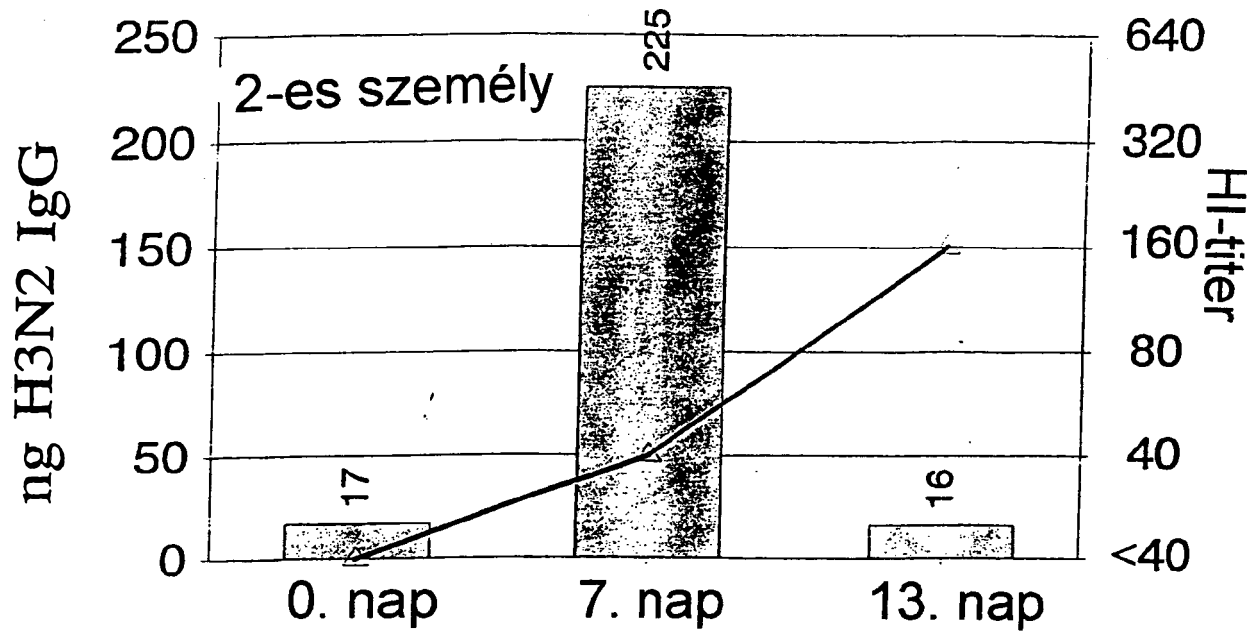


Vakcinázást követő napok száma

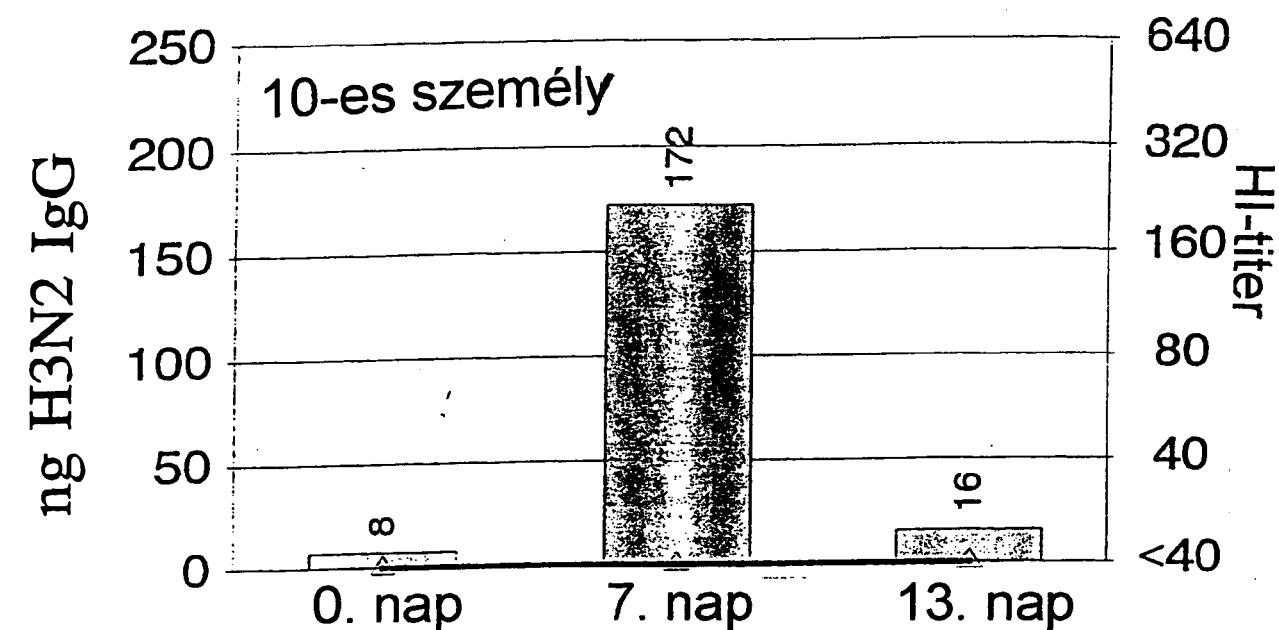


