



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 4110/83
(22) Indleveringsdag: 09 sep 1983
(41) Alm. tilgængelig: 14 mar 1984
(44) Fremlagt: 25 mar 1991
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 13 sep 1982 US 417661

(51) Int.Cl.⁵ G 01 N 33/546

- (71) Ansøger: *Mobay Corporation; Mobay Road; Pittsburgh; PA 15205, US
(72) Opfinder: Ernest C. *Adams; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af den mængde IgG, der er til stede i en nyfødt kalv, et nyfødt føl eller i kolostrum hos en ko eller en hoppe

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4110-83

Til bestemmelse af den mængde IgG, der er til stede i en neonatal kalv, et neonatalt føl eller i kolostrum hos en ko eller et moderdyr, bringer man en legemsvæskeprøve fra det neonatale dyr eller fra det nævnte kolostrum i kontakt med biologisk indifferente latexpartikler, måler den mængde agglutination, der fremkommer, og ud fra denne bestemmer den mængde IgG, der er til stede i prøven, hvorhos latexpartiklerne, der har en partikelstørrelse fra 0,109 til 0,81 μ , fortyndes med en puffer til en slutkoncentration fra 0,65 til 2,0%, beregnet på vægt/rumfangsbasis, ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca. 9,0, idet legemsvæske- eller kolostrumprøven fortyndes med en puffer til et område fra 0,01:12 dele til 0,01-2160 dele på rumfang/rumfangsbasis, ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca. 9,0.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til bestemmelse af den mængde IgG, der er til stede i en nyfødt kalv, et nyfødt føl eller i kolostrum hos en ko eller en hoppe.

5 Nyfødte mennesker og andre arter nyfødte har modtaget immunoglobuliner, dvs. antistoffer, tværs over placentabarrieren inden fødslen. Tilstedeværelsen af sådanne immunoglobuliner tilvejebringer især tilstrækkelige antistofniveauer hos den nyfødte til opnåelse af resistens mod infektionssyg-
10 domme. En type immunoglobulin, IgG, fremkommer meget tidligt efter en immunogen stimulering, og sammen med dets væsentlige intravaskulære fordeling kan IgG tjene som en første forsvarslinie.

I modsætning hertil modtager føl eller kalve praktisk
15 taget ikke noget IgG tværs over placentabarrieren og har ved fødslen ekstremt lave niveauer af IgG, hvilket betegnes som hypogammaglobulinæmi. Denne situation ændres almindeligvis efter indtagelse af IgG-rigt kolostrum og absorption deraf gennem det intestinale epitel. IgG skal være absorberet ved die-
20 givning i løbet af ca. 24 timer efter fødslen. Efter dette tidsrum absorberes IgG ikke længere i tarmen.

Absorption af kolostrum-IgG er essentiel for det gode helbred for føllet eller kalven i den nyfødte periode. Svigtende absorption af passende mængder IgG er den vigtigste fak-
25 tor, der foruddisponerer i øvrigt normale føl for infektion og død, jfr. J. Am. Vet. Med. Ass., 166, 71 (1975).

Svigtende evne til overførsel af IgG bør diagnosticeres nøjagtigt og hurtigt således, at det kan afgøres, om dyret skal behandles terapeutisk eller aflives. Terapien kan omfatte
30 injektion af IgG.

I talrige tidligere artikler beskrives der en test for immunoglobulin under anvendelse af en "latex-flokkulations-
test", f.eks. flokkulation af polystyren-latexpartikler. Testen omfatter almindeligvis overtrækning af latexpartikler
35 med et antigen stof, f.eks. hormoner, eller blodproteiner, såsom albumin, eller immunoglobuliner såsom IgG og IgM. La-

0 texpartikler er negativt ladet, og proteinet bindes ved hjælp af et adsorptionsfænomen. Et andet trin omfatter tilsætning af et andet reagens, der kan forårsage agglutination for de overtrukne latexpartikler.

5 I Aust. Vet. J., 56, 513 (1980) er der beskrevet en test til detektering af absorption af kolostrum-immunoglobuliner hos nyfødte føl. Testproceduren omfatter sammenblanding af latexpartikler og antiserum til rensset heste-immunoglobulin til overtrækning af latexpartiklerne med anti-10 -heste-IgG-antistoffer. Efter inkubering vaskes de overtrukne latexpartikler fri for uadsorberet anti-heste-IgG med frisk puffer og rekonstitueres med puffer. Antistof-latexblandingen sættes derpå til forsøgsprøver af følplasma. Udviklingen af et grynet, hvidt agglutinationsmønster indikerer en positiv test for tilstedeværelsen af immunoglobulin.

