

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 186839

A bejelentés napja: (22) 83. 09. 13.

(21) 3186/83

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
US

(32)
82. 09. 13.

(31)
(417 661)

A közzététel napja: (41) (42) 84. 10. 29.

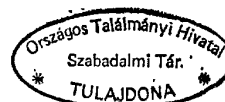
Megjelent: (45) 87. 01.27.

Nemzetközi
osztályjelzet:

(51) NSZO₄

G 01 N 90116

23/00



Feltaláló(k): (72)

ADAMS Ernest C., vegyész, Elkhart, Indiana, US

Szabadalmas: (73)

Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, US

(54)

ELJÁRÁS ÚJSZÜLÖTT BORJÚBAN, CSIKÓBAN VAGY TEHÉN VAGY KANCA KOLOSZTRUMÁBAN
LEVŐ IgG MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás IgG mennyiségének meghatározása újszülött csikóban, borjúból vagy kanca vagy tehén kolosztrumában, amely abban áll, hogy az újszülött borjú vagy csikó testfolyadékából vagy a kolosztrumból vett mintát biológiailag közömbös latexrészecskével érintkezésbe hozzuk, majd a fellépő agglutináció mértékét, s ebből a mintában jelenlévő IgG mennyiségét meghatározzuk, aminek során a 0,109—0,81 μ m méretű latexrészecskéket egy pufferoldattal körülbelül 7,5—9,0 pH-értéken körülbelül 0,65—2,0 súly/térfogat-százalék végkoncentrációra hígítjuk, és a testfolyadékból vagy kolosztrumból vett mintát egy pufferoldattal körülbelül 7,5—9,0 pH-értéken olyan módon hígítjuk, hogy a minta térfogatrészeinek a pufferoldat térfogatrészeihez viszonyított aránya 0,01:12-től 0,01:2160-ig terjed.

A találmány tárgya eljárás IgG mennyiségének meghatározására újszülött borjában, csikóban vagy tehén vagy kanca kolosztrumában.

Az újszülött emberek vagy állatok immunglobulinokra — azaz antitestekre — már születésük előtt a placenta válaszfalán át szert tesznek. Elsősorban ezeknek az immunglobulinoknak a jelenlétében alakul ki az újszülöttnél az antitesteknek egy megfelelő szintje (koncentrációja), amely az újszülöttet fertőző betegségekkel szemben ellenállóvá teszi. Ezeknek az immunglobulinoknak egyik típusa, az IgG már igen korán, egy immunogén stimulus hatására fellép, és — elsősorban az erek útján való eloszlással — az első védelmi rendszert jelenti.

Ezzel ellentétben a csikók és borjúk a placenta leválásaig gyakorlatilag nem rendelkeznek IgG-vel, és ezért születésükkor csak extrém alacsony IgG szinttel (koncentrációval) rendelkeznek; ezt az állapotot hipogammaglobulinémiának nevezik. Ez a helyzet általában az IgG-ben dús kolosztrum felvételével, és ennek a bél epitéliumán át való felszívódása következtében változik meg. Az emlősöknek az IgG-t születésük után megközelítőleg 24 órán belül abszorbeálniuk kell, mert ennek az időnek az eltelte után az IgG a bélrendszerben már nem szívódik fel.

A kolosztrum IgG-tartalmának felszívódása csikók és borjak egészségvédelme szempontjából ezek újszülött korában igen lényeges. Ha nem szívódik fel elegendő mennyiségű IgG, akkor ez egyike azon fő tényezőknek, amelyek következtében az egyébként normális csikók fertőzések áldozatává válnak, és elhullanak [J. Am. Vet. Med. Ass., 166, 71 (1975)].

Ha az IgG átvitele nem történik meg, akkor ezt gyorsan és pontosan fel kell ismerni (diagnosztizálni), hogy eldönthető legyen, vajon terápiás megoldás lehetséges-e, vagy az állatról le kell-e mondani. Ez a terápia IgG befecskendezésében állhat.

Számos közlemény foglalkozik az immunglobulinok „latex-flokkulációs vizsgálat” útján való meghatározásával: ez polisztirol-latex részecskék pelyhes formában való kicsapódását (flokkulációját) jelenti. E vizsgálat során a latexrészecskéket általában egy antigén anyaggal — például hormonokkal vagy vérfé-
hérjékkel, amilyen az albumin vagy az immunglobulin, például az IgG és IgM — vonjuk be. A latexrészecskék negatívan töltöttek, és a fehérjét adszorpció jelenség útján megkötik. A második lépésben egy második reagenst adunk a latexrészecskékhez, aminek következtében a bevont latexrészecskék összetapadnak (agglutinálódnak).