Vakcinázást követő napok száma

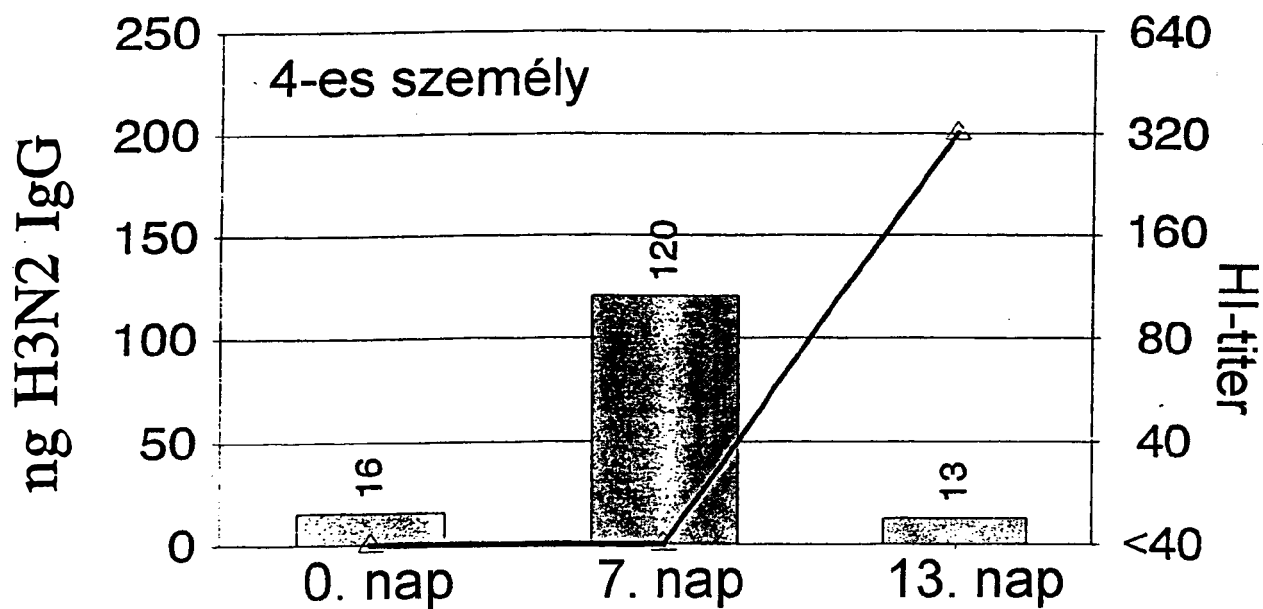
1. ábra



1. ábra (folytatás)