15 I Am. J. Med., 21, 888-893 (1956) beskrives anvendelsen af latex-flokkulationstesten til den serologiske diagnose af rheumatoid arthritis, idet der anvendes et IgM-immunoglobulin, der kendes som rheumatoid faktor (RF). Testproceduren omfatter først overtrækning af latexpartikler med hu-20 mant gammaglobulin. Efter inkubering vaskes de overtrukne latexpartikler fri for uadsorberet gammaglobulin med frisk puffer og rekonstitueres med puffer. Gammaglobulin-latexblandingen sættes derefter til en serumprøve fra en patient 25 med rheumatoid arthritis. Når testen modificeres ved blanding af en latexpartikelsuspension og serummet uden gammaglobulin, forårsager kun 11% af rheumatoide sera agglutination.

30 I US patentskrift nr. 3.088.875 beskrives der en latexflokkulationstest for et "C-reaktivt" protein, der almindeligvis findes i serum fra patienter med aktive inflammatoriske eller vævsødelæggende sygdomme. Testen involverer blanding af latexpartiklerne med humant gammaglobulin og opvarmning til 35 57°C. De med antistof overtrukne latexpartikler blandes dernæst med fortyndet serum fra en patient. Agglutination indikerer nærværelsen af det C-reaktive protein.

I US patentskrift nr. 3.551.555 beskrives der en test, der kan anvendes til detektering af et antigen, såsom humant choriogonadotropin, idet latexpartikler først overtrækkes med et indifferent protein, f.eks. albumin eller lactalbumin, og derpå overtrækkes med enten et antigen eller et antistof. De med protein-antistof eller med protein-antigen overtrukne latexpartikler blandes derefter med fortyndet serum fra en patient. Agglutination indikerer nærværelsen af et antigen.

Ifølge alle de ovenfor nævnte litteratursteder er der tale om først at overtrække latexpartiklerne med et proteinmateriale, hvorpå man omsætter de overtrukne latexpartikler med et andet reagens, idet det andet reagens i virkeligheden danner inter-latex-tværbroer, der igen forårsager "bro"-agglutination. I de nævnte litteratursteder er der ikke tale om angivelse af eller noget forslag om, at niveauet af føl- eller kalve-IgG eller niveauet af IgG i kolostrum fra en hoppe eller en ko kan bestemmes uden anvendelse af en antistof-antigenreaktion.

Opfindelsens formål er derfor at angive en fremgangsmåde til bestemmelse af den mængde IgG, der er til stede i en nyfødt kalv, et nyfødt føl eller i kolostrum hos en ko eller en hoppe uden anvendelsen af en antistof-antigenreaktion. Dette formål opnås ved fremgangsmåden ifølge krav 1, der omfatter trin, hvorved man bringer en legemsvæskeprøve fra det nyfødte dyr eller en prøve af kolostrum i kontakt med biologisk indifferente latexpartikler, måler den mængde agglutination, der fremkommer, og ud fra denne bestemmer den mængde IgG, der er til stede i prøven, hvorhos latexpartiklerne, der har en partikelstørrelse fra 0,109 til 0,81 μm , fortyndes med en puffer til en slutkoncentration fra 0,65 til 2,0% (vægt/rumfang) ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca. 9,0 idet legemsvæske- eller kolostrum-prøven fortyndes med en puffer til et område fra 0,01:12 dele til 0,01:-2160 dele på rumfang/rumfangsbasis, ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca. 9,0.

0

De kritiske grænser fra IgG synes at være følgende: under 200 mg/dl indikerer et behov for terapi, mellem 200 og 400 mg/dl er tvivlsomt, og over 400 mg/ml er tilstrækkeligt. Den her omhandlede fremgangsmåde tilvejebringer en bekvem måling af disse niveauer.

5

De latexpartikler, der anvendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse, kan være vilkårlige, egnede biologisk indifferente partikler. Egnede partikler omfatter polyvinyl-toluen, styren-butadien-latex, styren-divinylbenzen-latex, acryl-latex og polystyren-latex. Latexpartiklerne har som nævnt en størrelse fra 0,109 til 0,81 μm . Latexpartikler er kommercielt tilgængelige fra Dow Chemical Company, Midland, Michigan, Monsanto and Company, St. Louis, Missouri, Rhône-Poulenc, Paris, Frankrig, og AB Bofors, Örebro, Sverige.

