

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

65086

Patent dodatkowy
do patentu _____

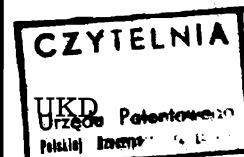
Kl. 42I, 3/54

Zgłoszono: 12.VI.1967 (P 121 021)

Pierwszeństwo: 17.VI.1966 Stany Zjednoczo-
ne Ameryki

MKP G01n 33/16

Opublikowano: 30.VI.1972



Współtwórcy wynalazku: Alice Reiss, Rosemary Chachowski

Właściciel patentu: Ortho Pharmaceutical Company, Raritan, New Jersey
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Środek do oznaczania czynnika goścowego w płynach ustroju

1

Przedmiotem wynalazku jest środek do ilościowego oznaczania czynnika goścowego w płynach ustroju.

Surowice wielu chorych na gościec pierwotnie przewlekły zawierają gamma globuliny o wysokim ciężarze cząsteczkowym i o stałej opadania 19S. Te składniki białkowe noszą nazwę czynników goścowych i ich oznaczanie jest dogodną metodą wczesnego rozpoznawania gościa pierwotnie przewlekłego.

Do wykrywania czynników goścowych stosuje się cząstki nie mające charakteru cząstek biologicznych, jak lateks polistyrenowy, żywice akrylowe oraz bentonit, uczulone ludzką gamma globuliną (opis patentowy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3088875). Pomimo, że odczynniki te są szeroko stosowane, dają one wyniki jedynie wstępne, z uwagi na dużą czułość, często dają one fałszywe wyniki pozytywne, jak to opisują Heiner i Rudd, Arth. and Rheumat. 5, 110, (1962). Próby ilościowego określenia czynnika goścowego u chorych, prowadzone w próbówce, za pomocą tych uczulonych cząstek często jednak dają astronomicznie wysokie miana, które bardziej wiążą się z danym preparatem ludzkiej globuliny użytej do uczulania, niż ze stanem chorobowym badanej osoby.

Do oznaczania czynnika goścowego stosuje się również cząstki biologiczne. Jeżeli stosuje się ludzkie krwinki czerwone, wówczas do uczulania używa się wybraną, ludzką gamma globulinę, zawie-

2

rającą specyficzny czynnik nie aglutynujący anty — D (Rh₀), lub też krwinki czerwone traktuje się najpierw środkiem, takim jak kwas taninowy, który zmienia właściwości powierzchni tak, że białko jest łatwo ale nieswoiście adsorbowane. Żaden z tych środków nie znalazł szerokiego zastosowania, w przeciwieństwie do próby czerwonych krwinek owiec-królików, opisaną po raz pierwszy przez Waaler'a [Acta Path. Microbiol. Scand., 17, 172 (1940)] i następnie przez Rose i in. [Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 68, 1 (1948)].

Aczkolwiek specyficzny charakter próby z krwinkami owczymi nie jest znany, to jednak specyfika ta została wykazana wielokrotnie w klinicznych badaniach pacjentów, których surowica przy tym badaniu dawała wyniki pozytywne. Miana uzyskiwane w próbówce rzadko przekraczały 1 : 5000 i nie zgadzały się z wynikami uzyskiwanymi przy użyciu taninowanych i uczulonych krwinek czerwonych lub uczulonego lateksu, sięgającymi poza 1 : 100000.

Pomimo pewności próby Waaler-Rose, badanie przy użyciu krwinek owczych nie jest rozpowszechnione ze względu na nietrwałość nośnika czerwonych krwinek, bowiem normalizowanie i uczulanie czerwonych krwinek zajmuje wiele czasu, a należy je przeprowadzać często.

Środek według wynalazku umożliwia przeprowadzanie prób potwierdzających badanie w próbówce i nadaje się do stosowania w przypadkach, w któ-

rych przy użyciu szybkiego badania wstępnego uzyskuje się wynik pozytywny. Środek według wynalazku może być stosowany do sprawdzania wyników uzyskanych przy badaniu metodą czerwonych krwinek owczych.