Vakcinázást követő napok száma

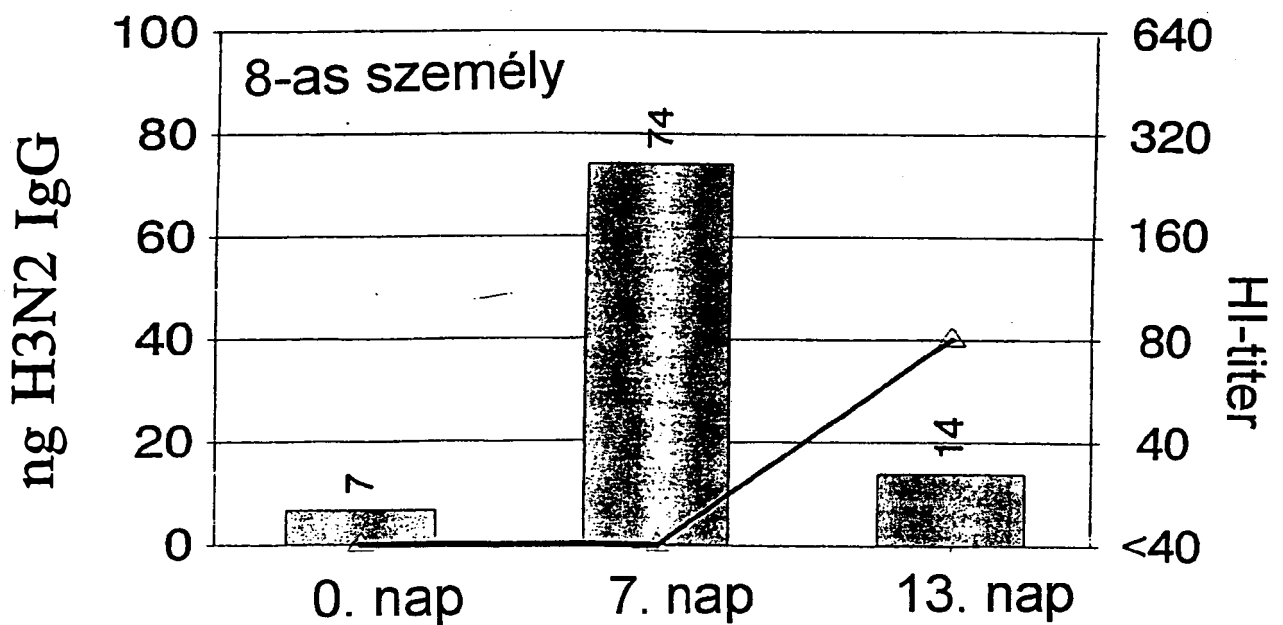
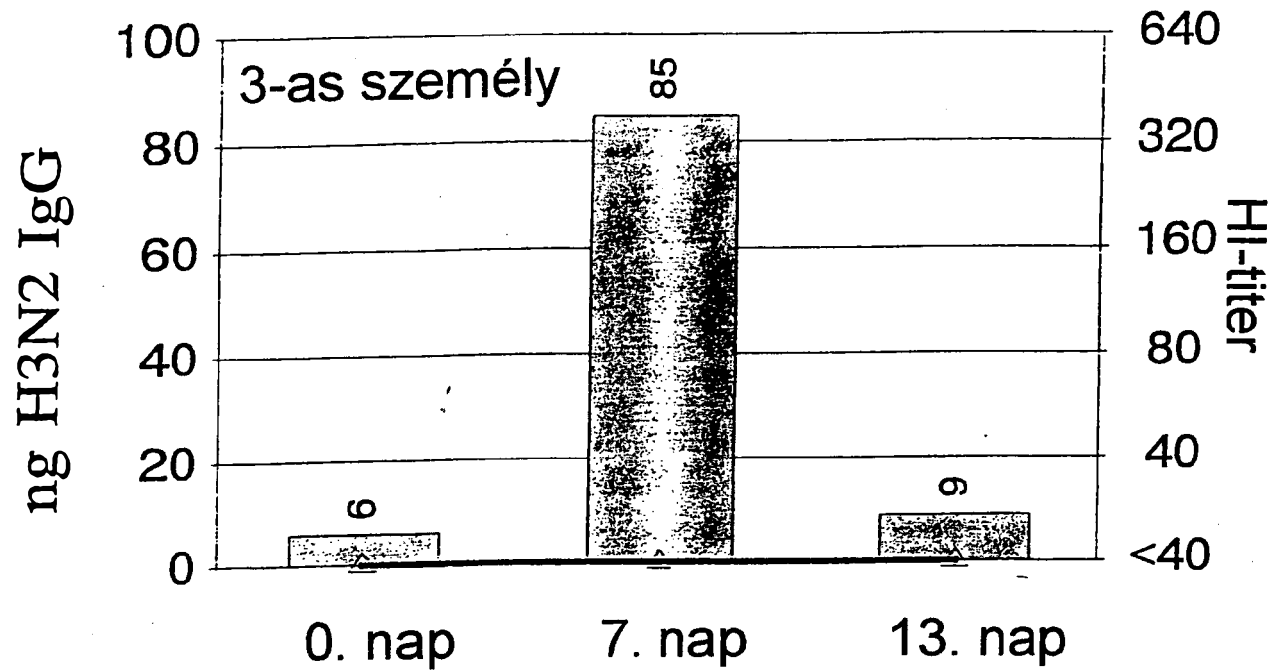