10

15

Latexpartiklerne er kommercielt tilgængelige i form af en suspension, f.eks. en 10% vandig (vægt/rumfang) latexopløsning, og kan fortyndes med en egnet puffer. Egnede puffer er de, der er tilstrækkeligt opløselige i vand og har en høj pufferkapacitet ved en pH-værdi på fra ca. 7,5 til ca. 9. Eksempelvis er borat-salt-opløsning, glycin-salt-opløsning og N,N-bis-2-hydroxyethyl-glycin egnede puffer.

20

25

En egnet boratpuffer kan fremstilles ud fra 12,2 mmol $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ og 7,1 mmol HCl pr. cm^3 . En saltopløsning med fra 0,08 til 10% (vægt/rumfang) kan sættes til boratet. Et foretrukket område er fra 0,3 til 1,25 vægt%. Om ønsket kan borat-saltopløsnings-pufferen fremstilles ud fra 50 cm^3 0,1 M borsyre og 0,1 N NaOH, idet der fyldes op til 100 cm^3 med vand, og pH-værdien indstilles på ca. 8,2. Der sættes 0,85 g NaCl til hver 100 ml puffer.

30

En egnet glycin-salt-puffer er 0,1 M med en pH-værdi på 8,2 og indeholder 10 g NaCl pr. liter. Latexpartiklerne fortyndes til en slutkoncentration på fra 0,65 til 2% (vægt/rumfang) ved en pH-værdi på fra ca. 7,5 til ca. 9,0.

35

Legemsvæsken kan være blodplasma, serum eller helblod fra en nyfødt kalv eller et nyfødt føl, eller der kan anvendes kolostrum fra en hoppe eller en ko. Legemsvæsken

0

fortyndes til et område fra 0,01:12 dele til 0,01:2160 dele legemsvæsker:puffer på basis af rumfang/rumfang, idet der anvendes en puffer som ovenfor beskrevet.

5 Eksperimentelt arbejde har vist, at partikelstørrelsesbegrænsninger på fra 0,109 til 0,81 μm er af betydning. Når latexpartikelstørrelsen formindskes, forøges mængden af overfladeareal kraftigt, hvilket gør det vanskeligt at detektere agglutination. Når latexpartikelstørrelsen forøges, formindskes overfladearealet kraftigt.

10 Lignende betragtninger gør sig gældende med hensyn til 0,65:2,0 vægt%-begrænsningerne for mængden af tilstedeværende latexpartikler. Når koncentrationen af latexpartikler forøges til mere end 2,0 vægt%, bliver IgG-bestemmelsen ugennemførlig på grund af de store mængder IgG, der kræves. 15 Når koncentrationen af latexpartikler formindskes til mindre end 0,65 vægt%, bliver det i stigende grad vanskeligt at detektere agglutination.

Under anvendelse af latexpartikelstørrelser og koncentrationer som ovenfor beskrevet har det vist sig, at den 20 legemsvæske, der skal testes, skal fortyndes i området fra 0,01-12 dele til 0,01:2160 dele legemsvæske:puffer (på basis af rumfang/rumfang). Hvis legemsvæsken fortyndes til mere end 0,01:2160 legemsvæske:puffer, vil der kræves partikler større end 1 μm til agglutination inden for det samme IgG-niveau, og 25 de ville være vanskelige at arbejde med i systemet. Hvis legemsvæsken er mere koncentreret end svarende til 0,01:12 dele legemsvæske:puffer, vil enhver af de beskrevne størrelser latexpartikler blive agglutineret ved insignifikante niveauer af IgG.

30 Den rette fortynding af latex og serum med en egnet puffer kan let bestemmes af en fagmand på den i det følgende beskrevne måde. I en foretrukken udførelsesform anvendes der latexpartikler, der har en størrelse på 0,22 μm , fortyndet til en slutkoncentration på 2,0 vægt%.

35 I de følgende eksempler anvendes der, såfremt andet ikke er anført, latexpartikelopløsninger fra Dow Chemical Company.

0

Kontrolprocedure:

Prøver af følserum fås fra nyfødte føl ca: 6 til ca. 8 timer efter fødslen. Radial-immunodiffusions-testsæt ("RID"), der er kommercielt tilgængelige fra Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, anvendes på følgende måde. Testsættet indeholder anti-hest-IgG inkorporeret i pufret agarose. Agarosen har huller udstanset deri. En valgt standardmængde af det serum, på hvilket der skal måles, anbringes i et hul, og standard-kontrolprøver anbringes i andre huller. Serummet og agarosen får lov at inkubere ved stuetemperatur i fra ca. 16 til ca. 24 timer. Der dannes en ring af udfældning omkring hvert af hullerne, idet hver ring er proportional med den tilstedeværende mængde IgG. Diameteren af hver af ringene måles og afsættes mod koncentrationen på halvlogaritmisk papir. På basis heraf bestemmes den mængde IgG, der er til stede i serumprøverne.