Środek według wynalazku składa się z zawiesiny stałych silnie rozdrobnionych cząstek polimeru o przeciętnej średnicy 0,15 — 14 mikronów w cieczy polarnej, przy czym cząstki te są w celu uczulenia pokryte króliczą gamma globuliną, poddaną działaniu proteolitycznego enzymu. Jako cząstki polimeru szczególnie korzystnie stosuje się cząstki polistyrenu o przeciętnej średnicy 0,81 mikrona lub cząstki polimeru akrylowego.

Badanie za pomocą środka według wynalazku prowadzi się w ten sposób, że w szeregu probówek przygotowuje się podwójnie rozcieńczone mieszaniny surowicy krwi w substancji buforującej jako rozcieńczalniku i dodaje taką samą objętość środka lateksowego. Probówki z mieszaniną surowicy i środka lateksowego ogrzewa się w temperaturze 56°C w ciągu 2 godzin, a następnie pozostawia przez noc w temperaturze 4°C. Jeżeli surowica zawiera czynniki gośćcowe, wówczas reakcja uwiadczenia się w zlepianiu się cząstek odczynnika lateksowego. Jeżeli zaś czynników gośćcowych nie ma, to lateks pozostaje równomiernie zawieszony w oiekłym środowisku. Nasilenie reakcji określa się przez oznaczanie stopnia aglutynacji.

Ponieważ badanie to nie przebiega należyście przy użyciu zwykłej gamma globuliny króliczej, uprzednio należy zmienić jej właściwości antygeniczne. Najskuteczniej osiąga się to, jeżeli przed użyciem do uczulania cząstek lateksu, króliczą gamma globulinę podda się działaniu enzymu. Następnie po zmieszaniu z lateksem ogrzewa się, korzystnie do temperatury 50°C w ciągu 7—10 dni, przy czym przemiana króliczej gamma globuliny dobiega końca. Można też stosować ogrzewanie w wyższej temperaturze w ciągu krótszego okresu czasu, ale ogrzewanie bez uprzedniego potraktowania enzymem nie daje dobrego odczynnika.

Stwierdzono, że do przemiany króliczej gamma globuliny można stosować z dobrym wynikiem różne enzymy, mianowicie surową lub krystaliczną trypsynę, chymotrypsynę lub papainę. Szczególnie skuteczne są proteazy grzybowe i pepsyna. Charakter przemiany, której podlega przy tym królicza gamma globulina, nie został całkowicie poznany, ale prawdopodobnie zdolność do reagowania czynnika gośćcowego z króliczą gamma globuliną zależy od miejsc, które stają się niedostępne po zaadsorbowaniu globuliny przez lateks. Rozdział cząsteczek globuliny pod wpływem różnych proteolitycznych enzymów powoduje natomiast odsłanianie istotnych ich części. Ogrzewanie rozdrobnionego materiału powoduje dalszy rozpad pierwotnej budowy, z obnażeniem żądanych, czynnych miejsc na powierzchni.

W przeciwieństwie do tego, cząsteczki ludzkiej gamma globuliny, traktowane w ten sposób, ulegają zwiększeniu i nie nadają się jako odczynnik. Wstępne traktowanie ludzkiej gamma globuliny przed uczuleniem lateksu, jak stwierdzono, nie zwiększa jej zdolności do reakcji. Poza tym ludzka gamma

globulina i królicza gamma globulina wymagają stosowania innego środowiska buforowego. Podczas gdy chlorek sodowy w boranowym środowisku buforującym przyspiesza szybkość reakcji lateksu uczulonego ludzką globuliną, to 0,1 m roztwór chlorku sodowego w boranowym środowisku buforującym hamuje całkowicie reakcję króliczej gamma globuliny. Reakcja przebiega najlepiej przy stężeniu 0,025 m soli w boranowym środowisku buforującym.

Wynalazek jest bliżej wyjaśniony w niżej podanych przykładach.