Az Aust. Vet. J. 56, (1980) irodalmi helyen található közlemény kísérletet ír le újszülött csikók kolosztrum-immunglobulinjai adszorpciójának a kimutatására. E vizsgálat során a latexrészecskéket és az antitest-antigén komplexeket ló-immunglobulinval elegyítik, hogy így a latexrészecskéket ló-IgG antitestekkel felülrétegezzék (bevonják). Inkubálás után az így bevont latexrészecskék mellől a nem adszorbeált ló-IgG-t friss pufferoldattal kimossák, majd pufferoldattal rekonstituíják. Ezt követően az antitest-latex-keveréket csikó-plazmából vett vizsgálati mintához adják. Daraszerű, fehér agglutináció megjelenése azt jelenti, hogy az immunglobulinok jelenlétére végzett vizsgálat pozitív.

Az Am. J. Med., 21, 888 (1956) helyen leírják a la-

tex-flokkulációs vizsgálat alkalmazását reumás ízületi gyulladás szerológiai diagnózisának céljából. Ennek során egy reumás faktornak (RF) nevezett IgG-immunglobulint alkalmaznak. A latexrészecskéket először humán gamma-globulinnal vonják be, majd inkubálás után az így bevont latexrészecskék mellől a nem adszorbeált gamma-globulint friss pufferoldattal kimossák, és utána pufferoldattal rekonstitúciót végeznek. Ezután a gamma-globulin és latex keverékét egy reumás ízületi gyulladásos beteg szérummintájához adják: így az ízületi gyulladásos betegek 71%-ánál agglutináció lép fel. Ha a vizsgálatot úgy módosítják, hogy a latexrészecskékből álló szuszpenziót és szérumot gamma-globulin nélkül keverik össze, akkor a reumás szérumoknak mindössze 11%-ában lép fel agglutináció.

A 3088875 számú Egyesült Államokbeli szabadalmi leírásban latex-flokkulációs vizsgálatot írnak le egy „C-reaktív” fehérje felismerésére, amely főként aktív gyulladásban vagy szövetroncsoló kóros állapotban szenvedő betegek szérumában fordul elő. E vizsgálat során a latexrészecskéket humán gamma-globulinnal keverik, majd 57 °C hőmérsékletre melegítik. Ezután az antitesttel bevont latexrészecskéket egy beteg hígított szérumával elegyítik. Az agglutináció fellépése a C-reaktív fehérje jelenlétét igazolja.

A 3551555 számú Egyesült Államokbeli szabadalmi leírásban olyan vizsgálatot közölnek, amely antigén — például humán choriongonadotropin — kimutatására alkalmazható. E vizsgálat során a latexrészecskéket először közömbös fehérjével — például albuminnal vagy laktalbuminnal — vonják be, majd vagy egy antigénnel vagy egy antitesttel e bevonatot felülrétegezik. A fehérje-antitest vagy fehérje-antigén bevonatú latexrészecskéket ezután egy beteg hígított szérumával elegyítik. Az agglutináció fellépése egy antigén jelenlétére utal.

Az összes, fentiekben említett szabadalmi leírások és közlemények szerint a latexrészecskéket először egy fehérjetartalmú anyaggal vonják be, majd az így bevont latexrészecskéket egy második reagenssel kölcsönhatásba hozzák. Így a második reagens a latexrészecskék között térhálósodást hoz létre, és „hídépítő” agglutináció következik be.

Egyetlen közlésben sem tesznek kinyilvánítást vagy javaslatot arra vonatkozóan, hogy csikók vagy borjak IgG szintje (koncentrációja) vagy egy kanca vagy tehén kolosztrumában levő IgG szintje (koncentrációja) antitest-antigén-reakció alkalmazása nélkül meghatározható.

A találmány tárgya eljárás IgG mennyiségének meghatározására újszülött csikóban vagy borjában vagy kanca vagy tehén kolosztrumában. A találmány szerinti eljárás abban áll, hogy egy testfolyadékmintát biológiailag közömbös latexrészecskékkel érintkezésbe hozunk, s a fellépő agglutináció mértékét, és ennek alapján a mintában jelenlevő IgG mennyiségét meghatározzuk. A latexrészecskéket pufferoldat segítségével 7,5—9,0 pH-érték mellett körülbelül 0,65—2,0 súly/térfogat-% végkoncentrációra hígítjuk. A testfolyadékot körülbelül 7,5—9,0 pH-értéken, a pufferoldattal körülbelül 0,01:12-től 0,01:2160 térfogatrész/térfogatrész koncentrációtartományra hígítjuk.

Az IgG kritikus szintje (koncentrációja) valószínűleg a következő: 200 mg/dl alatt terápia szükséges;

200 és 400 mg/dl között kérdéses, hogy szükséges-e a terápia; és 400 mg/dl fölötti koncentráció kielégítő. Az igényelt eljárás ezeknek a koncentrációknak egyszerű mérését lehetővé teszi.

A találmány szerinti eljárás során alkalmazott latexrészecskék bármilyen, alkalmas, biológiailag közömbös részecskék lehetnek. Alkalmas részecskék például a poli/vinil-toluol), a sztirol-butadién-latex, sztirol-/divinil-benzol)-latex, akril-latex és a polisztirol-latex. A latexrészecskék mérete 0,109 és 0,81 μm között változhat. Ilyen latexrészecskék beszerezhetők például a következő cégektől: Dow Chemical Co. (Midland, Michigan, USA); Monsanto and Co. (St. Louis Missouri, USA); Rhone-Poulenc (Párizs, Franciaország); és AB Bofors (Örebro, Svédország).