10

15

Eksempel 1

En 10% 's (vægt/rumfang) opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,22 μm fortyndes i forholdet 1:5 (rumfang:rumfang) med N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-puffer (0,2 M, pH = 8,5) til en slutkoncentration på ca. 2% (vægt/rumfang).

20

25

30

Til hver test anvendes der følserum-prøver in duplo som anvendt ved kontrolprocedurerne. Det bestemmes ud fra en række forsøg, at et bekvemt IgG-bestemmelsesniveau vil blive tilvejebragt, såfremt den nødvendige mængde serum ikke er større end ca. 4 til ca. 6 dråber. På basis af disse forsøg sættes der 5 μl følserum til 8 ml N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-puffer (0,2 M, pH = 8,5), og der blandes grundigt (0,01 del prøve : 16 dele puffer, rumfang:rumfang).

35

Hver dråbe af den fortyndede latexpartikelblanding bestemmes at være 0,025 ml, og en halv dråbe af den fortyndede latex bestemmes at være ca. 0,10 ml. To dråber (hver med en størrelse på 0,025 ml) af den fortyndede latexpartikelblanding anbringes på en glasplade. Én dråbe følserum,

0

der er fortyndet som ovenfor angivet, tilsættes, og der omrøres. Pladen trækkes og drejes forsigtigt frem og tilbage, og blandingen iagttages for agglutination. Såfremt der ikke er nogen klart synlig agglutination efter ca. 10 sekunder, tilsættes der en yderligere dråbe fortyndet serum, og der blandes på samme måde. Denne titreringsprocedure fortsættes, indtil der fremkommer agglutination. Proceduren gentages for hver fortyndet prøve af følserum.

5

IgG-agglutinations-testresultaterne, der opnås, sammenlignes med de IgG-testresultater, der opnås ved kontrolproceduren. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

10

Tabel I

15

<u>RID IgG-niveau</u>	<u>Testmetode - Tilsat serumængde</u>
>400 mg/dl	1 dråbe fortyndet serum/2 dråber fortyndet latex; positiv agglutination
≥400 mg/dl	2 dråber; positiv agglutination
200-400 mg/dl	3 dråber; positiv agglutination
≤200 mg/dl	4 dråber; positiv agglutination
<200 mg/dl	4 dråber; positiv agglutination

20

Under anvendelse af de kriterier, der fremgår af tabel I, testes en serie på 77 følprøver ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og sammenlignes med de IgG-niveauer, der fastlægges ved RID-kontrolproceduren. Testresultaterne er sammenfattet i den følgende tabel.

25

30

35

Tabel II

Sammenfatning af titreringsresultater
 Procentdel af fælles resultater i hver IgG-niveau-gruppe

Gruppe-IgG-niveau (RID) mg/dl	Antal prøver i gruppe	(Antal)/procentdel agglutination baseret på testprocedure											
		1 dråbe	1,5 dråber	2 dråber	2,5 dråber	3 dråber	3,5 dråber	4 dråber	4,5 dråber	5 dråber	5,5 dråber		
>400	52	(8) 15,3%	(12) 23%	(28) 53%	(4) 7,7	0	0	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	0	0
<200	9	0	0	0	0	0	0	(6) 60%	(1) 10%	0	(2) 20%	0	0
Totalt antal prøver 77													

0

Ud af i alt 77 testede prøver er IgG-niveauet for 73 prøver (94,8%) i overensstemmelse med de IgG-niveauer, der opnås ved RID-kontrolproceduren. Tilsvarende resultater opnås, når testmetodens nøjagtighed sammenlignes med den

5

ZnSO₄-test, der er beskrevet i Eq. Vet., 6, 109 (1974).

Disse testresultater viser, at fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til bestemmelse af IgG-niveau er i besiddelse af en høj grad af nøjagtighed, når der måles i forhold til en anerkendt, kommercielt tilgængelig test.

10

Ved de bestemte reaktionsbetingelser, der anvendes, dvs. en latexpartikelstørrelse på 0,22 µm, fortyndet til 2,0% (vægt/rumfang), og et forhold legemsvæske:puffer på 0,01 del: 16 dele (rumfang:rumfang), bestemmes IgG-niveauet bekvemt ved anvendelse af op til 4,5 dråber fortyndet legemsvæske.