Przykład I. 100 mg króliczej gamma globuliny rozpuszcza się w 5 ml 0,1 m boranowego roztworu buforowego o wartości pH = 8,6 po czym dodaje się 10 mg surowej trypsyny, ogrzewa do temperatury 37°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 1 godziny. Tak spreparowaną gamma globulinę rozcieńcza się następnie 0,1 m boranowym roztworem buforowym o wartości pH = 8,6 do objętości 50 ml i mieszając wlewa powoli do 50 ml zawiesiny polistyrenu o średniej wielkości cząstek 0,81 mikrona i o stężeniu 2% w stosunku wagowym. Następnie dodaje się timerosalu do uzyskania stężenia 1 : 5000, ogrzewa powoli do temperatury 50°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 10 dni, po czym w celu utrwalenia dodaje się bydlęcej albuminy surowiczej nie zawierającej soli, aż do uzyskania stężenia 0,1% i tak przygotowany materiał przechowuje się w temperaturze 4°C.

Przykład II. 100 mg króliczej gamma globuliny rozpuszcza się w 5 ml 0,1 m buforowego roztworu boranowego o wartości pH = 8,6, dodaje 10 mg surowej trypsyny, ogrzewa do temperatury 37°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 1 godziny. Całość rozcieńcza się do 50 ml 0,1 m roztworem buforowym boranu o pH = 8,6 i mieszając dodaje powoli do 50 ml 2% zawiesiny polistyrenu o przeciętnej średnicy cząstek 0,81 mikrona. Następnie dodaje się timerosalu do uzyskania stężenia 1 : 5000, ogrzewa do temperatury 93°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 10 minut. Otrzymany produkt przechowuje się w temperaturze 4°C.

Przykład III. 100 mg króliczej gamma globuliny rozpuszcza się w 5 ml 0,1 m roztworu buforowego fosforanowego o wartości pH = 7,1, dodaje 2 mg papainy, ogrzewa do temperatury 37°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 1 godziny. Produkt dializuje się następnie boranowym roztworem buforowym o wartości pH = 8,6 rozcieńcza tym roztworem do 50 ml i mieszając dodaje powoli do 50 ml 2% zawiesiny polistyrenu o przeciętnej średnicy cząstek 0,81 mikrona. Następnie dodaje się timerosalu aż do uzyskania stężenia 1 : 5000, ogrzewa powoli do temperatury 50°C i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 10 dni. Otrzymany produkt przechowuje się w temperaturze 4°C.

Wprawdzie korzystnie jest stosować cząstki lateksu pokryte króliczą gamma globuliną w środowisku o wartości pH = 8,6, ale można też stosować wartość pH = 8—9.

Przy prowadzeniu prób potwierdzających obecność czynnika gośćcowego przy użyciu środka według wynalazku stosuje się surowicę krwi pacjen-

16w, u których wstępne badanie wykazało obecność tego czynnika. Odczynnik przygotowany w sposób opisany w przykładach I — III rozcieńcza się 1 : 20 buforującym roztworem boranowym 0,025 m. 10 probówek szklanych 12 × 75 mm umieszcza się w stojaku, a roztwory dublujące przygotowuje się w ten sposób, że 0,1 ml surowicy pacjenta odmierza się pipetą do próbówki nr 1 i dodaje 1,9 ml 0,025 m roztworu buforowego boranu, zaś do pozostałych 9 probówek dodaje się 1,0 ml tego roztworu. Miesza się zawartość próbówki nr 1 i 1,0 ml tej zawartości przenosi do próbówki nr 2. Zawartość próbówki nr 2 miesza się i 1,0 ml tej zawartości przenosi do próbówki nr 3 i tak dalej aż do próbówki nr 9, z której ostateczna 1,0 ml odrzuca się. Probówka nr 10 służy do porównania.