A latexrészecskék a kereskedelmi forgalomból szuszpenziók — például 10 súly/térfogat-%-os vizes latex-szuszenzió — alakjában szerezhető be, és megfelelő pufferoldattal hígíthatók. Alkalmasak az olyan pufferok, amelyek vízben megfelelően oldódnak, és körülbelül 7,5–9 pH-értéken nagy pufferkapacitással rendelkeznek. Alkalmas puffer például a borát és fiziológiai konyhasóoldat elegye, a glicin és fiziológiai konyhasóoldat elegye, valamint az N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin.

Megfelelő borát-puffer például 12,2 millimól $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -ből 7,1 millimól HCl/ml elegyítésével kapható. Ehhez a borátoldathoz 0,08–10 súly/térfogat-százalék konyhasóoldatot adunk. Előnyös a 0,3–1,25 súlyszázalékos oldat alkalmazása. Kívánt esetben a borátból és fiziológiai konyhasóoldatból álló puffert előállíthatjuk úgy, hogy 50 ml 0,1 mólos bórsavat és 5,9 ml 0,1 n nátronlúgot elegyítünk, vízzel 100 ml-re töltjük, és körülbelül 8,2 pH-értékre állítjuk, majd a pufferoldat 100 ml térfogatára számítva 0,85 g nátrium-kloridot adunk hozzá.

Glicint és fiziológiai konyhasóoldatot tartalmazó, megfelelő pufferoldat 0,1 mólos, pH-értéke 8,2, és literenként 10 g nátrium-kloridot tartalmaz. A latexrészecskéket körülbelül 7,5–90 pH-érték mellett 0,65–2 súly/térfogat-százalék végkoncentrációra hígítjuk.

A testfolyadék egy újszülött csikó vagy borjú vérplazmája, vérszéruma vagy teljesvére lehet, vagy egy kanca vagy tehén kolosztrumából származhat. A testfolyadékot a fentebb említett pufferek egyikével úgy hígítjuk, hogy a testfolyadék térfogatrészeinek a pufferoldat térfogatrészeihez való aránya 0,01:12 és 0,01:2160 között legyen.

A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a részecskénagyságú 0,109–0,81 μm mérettartományra való korlátozása lényeges. A latexrészecskék méretének csökkenésével a fajlagos felület lényegesen megnő, és ennek következtében az agglutináció kimutatása nehezkessé válik. Ha a latexrészecskék mérete növekszik, akkor a fajlagos felület lényegesen csökken.

Ugyanez a megfontolás érvényes a latexrészecskék mennyiségének 0,65–2,0 súlyszázalék koncentrációtartományra való korlátozására is. Ha a latexrészecskék koncentrációja a 2,0 súlyszázalékot meghaladja, akkor az IgG meghatározása nem hajtható végre, mert az IgG-ből túlságosan nagy mennyiség szükséges. Ha a latexrészecskék koncentrációja 0,65 súlyszázalék alá csökken, akkor viszont az agglutináció kimutatása fokozódóan nehezkessé válik.

A fentebb említett latexméretek és -koncentrációk alkalmazása során megállapítottuk, hogy a vizsgálandó testfolyadék úgy hígítható, hogy a testfolyadék térfogatrészeinek a puffer térfogatrészeihez viszonyított aránya 0,01:12-től 0,01:2160 tartományban legyen. Ha a testfolyadékot úgy hígítjuk, hogy a pufferhez viszonyított aránya 0,01:2160-nál kisebb, akkor ez a kívántnál nagyobb méretű részecskéket igényelne ahhoz, hogy azonos IgG koncentráción belül agglutinációt idézzon elő, és ennek következtében egy ilyen rendszerrel dolgozni nehézkes lenne. Ha a testfolyadék a pufferoldathoz viszonyítva 0,01:12 aránynál koncentráltabb, akkor a latexrészecskék valamennyi, fentebb említett mérete mellett már jelentéktelen IgG-koncentrációk jelenlétében is bekövetkezik az agglutináció.

A latex és a szérum megfelelő pufferoldattal való helyes hígítását a szakember az alábbiakban következő leírás szerint könnyen meghatározhatja. A találmány egyik előnyös kiviteli formája szerint 0,22 μm méretű latexrészecskéket 2,0 súlyszázalék végkoncentrációra hígítunk.

A találmány szerinti eljárást az alábbi kiviteli példákban részletesen ismertetjük. A latex-oldatokat — ha külön megjegyzést nem teszünk — a Dow Chemical Co. cégtől szereztük be.