15

Eksempel 2

Serumprøver tages fra to føl og bestemmes ved RID-test at have en IgG-koncentration på henholdsvis ca. 1500 og ca. 0-200 mg/dl. Prøverne blandes til opnåelse af en serie med

20

følgende IgG-niveauer (mg/dl): 750, 500, 375, 300, 250 og 166.

Disse serumprøver anvendes som beskrevet i det følgende:

En 10%'s (vægt/rumfang) opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,22 µm fortyndes i forholdet 1:5 (rumfang/rumfang) med en N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-puffer (0,2 M, pH = 8,5) til en slutkoncentration på

25

ca. 2% (vægt/rumfang).

For hver test sættes der 5 µl følserum, der har den ovenfor angivne koncentration, til 6 ml af den ovenfor angivne puffer, og der blandes grundigt til en slutkoncentration

30

på 0,01 dele serum til 12 dele puffer (rumfang/rumfang). 1 dråbe af den fortyndede latexblanding blandes på en plade med 1 dråbe af det fortyndede serum, bevæges og drejes og

iagttages for agglutination. Hvis der ikke fremkommer nogen agglutination, blandes en anden fortyndet latexprøve (1 dråbe)

35

på en plade med 2 dråber af det fortyndede serum. Hvis der in-

0

gen agglutination fremkommer, gentages proceduren igen med 3 dråber fortyndet serum. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

5

Tabel III

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
750 x 2 = 1500	1 dråbe; positiv agglutination
500 x 2 = 1000	1 dråbe; positiv agglutination
375 x 2 = 750	1 dråbe; positiv agglutination
10 300 x 2 = 600	1 dråbe; positiv agglutination
250 x 2 = 500	1 dråbe; negativ, 2 dråber; positiv agglutination
166 x 2 = 332	1 og 2 dråber; negativ, 3 dråber; positiv agglutination

15

De testresultater, der er opnået ifølge tabel III, sammenlignes med titreringsresultaterne fra eksempel 1. Eftersom de i tabel I viste titreringsresultater er opnået under anvendelse af 1 dråbe serum/2 dråber fortyndet latex, multipliceres de i tabel III viste koncentrationer med en faktor 2 til sammenligning af tabel I og tabel III.

20

Resultaterne viser, at proceduren fra eksempel 2 korrelerer IgG-niveauet med det IgG-niveau, der fås ved titreringsproceduren ifølge eksempel 1 (korreleret til RID-kontrolproceduren). Eksempelvis giver 3 dråber serum ved et niveau på 25 166 mg/dl IgG ($x 2 = 332$ mg/dl) en positiv agglutination. Dette falder inden for området 200-400 mg/dl, der er indikeret ved en 3 dråbers agglutination som vist i tabel I. Tilsvarende resultater er vist for de andre IgG-niveauer.

30

Det er klart, at ved udførelse af den fremgangsmåde, der er beskrevet i eksemplerne 1 og 2, kan agglutinationen af legemsvæsken og latex iagttages, og niveauet af IgG, der er til stede i prøven, kan bestemmes herudfra. En fagmand kan indstille den koncentration af puffer og den størrelse og koncentration af latexpartikler, der kræves til detektering af 35

0

IgG-niveauer i en legemsvæske. Disse niveauer kan let optimeres til tilvejebringelse af en bekvem IgG-test.

I de følgende eksempler anvendes der et bredt område af reaktionsbetingelser. Reaktionsbetingelserne er ikke nødvendigvis optimerede, og derfor er de opnåede agglutinationsværdier, dvs. IgG-niveauerne, i mange af eksemplerne ikke direkte sammenlignelige med de ifølge eksempel 1 opnåede agglutinationsværdier. Det fremgår imidlertid af hvert eksempel, at når mængden af IgG, der er til stede i prøverne, forøges eller formindskes, varierer mængden af agglutination således, at IgG kan måles ved hjælp af den her omhandlede fremgangsåde.

Såfremt intet andet er angivet, opnås de koncentrationer af følserum, der anvendes i de følgende eksempler, som beskrevet i eksempel 2.

Til bestemmelse af virkningen af ændring af partikelstørrelsen til ca. 0,10 μm udføres der den i det følgende beskrevne procedure.

Eksempel 3

En 10%'s vandig opløsning af polystyren-butadien-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,109 μm fortyndes i forholdet 1:15 med pufferen ifølge eksempel 1 til en slutkoncentration på ca. 0,67% (vægt/rumfang).

Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 6 ml af den ovennævnte puffer, og der blandes grundigt til en slutkoncentration på 0,01 dele serum til 12 dele puffer (rumfang/rumfang). 1 dråbe af den fortyndede latexblanding blandes med 1, 2 eller 3 dråber af det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenstillet i den følgende tabel.

30

35

0

Tabel IV

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
750 x 2 = 1500	1 dråbe; negativ, 2 dråber; positiv agglutination
500 x 2 = 1000	1 dråbe; negativ, 2 dråber; positiv agglutination
375 x 2 = 750	1, 2 dråber; negativ, 3 dråber; positiv agglutination
300 x 2 = 600	1, 2, 3 dråber; negativ agglutination

10

Som det fremgår af de ovenstående resultater, er forholdet det, at når den mængde IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde serum, der kræves til agglutination. Den formindskede latexpartikelstørrelse frembringer en tilsvarende forøgelse af overfladearealet, hvilket kræver en større fortynding af latexpartikelkoncentrationen.

15

I eksemplerne 4 og 5 indstilles prøverne af følserum til opnåelse af en serie med de IgG-koncentrationer, der fremgår af de respektive tabeller.

20

Eksempel 4

En 10%'s vandig opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,497 μm fortyndes i forholdet 1:5 med en puffer ifølge eksempel 1 til en slutkoncentration på ca. 2% (vægt/rumfang).

25

Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 108 ml af den ovennævnte puffer, og der blandes grundigt til en slutkoncentration på 0,01 del serum til 216 dele puffer (rumfang/rumfang). 1 Dråbe af den fortyndede latex blandes med 1, 2 eller 3 dråber af det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

30

35

0

Tabel V

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
900 x 2 = 1800	1 dråbe; positiv agglutination
370 x 2 = 740	1 dråbe; tvivlsom, 2 dråber; positiv agglutination
200 x 2 = 400	1 dråbe; negativ, 2 dråber; po- sitiv agglutination

5

10 Det fremgår af ovenstående resultater, at forholdet er
det, at når mængden af IgG, der er til stede ifølge eksemplet,
formindskes, forøges den mængde serumprøve, der kræves til
agglutination. Det er nødvendigt at forøge fortyndingen af se-
rumprøven, fordi forøgelsen i latexpartikelstørrelse tilveje-
bringer en formindskelse af overfladearealet af latexpartik-
15 lerne.

Eksempel 5

20 En 10%'s vandig opløsning af polystyren-latexpartikler
med en partikelstørrelse på 0,807 μm fortyndes i forholdet 1:5
med en puffer ifølge eksempel 1 til en slutkoncentration på
ca. 2% (vægt/rumfang).

25 Ved hver test sættes 5 μl følserum til 1080 ml af den
ovennævnte puffer, og der blandes grundigt til en slutkoncen-
tration på 0,01 del serum til 2160 dele puffer. 1 Dråbe af den
fortyndede latex blandes på en plade med 1 eller 3 dråber af
det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede
testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

Tabel VI

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
900 x 2 = 1800	1 dråbe; positiv agglutination
370 x 2 = 740	1 dråbe; negativ agglutination, 3 dråber; positiv agglutination
200 x 2 = 400	3 dråber; negativ agglutination

35

0

Det fremgår af de ovenstående data, at forholdet er det, at når den mængde IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde af serumprøve, der kræves til agglutination. De ovenstående data illustrerer endvidere den virkning, der er vist i eksempel 4: en forøgelse af latexpartikelstørrelsen fører til en formindskelse i overfladearealet af latexpartiklerne, hvilket kræver en yderligere forøgelse af fortyndingen af serumprøven.

5

10 Eksempel 6

10 g natriumchlorid sættes til 1 liter af en puffer ifølge eksempel 1 til fremstilling af en 2-hydroxyethylglycin-salt-puffer. En 10%'s vandig opløsning af polystyren-butadien-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,109 μm fortyndes i forholdet 1:15 i denne puffer til en slutkoncentration på ca. 0,67% (vægt/rumfang).

15

Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 6 ml af den ovennævnte puffer, og der blandes grundigt. 1 dråbe af den fortyndede latexblanding blandes på en plade med 1, 2 eller 3 dråber af den fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

20

Tabel VII

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummenge</u>
750 x 2 = 1500	1 dråbe; positiv agglutination
500 x 2 = 1000	1 dråbe; positiv agglutination
375 x 2 = 750	1 dråbe; positiv agglutination
300 x 2 = 600	1 dråbe; positiv agglutination
250 x 2 = 500	1 dråbe; negativ, 2 dråber; positiv agglutination
166 x 2 = 332	1 og 2 dråber; negativ, 3 dråber; positiv agglutination

30

35

0

Som det ses af de ovenstående data, er forholdet det, at når mængden af IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde serumprøve, der kræves til agglutination. Desuden viser disse resultater også den ændring, der opnås ved valg af pufferen. Tilsætningen af saltopløsning til pufferen bevirker, at latexpartiklerne med en størrelse på 0,109 μm fungerer på en måde, der svarer mere til opførslen af latexpartiklerne med en størrelse på 0,22 μm ifølge eksempel 2 end til opførslen af latexpartiklerne med en størrelse på 0,109 μm ifølge eksempel 3.