Vakcinázást követő napok száma

1. ábra (folytatás)

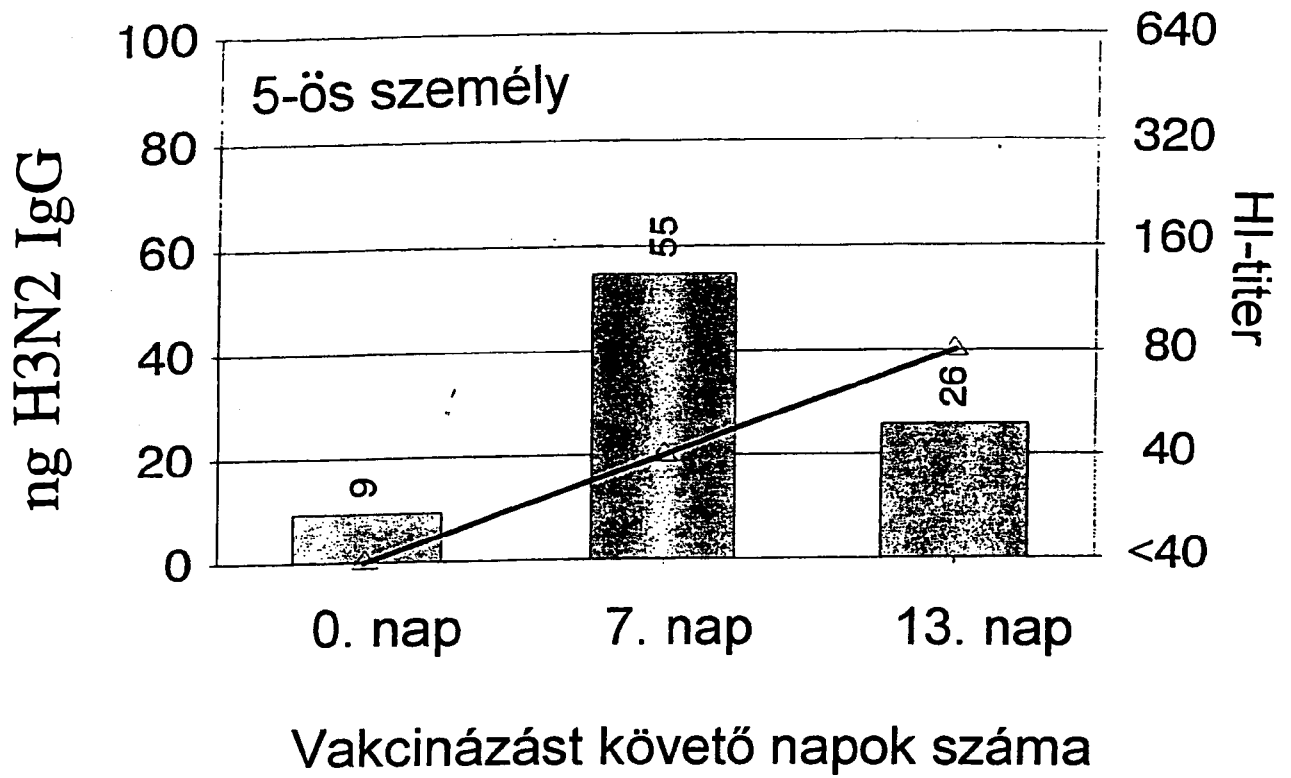
PCT/GB00/02316

4/5



Vakcinázást követő napok száma

1. ábra (folytatás)



1. ábra (folytatás)