Kontrolleljárás

Újszülött csikóktól születésük után mintegy 6–8 órával szérummintákat vettünk. A radiál-immundifúziós vizsgáló készletet („RID”) [ezt a Miles Laboratories Inc. cégtől (Elkhart, Indiana, USA) szereztük be] a következő módon alkalmaztuk. A készlet puffert agarózba ágyazott ló-IgG antitestet (ellenanyagot) tartalmazott. Az agarózba lyukak voltak kiképezve. A mérendő szérumnak kiválasztott standard mennyiségét egy lyukba töltöttük, a standard kontrollmintákat pedig a többi lyukba helyeztük. A szérumot és az agarózt szobahőmérsékleten körülbelül 16–24 órán át inkubáltuk. Minden egyes lyuk körül csapadékgyűrű képződött, mégpedig a jelenlevő IgG mennyiségével arányosan. E gyűrűk átmérőjét megmértük, és a koncentrációtól való függésben fél-logaritmikus papíron görbével ábrázoltuk. A szérummintákban levő IgG mennyiségét ezen az alapon határoztuk meg.

1. példa

10 súly/térfogat-%-os 0,22 μm méretű részecskéket tartalmazó polisztirol-latex-oldatot 1:5 térfogat/térfogat arányban 0,2 mólos, 8,5 pH-értékű N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin pufferoldattal körülbelül 2 súly/térfogat-% végkoncentrációra hígítottunk.

Minden egyes vizsgálatra duplikátumban alkalmaztuk a csikó-szérummintákat, ugyanúgy, mint a kontrolleljárás során. Egy sorozatvizsgálattal megállapítottuk, hogy az IgG-koncentrációk egyszerű meghatározása lehetséges, ha a szükséges szérummennyiség 4–6 cseppnél nem több. E kísérleteink alapján 5 μl csikó-szérumot adtunk 8 ml N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin pufferoldathoz (0,2 mólos, pH-értéke 8,5), és

alaposan elkevertük (így a minta 0,01 térfogatrésze jutott 16 térfogatrész pufferoldatra).

A hígított latexkeverék minden egyes cseppje 0,025 ml-t tartalmazott; a hígított latex féle cseppje 0,10 ml-t tartalmazott. Két csepp hígított latexkeveréket tárgylemezre helyeztünk, egy csepp fenti módon hígított csikó-szérumot adtunk hozzá, és átkevertük. A tárgylemez enyhén megforgattuk, és megfigyeltük az agglutináció jelentkezését a keverékben. Ha 10 másodperc múlva látható és jelentős agglutináció nem volt megfigyelhető, akkor további 1 csepp hígított szérumot adtunk hozzá, és a fentebb említett módon átkevertük. Ezt a titrálást addig folytattuk, amíg az agglutináció bekövetkezett. Ezt az eljárásmodot minden egyes, hígított csikó-szérumminta esetében megismételtük.

Az így kapott IgG-agglutinációs vizsgálatok eredményét összehasonlítottuk a kontroll eljárás során kapott IgG vizsgálati eredményekkel. A vizsgálati eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

RID mérésrel kapott IgG-koncentrációk	Vizsgáló módszer — a hozzáadott szérum mennyisége
>400	mg/dl 1 csepp hígított szérum 2 csepp hígított latexhez: az agglutináció pozitív
≥400	mg/dl 2 csepp: az agglutináció pozitív
200—400	mg/dl 3 csepp: az agglutináció pozitív
≤200	mg/dl 4 csepp: az agglutináció pozitív
<200	mg/dl >4 csepp: az agglutináció pozitív

Az 1. táblázatban foglalt kritériumok alkalmazása mellett a találmányi eljárás szerint 77 csikó-szérummintából álló sorozatot vizsgáltunk, és összehasonlítottuk a RID-kontroll eljárás során megállapított IgG-koncentrációkkal. Eredményeinket a 2. táblázatban összegeztük.

Összesen 77 vizsgált minta közül 73 minta (94,8%) esetében a kapott értékek összhangban voltak a RID-kontroll eljárás során kapott IgG-koncentrációkkal. Azonos eredményeket kaptunk akkor is, ha ennek a vizsgálati eljárásnak a pontosságát az Eq. Vet. 6. 109 (1974) irodalmi helyen leírt cink-szulfát vizsgálattal hasonlítottuk össze.

Ezek a vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a találmány szerinti eljárás segítségével az IgG-koncentrációk egy elismert, gyakorlatban végrehajtott vizsgálattal összehasonlítva igen nagy pontossággal meghatározhatók.

Az alkalmazott, speciális reakciófeltételek mellett — azaz, ha a latexrészecskék mérete 0,22 μm , és a latexoldat koncentrációja 2,0 súly/térf.-%, továbbá a testfolyadék térfogatrészeinek a pufferoldat térfogatrészeihez viszonyított aránya 0,01:16 — az IgG-koncentrációk egyszerű módon, a hígított testfolyadék 4—5 csepig terjedő mennyiségének felhasználásával meghatározható.

2. példa

Két csikóból szérummintát vettünk, és RID-vizsgálattal megállapítottuk, hogy az IgG-koncentráció körülbelül 1500 mg/dl, illetve körülbelül 0—200 mg/dl. A mintákat úgy elegyítettük, hogy a következő IgG-koncentrációk (mg/dl) szerinti sorozatot kapjuk: 750, 500, 373, 300, 250 és 166. Ezeket a szérummintákat az alábbi módon használtuk fel.