Następnie do każdej z 10 probówek dodaje się 1,0 ml rozcieńczonego odczynnika, miesza i utrzymuje w temperaturze 56°C w ciągu 2 godzin, a po tym przez noc w temperaturze 4°C. Wyniki reakcji odczytuje się ze stopnia aglutynacji cząstek i klarowności cieczy nad osadem. Wyniki oznacza się następująco: ujemny (jak w próbie porównawczej), ±, 1+, 2+, 3+ lub 4+.

Niżej podana tablica 1 zawiera wyniki prób kontrolnych w odniesieniu do przypadków, dla których otrzymano pozytywne wyniki za pomocą znanej próby lateksowej, na szkiełku. Podwójne rozcieńczanie, przy którym występuje aglutynacja pod wpływem środka według wynalazku, może być porównana z podwójnym rozcieńczaniem w metodzie Waaler-Rose przy użyciu krwinek owczych.

Tablica 1

Pacjenci pod obserwacją kliniczną, z ustalonym rozpoznaniem gościa pierwotnie przewlekłego

Numer surowicy	Próba Waaler-Rose	Próba lateksowa na szkiełku	Próba lateksowa w próbówce
101	2560	++++	640
102	nd	—	nd
103	1280	+++	320
104	640	+++	320
105	1280	++	640
106	2560	++++	2560
107	nd	—	nd
108	5120	++++	1280
109	5120	+++	2560
110	320	+	160
111	40	—	< 20
112	320	+++	1280
113	5120	++++	2560
114	5120	++++	5120
115	1280	+++	640
116	nd	—	nd
117	320	+++	160
118	40	+	160
119	320	++	160
120	1280	+++	320
121	160	++	160
122	nd	—	nd
123	640	+++	160

W tablicy 1 „nd” oznacza, że próby nie przeprowadzono. Jeżeli próba na szkiełku dała wynik negatywny, to prób innych nie wykonywano.

Tablica 2

Pacjenci, których surowice wysłano do serologii gościa pierwotnie przewlekłego

Dane kliniczne niepewne

Numer surowicy	Próba Waaler-Rose	Próba lateksowa na szkiełku	Próba lateksowa w próbówce
124	160	+++	320
125	320	+++	80
126	160	+++	320
127	1280	+++	320
128	320	++++	160
129	2560	+++	160
130	1280	+++	320
131	320	++	160
132	1280	++++	2560
133	1280	+++	2560
134	320	+++	160
135	160	+++	20
136	20	+	80
137	5120	+++	160
138	320	+++	320
139	320	+++	160
140	640	++	80
141	160	+	80
142	5120	++++	160
143	80	+	160

Tablica 3

Pacjenci, których surowice były skierowane do serologii na syfilis

Dane kliniczne niepewne

Numer surowicy	Próba Waaler-Rose	Próba lateksowa na szkiełku	Próba lateksowa w próbówce
153	nd	—	nd
154	nd	—	nd
155	nd	—	nd
156	nd	—	nd
157	nd	—	nd
158	nd	—	nd
159	nd	—	nd
160	nd	—	nd
161	nd	—	nd
162	nd	—	nd
163	nd	—	nd
164	320	++	320
165	nd	—	nd
166	nd	—	nd
167	nd	—	nd
168	nd	—	nd
169	nd	—	nd
170	nd	—	nd
171	nd	—	nd
172	nd	—	nd
173	nd	—	nd

dalszy ciąg tablicy 3

174	nd	—	nd
175	nd	—	nd
176	nd	—	nd
177	nd	—	nd
178	nd	—	nd
179	nd	—	nd
180	40	+	160
181	nd	—	nd
182	nd	—	nd

Zastrzeżenia patentowe

1. Środek do oznaczania czynnika gośćcowego w płynach ustroju, **znamienny tym**, że stanowi
- 5 zawiesinę w polarnej cieczy stałych, rozdrobnionych cząstek polimeru o średnicy 0,15 — 14 mikronów, pokrytych króliczą gamma globuliną, poddaną działaniu proteolitycznego enzymu.
2. Środek według zastrz. 1, **znamienny tym**, że
- 10 zawiera cząstki polistyrenu o średnicy 0,81 mikrona.