5
10

Prøver af følserum blandes til fremstilling af en serie, der indeholder 3000 mg/dl IgG og 1500 mg/dl IgG, bestemt ved RID-afprøvning, og disse prøver anvendes som beskrevet i det følgende eksempel.

15

Eksempel 7

En 10%'s vandig opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,22 μm fortyndes i forholdet 1:5 med en glycinpuffer (0,1 M, pH = 8,2) til en slutkoncentration på ca. 2% (vægt/rumfang).

20

Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 6 ml af den ovennævnte glycinpuffer, og der blandes grundigt. 1 Dråbe af den fortyndede latex blandes på en plade med 1, 2 eller 3 dråber af det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

25

Tabel VIII

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummenge</u>
3000 x 2 = 6000	1 og 2 dråber; negativ, 3 dråber; positiv agglutination
1500 x 2 = 3000	1, 2 og 3 dråber; negativ agglutination

30

Forholdet er atter det, at når den mængde IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde se-

35

0

rumprøve, der kræves til agglutination. Nærværelsen af glycin i stedet for pufferen ifølge det foregående eksempel kræver tilstedeværelse af stor mængde IgG til fremkaldelse af agglutination.

5

Eksempel 8

En 10%'s vandig opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,22 μm fortyndes i forholdet 1:5 med en glycin-salt-puffer (0,1 M, pH = 8,2, 10 g natriumchlorid pr. liter) til en slutkoncentration på ca. 2% (vægt/rumfang).

Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 6 ml af glycin-salt-pufferen, og der blandes grundigt. 1 Dråbe af den fortyndede latex blandes på en plade med 1, 2 eller 3 dråber af det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenfattet i den følgende tabel.

15

Tabel IX

<u>mg/gI IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
750 x 2 = 1500	1 dråbe; positiv agglutination
500 x 2 = 1000	1 dråbe; positiv agglutination
375 x 2 = 750	1 dråbe; positiv agglutination
300 x 2 = 600	1 dråbe; positiv agglutination
250 x 2 = 500	1 dråbe; negativ, 2 dråber; positiv agglutination
166 x 2 = 332	1 og 2 dråber; negativ, 3 dråber; positiv agglutination

25

30

35

Forholdet er atter det, at når den mængde IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde af serumprøven, der kræves til agglutination. Tilsætningen af salt til glycinpufferen ifølge eksempel 7 forøger kraftigt sensitiviteten af IgG-testen. Når glycin alene som puffer kræver store mængder IgG til agglutination, har den ovennævnte glycin-salt-puffer en sensitivitet svarende til den, der frem-

0

går af eksempel 2 (N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-puffer).

Eksempel 9

5 En 10%'s opløsning af polystyren-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,22 μm fortyndes i forholdet 1:5 med en borat-salt-puffer (0,125 M, pH = 8,4, 8,5 g natriumchlorid pr. liter) til en slutkoncentration på ca. 2% (vægt/rumfang).

10 Borat-salt-pufferen fremstilles ved blanding af 50 ml 0,1 M borsyre og 5,9 ml 0,1 N NaOH, idet der fortyndes op til 100 ml med vand, og pH-værdien indstilles på ca. 8,2. Der sættes 0,85 g NaCl til hver 100 ml puffer.

15 Ved hver test sættes der 5 μl følserum til 6 ml af borat-salt-pufferen, og der blandes grundigt. 1 Dråbe af den fortyndede latex blandes på en plade med 1, 2 eller 3 dråber af det fortyndede serum som beskrevet i eksempel 1. Testresultaterne er i det væsentlige de samme som ved anvendelsen af glycin-salt-pufferen ifølge eksempel 8.

Eksempel 10

20 En 10%'s vandig opløsning af polystyren-butadien-latexpartikler med en partikelstørrelse på 0,109 μm fortyndes i forholdet 1:5 med en puffer ifølge eksempel 1 til en slutkoncentration på ca. 2%.