10 súly/térf.-%-os, 0,22 μm részecskeméretű polisztirol-latexet 0,2 mólos, 8,5 pH-értékű N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin pufferoldattal 1:5 térfogatarányban elegyítve körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra hígítottunk.

Minden egyes vizsgálat céljára 5 μl fentebb megadott koncentrációjú csikó-szérumot 6 ml fenti pufferoldathoz adtunk, és így alapos átkeveréssel olyan végkoncentrációra állítottuk be, hogy 12 térfogatrész pufferoldat 0,01 térfogatrész szérumot tartalmazott. A tárgylemezen levő 1 csepp hígított latexoldatot 1 csepp hígított szérummal kevertük, átkeverés céljából megforgattuk és az agglutinációt megfigyeltük. Ha agglutináció nem következett be, akkor további 1 csepp hígított latexmintát a tárgylemezen 2 csepp hígí-

2. táblázat

IgG-csoport koncentráció (RID) mg/dl	A minták száma a csoportban	(szám) agglutináció százalékos hányada, a vizsgálati eljárásra vonatkoztatva									
		1*	1,5*	2*	2,5*	3*	3,5*	4*	4,5*	5*	5,5*
>400	52	(8) 15,3%	(12) 23%	(28) 53%	(4) 7,7%	0	0	0	0	0	0
200—400	16	0	0	0	(2) 12,5%	(9) 56,3%	(3) 18,3%	(1) 6,25%	(1) 6,25%	0	0
200	9	0	0	0	0	0	0	(6) 60%	(1) 10%	0 20%	(2)
Összesen 77 minta											

* A cseppek száma

tott szérummal elegyítettünk. Ha ekkor sem lépett fel agglutináció, akkor az eljárást 3 csepp hígított szérummal megismételtük. A vizsgálati eredményeket a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérum mennyisége
$750 \times 2 = 1500$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$500 \times 2 = 1000$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$373 \times 2 = 750$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$300 \times 2 = 600$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$250 \times 2 = 500$	1 csepp: az agglutináció negatív
	2 csepp: az agglutináció pozitív
$166 \times 2 = 332$	1 és 2 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív

A 3. táblázatban bemutatott vizsgálati eredményeket összehasonlítottuk az 1. példa szerint kapott titrálási eredményekkel. Mivel a titrálási eredményeket — amint ezt az 1. táblázat mutatja — úgy kaptuk, hogy 1 csepp szérumot adtunk 2 csepp hígított latexhez, azért a 3. táblázatban látható koncentrációkat 2-vel megszoroztuk, hogy az 1. táblázat a 3. táblázattal összehasonlítható legyen.

Az eredmények azt mutatják, hogy a 2. példa szerinti eljárással kapott IgG-koncentrációk az 1. példa szerinti titrálási eljárással kapott IgG-koncentrációkkal (amelyek a RID-kontrolleljárással kapcsolatban állnak) szoros kapcsolatban vannak. Így például 66 mg/dl IgG-koncentráció esetében ($166 \times 2 = 332$ mg/dl) 3 csepp szérummal pozitív agglutinációt kaptunk; ez 200–400 mg/dl tartományban van, amint ezt az 1. táblázat szerint a 3 csepp hatására jelentkező agglutináció mutatja. Hasonló eredményeket kaptunk a többi IgG-koncentrációk esetében is.

Nyilvánvaló, hogy az 1. példában és a 2. példában leírt eljárás végrehajtásával a testfolyadék és a latex agglutinációját, s ebből a mintákban jelenlevő IgG-koncentrációját meghatározhatjuk. A szakember a pufferoldat kívánt koncentrációját, valamint a latex-részecskék méretét és koncentrációját az IgG-koncentrációknak egy testfolyadékban való meghatározása céljából be tudja állítani. Ezek a koncentrációk könnyen optimalizálhatók abból a célból, hogy kényelmesen kivitelezhető IgG-vizsgálat álljon rendelkezésünkre.

A következő példákban a reakciókörülményeket széles határok között változtatjuk. Ezek a reakciókörülmények nem feltétlenül a legkedvezőbbek (optimálisak): ennek következtében az így kapott agglutinációs értékek, azaz az IgG-koncentrációk több példában nem hasonlíthatók össze közvetlenül az 1. példa szerinti kapott agglutinációs értékekkel. Minden egyes példában azonban abban a mértékben, ahogyan a mintában jelenlevő IgG mennyiségét növeltük vagy csökkentettük, az agglutináció úgy változott, hogy az IgG a találmány szerinti eljárással mérhető volt.

Ha külön megjegyzést nem teszünk, akkor az alábbi példákban szereplő csikó-szérumok koncentrációit a 2. példa szerint kaptuk.

Abból a célból, hogy a részecskeméretnek 0,10 µm-re való módosításának befolyását megállapítsuk, a következő kísérletet végeztük.

3. példa

0,109 µm részecskeméretű polisztirol-butadién-latex 10%-os vizes oldatát az 1. példában leírt pufferral 1:15 arányban való hígítás útján 0,67 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 µl csikó-szérumot adtunk 6 ml fenti pufferoldathoz, és így alapos átkeveréssel olyan végkoncentrációra állítottuk be, hogy 12 térfogarész pufferoldat 0,01 térfogarész szérumot tartalmazott. A hígított latexkeverék 1 cseppjét az 1. példában leírt módon 1, 2 vagy 3 csepp hígított szérummal elkevertük. Az így kapott kísérleti eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérum mennyisége
$750 \times 2 = 1500$	1 csepp: az agglutináció negatív
	2 csepp: az agglutináció pozitív
$500 \times 2 = 1000$	1 csepp: az agglutináció negatív
	2 csepp: az agglutináció pozitív
$373 \times 2 = 750$	1 és 2 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív
$300 \times 2 = 600$	1, 2 és 3 csepp: az agglutináció negatív

A fenti adatokból következik, hogy abban a mértékben, ahogyan a szérummintákban jelenlevő IgG mennyisége csökkent, az agglutinációhoz szükséges szérum mennyisége növekedett. A latexrészecskék méretének csökkenése a fajlagos felület megfelelő növeléséhez vezetett, s ennek következtében a latexrészecskék koncentrációjának csökkentése vált szükségessé.

Az alábbi 4. és 5. példákban a csikó-szérummintákat úgy hígítottuk, hogy az adott táblázatokban bemutatott IgG-koncentrációk sorozatát kaptuk.

4. példa

0,497 µm részecskeméretű polisztirol-latex 10%-os vizes oldatát az 1. példában leírt pufferral 1:5 arányban való hígítás útján körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 µl csikó-szérumot adtunk 108 ml fenti pufferoldathoz, s így alapos átkeveréssel olyan végkoncentrációra állítottuk be, hogy 216 térfogarész pufferoldat 0,01 térfogarész szérumot tartalmazott. A hígított latex 1 cseppjét az 1. példában leírt módon 1, 2 vagy 3 csepp hígított szérummal kevertük. Az így kapott kísérleti eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérum mennyisége
$900 \times 2 = 1800$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$370 \times 2 = 740$	1 csepp: az agglutináció kérdéses
	2 csepp: az agglutináció pozitív
$200 \times 2 = 400$	1 csepp: az agglutináció negatív
	2 csepp: az agglutináció pozitív

A fenti adatok azt mutatják, hogy abban a mértékben, ahogyan a példákban alkalmazott IgG mennyisége csökkent, az agglutinációhoz szükséges szérumszámú minta mennyisége növekedett. A szérumszámú hígítását növelnünk kellett, mivel a latexrészecskék méretének növelése a latexrészecskék fajlagos felületének csökkenését idézte elő.

5. példa

0,807 μm részecskeméretű polisztirol-latex 10%-os vizes oldatát az 1. példában leírt pufferral 1:5 arányban való hígítás útján körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 μl csikó-szérumszámú adtuk 1080 ml fenti pufferoldathoz, és így alapos átkeveréssel olyan végkoncentrációra állítottuk be, hogy 2160 térfogatrész pufferoldat 0,01 térfogatrész szérumszámú tartalmazott. A hígított latex 1 cseppjét a tárgylemezen az 1. példában leírt módon 1–3 csepp hígított szérumszámú kevertük. Az így kapott kísérleti eredményeket a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérumszámú mennyisége
$900 \times 2 = 1800$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$370 \times 2 = 740$	1 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív
$200 \times 2 = 400$	3 csepp: az agglutináció negatív

A fenti adatokból következik, hogy abban a mértékben, ahogyan a szérumszámúban jelenlevő IgG mennyisége csökkent, az agglutinációhoz szükséges szérumszámú mennyisége növekedett. A fenti adatok továbbá azt a hatást is mutatják, amely a 4. példából is kitűnik: a latexrészecskék méretének növekvése a latexrészecskék fajlagos felületének csökkenéséhez vezet, és ennek következtében a szérumszámú hígításának további növelése szükséges.

6. példa

Az 1. példában leírt pufferoldat 1 literéhez 10 g nátrium-kloridot adva fiziológiás konyhasóoldatot tartalmazó N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin pufferoldatot kaptunk. 0,109 μm részecskeméretű polisztirol-butadién-latex 10%-os vizes oldatát e pufferoldattal 1:5 arányban hígítva körülbelül 0,67 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 μl csikó-szérumszámú adtuk 6 ml fenti oldathoz, és alaposan átkevertük. 1 csepp hígított latexoldatot a tárgylemezen az 1. példában leírt módon 1, 2 vagy 3 csepp hígított szérumszámú kevertük. Az így kapott kísérleti eredményeket a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérumszámú mennyisége
$750 \times 2 = 1500$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$500 \times 2 = 1000$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$375 \times 2 = 750$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$300 \times 2 = 600$	1 csepp: az agglutináció pozitív
$250 \times 2 = 500$	1 csepp: az agglutináció negatív
	2 csepp: az agglutináció pozitív
$166 \times 2 = 332$	1 és 2 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív

A fenti adatokból következik, hogy abban a mértékben, ahogyan a szérumszámúban jelenlevő IgG mennyisége csökkent, a szérumszámú agglutinációhoz szükséges mennyisége növekedett. Az eredmények ezen kívül arra is rámutatnak, amit a pufferoldat megválasztásával elérhetünk. A konyhasóoldatnak pufferoldathoz való adása azzal a következménnyel jár, hogy a 109 μm méretű latexrészecskék inkább a 2. példa szerinti, 0,22 μm méretű latexrészecskékhez hasonlóan viselkednek.