25 Ved hver test fremstilles der prøver af følserum som beskrevet i eksempel 1. Der sættes 5 μl følserum til 10 ml af den ovennævnte puffer og blandes grundigt. 1 Dråbe af det fortyndede serum sættes til 1 dråbe af den fortyndede latex som beskrevet i eksempel 1. De opnåede testresultater er sammenstillet i den følgende tabel.

30

35

0

Tabel X

<u>mg/dl IgG (RID)</u>	<u>Tilsat serummængde</u>
900 x 2 = 1800	4 dråber; positiv agglutination
370 x 2 = 740	7 dråber; positiv agglutination
5 200 x 2 = 400	9 dråber; positiv agglutination

10 Agglutinationen kan reverseres ved tilsætning af en yderligere dråbe fortyndet latex, og derefter kan der agglutineres igen med mere fortyndet serum. Denne reversibilitet af agglutinationen viser, at slutpunktet kan fastlægges nøjagtigt.

Eksempel 11

15 Fremgangsmåden fra eksempel 1 og eksempel 2 gentages under anvendelse af neonatalt kalveserum i stedet for følse- rum. Testresultaterne viser, at når mængden af IgG, der er til stede i serumprøven, formindskes, forøges den mængde serumprøve, der kræves til agglutination. Testresultaterne viser, at fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes til måling af agglutination og til bestemmelse af 20 mængden af IgG, der er til stede i prøven af kalveserum.

Eksempel 12

25 Fremgangsmåden fra eksempel 1 gentages, idet der anvendes helblod fra føl og helblod fra kalve i stedet for følse- rum. Testresultaterne viser, at den her omhandlede fremgangs- måde kan anvendes til måling af agglutination og til bestem- melse af den mængde IgG, der er til stede i helblod fra et føl eller en kalv.

30

Eksempel 13

35 Fremgangsmåden ifølge eksempel 1 kan gentages med kolo- strum i stedet for serum til bestemmelse af egnetheden af ko- lostrum fra en fødende hoppe eller ko til overførsel af immuno- globulin til et nyfødt føl eller en nyfødt kalv.

0

Anvendeligt kolostrum vil have en IgG-niveau på ca. 1000 mg/dl eller derover. For at bringe kolostrum-prøven ind i et område, der nogenlunde svarer til serumområdet i eksempel 1, fortyndes det anvendte kolostrum i forholdet 1:5 med en egnet puffer til fremstilling af en prøve med en koncentration på ca. 200 mg/dl.

En 10%'s (vægt/rumfang) opløsning af polystyren-partikler med en partikelstørrelse på 0,22 μm fortyndes i forholdet 1:5 (rumfang/rumfang) med N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-puffer (0,2 M, pH = 8,5) til en slutkoncentration på ca. 2% efter vægt/rumfang.

Til hver test sættes der en 5 μl prøve af det fortyndede kolostrum til 8 ml af den ovennævnte puffer, og der blandes grundigt til en slutkoncentration på 0,01 dele kolostrum til 16 dele puffer (rumfang/rumfang). Denne fortynding anvendes derpå til titrering af 2 dråber latex som i eksempel 1.

20

25

30

35

0

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af den mængde IgG,
der er til stede i en nyfødt kalv, et nyfødt føl eller
5 i kolostrum hos en ko eller en hoppe, k e n d e t e g -
n e t ved, at man bringer en legemsvæskeprøve fra det nyfødte
dyr eller en prøve af kolostrum i kontakt med biolo-
gisk indifferente latexpartikler, måler den mængde agglutina-
tion, der fremkommer, og ud fra denne bestemmer den mængde IgG,
10 der er til stede i prøven, hvorhos latexpartiklerne, der har
en partikelstørrelse fra 0,109 til 0,81 μm , fortyndes med en
puffer til en slutkoncentration fra 0,65 til 2,0%, beregnet
på vægt/rumfangsbasis, ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca.
9,0, idet legemsvæske- eller kolostrum-prøven fortyndes med
15 en puffer til et område fra 0,01:12 dele til 0,01:2160 dele
på rumfang/rumfangsbasis, ved en pH-værdi fra ca. 7,5 til ca.
9,0.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
20 ved, at der som legemsvæske anvendes blodplasma, blodserum
eller helblod.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
25 ved, at der anvendes en puffer valgt fra gruppen bestående af
borat-salt, glycin-salt og N,N-bis-2-hydroxyethylglycin-salt.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at der anvendes latexpartikler med en partikelstørrelse
30 på 0,22 μm og et forhold mellem legemsvæske og puffer på 0,01:
16 dele.

35