Csikó-szérumszámúkat 3000 mg/dl és 1500 mg/dl IgG-vel sorozattá kevertünk, a RID-vizsgálattal meghatározást végeztünk, és ezt alkalmaztuk a következő példában.

7. példa

0,22 μm részecskeméretű polisztirol-latex 10%-os vizes oldatát 0,1 mólus 8,2 pH-értékű glicin-pufferoldattal 1:5 arányban való hígítás útján körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 μl csikó-szérumszámú adtuk 6 ml fenti glicin-pufferoldathoz, és alaposan átkevertük. A hígított latex 1 cseppjét a tárgylemezen az 1. példában leírt, hígított szérumszámú 1, 2 vagy 3 cseppjével elegyítettük. Az így kapott kísérleti eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérumszámú mennyisége
$3000 \times 2 = 6000$	1 és 2 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív
$1500 \times 2 = 3000$	1, 2 és 3 csepp: az agglutináció negatív

A szérumszámúban levő IgG mennyiségének csökkenése itt is a szérumszámú agglutinációhoz szükséges mennyiségének növekvését vonja maga után. A glicinnek a pufferoldatban való jelenléte — az előző példában alkalmazott puffer helyett — az agglutinációhoz szükséges IgG nagyobb mennyiségét teszi szükségessé.

8. példa

0,22 μm részecskeméretű polisztirol-latex 10%-os vizes oldatát 0,1 mólus, 8,2 pH-értékű, literenként 10

g nátrium-kloridot tartalmazó, glicinből és fiziológiás konyhasóoldatból álló pufferoldattal 1:5 arányban hígítva körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 ml csikó-szérumot adtunk 6 ml glicin-konyhasóoldat pufferhoz, és jól elkevertük. A hígított latex 1 cseppjét a tárgylemezen az 1. példában leírt módon 1, 2 vagy 3 csepp hígított szérummal elegyítettük. Az így kapott kísérleti eredményeket a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérumszám
750 × 2 = 1500	1 csepp: az agglutináció pozitív
500 × 2 = 1000	1 csepp: az agglutináció pozitív
375 × 2 = 750	1 csepp: az agglutináció pozitív
300 × 2 = 600	1 csepp: az agglutináció pozitív
250 × 2 = 500	1 csepp: az agglutináció negatív
166 × 2 = 332	2 csepp: az agglutináció pozitív
	1 és 2 csepp: az agglutináció negatív
	3 csepp: az agglutináció pozitív

A szérummintában jelenlevő IgG mennyiségének csökkenése itt is a szérumminta agglutinációhoz szükséges mennyiségének növelését igényli. A konyhasóoldatnak a 7. példa szerinti glicin-pufferoldathoz való hozzáadása jelentős mértékben növeli az IgG-vizsgálat érzékenységét. Míg a glicin önmagában pufferként használva nagy mennyiségű IgG-t tesz szükségessé az agglutinációhoz, a glicin és fiziológiás konyhasóoldat keverékéből álló puffer érzékenysége hasonló a 2. példa szerinti N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicint tartalmazó pufferoldat alkalmazásával elért érzékenységhoz.

9. példa

0,22 µm részecskeméretű polisztirol-latex 10%-os vizes oldatát 0,125 mólós, 8,4 pH-értékű, literenként 8,5 g nátrium-kloridot tartalmazó, borát és fiziológiás konyhasóoldat keverékéből álló pufferrel 1:5 arányban hígítva körülbelül 2 súly/térf.-% végkoncentrációra állítottuk be.

E pufferoldatot úgy állítottuk elő, hogy 50 ml 0,1 mólós bórsavoldat és 5 ml 0,1 n nátronlúg keverékét vízzel 100 ml-re töltöttük, 8,2 pH-ra állítottuk, összekevertük, majd a pufferoldathoz 100 ml-enként 8,85 g nátrium-kloridot adtunk.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 ml csikó-szérumot adtunk 6 ml, borátot és konyhasóoldatot tartalmazó pufferhoz, és alaposan összekevertük. A hígított latex 1 cseppjét tárgylemezen az 1. példában leírt módon 1, 2 vagy 3 csepp hígított szérummal elegyítettük. Vizsgálati eredményeink lényegében ugyanazok voltak, mint amelyeket a 8. példában leírt glicin-konyhasóoldat puffer alkalmazásával kaptunk.

10. példa

0,109 µm részecskeméretű polisztirol-butadién-latex 10%-os vizes oldatát az 1. példában leírt pufferoldattal 1:5 arányban hígítva körülbelül 2% végkoncentrációra állítottuk be. Minden egyes vizsgálatunk-

ban előállítottuk az 1. példában leírt csikó-szérumszámokat. A csikó-szérumból 5 ml-t adtunk 10 ml fenti pufferoldathoz, és alaposan átkevertük. A hígított szérum 1 cseppjét az 1. példában leírt módon 1 csepp hígított latexhez adtuk. Az így kapott kísérleti eredményeket a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat

IgG mg/dl (RID-méréssel)	A hozzáadott szérumszám
900 × 2 = 1800	4 csepp: az agglutináció pozitív
370 × 2 = 740	7 csepp: az agglutináció pozitív
200 × 2 = 400	9 csepp: az agglutináció pozitív

A hígított latex további 1 cseppjének hozzáadásával az agglutináció visszafordítható, és ha ekkor további hígított szérumot adunk hozzá, akkor ismét agglutináció következik be. Az agglutinációnak ez a reverzibilitása mutatja, hogy a végpont teljes pontossággal megállapítható.

11. példa

Az 1. példa és 2. példa szerinti eljárást ismételtük, csikó-szérum helyett azonban újszülött borjú szérumát alkalmaztuk. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy abban a mértékben, ahogyan a szérummintákban jelenlevő IgG mennyisége csökkent, a szérumminták agglutinációhoz szükséges mennyisége növekedett. A vizsgálati eredmények továbbá igazolták, hogy a találmány szerinti eljárás az agglutináció méréséhez, tehát a borjúszérummintában levő IgG mennyiségének meghatározására alkalmas.

12. példa

Az 1. példában leírt eljárást ismételtük, azonban csikó-szérum helyett csikó teljesvérét és borjú teljesvérét alkalmaztuk. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy a találmány szerinti eljárás az agglutináció mérésére, tehát a csikó és borjú teljesvérében jelenlevő IgG mennyiségének meghatározására alkalmas.

13. példa

Az 1. példa szerinti jártunk el, azonban szérum helyett kolosztrumot alkalmaztunk annak megállapítása céljából, vajon egy olyan kanca vagy tehén kolosztruma, amely éppen lecsikózott vagy megborjazott, képes-e az immunglobulint egy újszülött csikóra vagy borjúra átvinni.

Megfelelő kolosztrum IgG-koncentrációja megközelítőleg 1000 mg/dl vagy ennél nagyobb. Abból a célból, hogy a kolosztrummintát arra a koncentrációtartományra hígítsuk, amely az 1. példa szerinti szérumkoncentrációnak közelítőleg megfelel, a kolosztrumot megfelelő pufferoldattal 1:5 arányban hígítva körülbelül 200 mg/dl végkoncentrációra állítottuk be.

0,22 µm részecskeméretű, 10 súly/térf.-%-os polisztirol-oldatot 0,2 mólós, 8,5 pH-értékű N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin pufferoldattal 1:5 térfogatarányban hígítva körülbelül 2 súly/térf.-%-os végkoncentrációra állítottuk be.

Minden egyes vizsgálatunkban 5 μ l hígított kolosztrumot adtunk 8 ml fenti pufferoldathoz, és így olyan végkoncentrációra hígítottuk, hogy 16 térfogatrész pufferoldat 0,01 térfogatrész kolosztrumot tartalmazott. Ezt az oldatot az 1. példában leírt módon alkalmaztuk 2 csepp latex titrálásához.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás IgG mennyiségének meghatározására újszülött csikóban, borjában vagy kanca vagy tehén kolosztrumában, *azzal jellemezve*, hogy az újszülött borjú vagy csikó testfolyadékából vagy a kolosztrumból vett mintát biológiailag közömbös latexrészecskékel érintkezésbe hozzuk, majd a fellépő agglutináció mértékét, s ebből a mintában jelenlevő IgG mennyiségét meghatározzuk, aminek során a 0,109—0,81 μ m méretű latexrészecskéket egy pufferoldattal körül-

a testfolyadékból vagy kolosztrumból vett mintát egy pufferoldattal körülbelül 7,5—9,0 pH-értéken olyan módon hígítjuk, hogy a minta térfogatrészeinek a pufferoldat térfogatrészeihez viszonyított aránya 0,01:12-től 0,01:2160-ig terjed.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy testfolyadékként vérplazmát, vérérumot vagy teljesvért alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy testfolyadékként kolosztrumot alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy pufferként borát és konyhasóoldat elegyét, vagy glicin és konyhasóoldat elegyét, vagy N,N-bisz(2-hidroxi-etil)-glicin és konyhasóoldat elegyét alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy 0,22 μ m méretű latexrészecskéket használunk és a testfolyadéknak a pufferoldathoz viszonyított részarányát 0,01:16 értékre állítjuk elő.

Ábra nélkül
