NORGE
[NO]

STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

[B] (11) **UTLEGNINGSSKRIFT** Nr. 145356

(51) Int. Cl.³ G 01 N 33/68

(21) Patentsøknad nr. 751910
(22) Inngitt 29.05.75
(23) Løpedag 29.05.75

(41) Alment tilgjengelig fra 09.02.76
(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 23.11.81

(30) Prioritet begjært 06.08.74, USA, nr. 495161

(54) Oppfinnelsens benevnelse

Testpreparat for påvisning av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blodplasma.

(71)(73) Søker/Patenthaver

WARNER-LAMBERT COMPANY,
201 Tabor Road,
Morris Plains, NJ 07950,
USA.

(72) Oppfinner

JAMES EDWARD TURNER, Madison, NJ,
JAMES RHETT BUTLER, Parsippany, NJ,
ARTHUR LAWRENCE BABSON, Chester, NJ,
USA.

(74) Fullmektig

Cand. mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner

Niewiarowski, s. et al., J. Lab. Clin. Med., Vol.77, No. 4, s. 665 - 676 (1971)

Sykdomstilstander hvori intravaskulær koagulering bidrar til sykdommen er i økende grad blitt erkjent. Sykdommen innbefatter vanligvis et visst sammenbrudd i blodlevringsmekanismen, som resulterer i unormale mengder av fibrin-monomerer eller fibrin-nedbrytningsprodukter i blodserum. I et friskt individ omdannes fibrinogen til fibrin ved hjelp av trombin i blodet. Sykdomstilstander som er karakterisert ved et overskudd av trombin forårsaker at større mengder fibrinogen omdannes til fibrin og en blodlevring oppstår. Den således fremkomne blodlevring oppløses langsomt av plasmin som forefinnes og tilfører store mengder fibrin-monomerer og/eller fibrin-nedbrytningsprodukter til hele legemet, en tilstand som vanligvis er kjent som spredd intravaskulær koagulering.

En direkte bestemmelse av nærværet av store mengder trombin som virker til å starte reaksjoner i blodet som leder til spredd intravaskulær koagulering har ikke vært mulig, siden dette enzymet raskt inaktiveres. Derfor oppnås indirekte diagnose av sykdomstilstander karakterisert ved intravaskulær koagulering ved å identifisere de unormale mengder av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter som er resultatet av overskudd trombin.

Stafylokokk-klumpetesten er anvendt for å måle intravaskulær koagulering: Leavelle, Dennis E. et al., Am. J. Clin. Path., 55, s. 452-457, 1971. Denne test gir imidlertid positive resultater på nærvær av fibrin-nedbrytningsprodukter men dessuten også for fibrinogen-nedbrytningsprodukter. Fibrinogen-nedbrytningsprodukter oppstår når et overskudd av plasmin opptrer i blodet, og deres nærvær indikerer ikke intravaskulær koagulering. Bare nærvær av unormale mengder av fibrin-monomerer og/eller fibrin-nedbrytningsprodukter reflekterer spesifikt nærværet av overskudd trombin og derav følgende intravaskulær koagulering. En positiv stafylokokk-klumpetest tjener derfor ikke utvetydig til å diagnostisere intra-

vaskulær koagulering.

Påvisning av løselige fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter hvis nærvær leder til en bekreftende diagnose på intravaskulær koagulering, er oppnådd ved anvendelse av protaminsulfattesten. Blodplasma som inneholder løselige fibrin-monomerer eller løselige fibrin-nedbrytningsprodukter vil ved tilsetning av protaminsulfat påvise nærvær av disse substanser ved at det dannes av fibrin-"geler" eller fibrin-"strenger". Variasjoner av denne testen er beskrevet i en rekke nyutgitte arbeider: Gurewich, V. et al, Annuals of Internal Medicine, 75, s. 895-902, 1971, Newiarowski, S. et al., Journal of Laboratory Clinocal Medicine, 77, s. 666, 1971, Sanfelippo, M. J. et al., American Journal of Clinical Pathology, 56, s. 166, 1971.

Selv om de ovennevnte bestemmelser i høy grad har forbedret sannsynligheten for en nøyaktig og pålitelig diagnose av de forskjellige sykdomstilstander som innbefatter intravaskulær koagulering, har det vært vanskeligheter med å identifisere lave konsentrasjoner av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter og med å adskille sluttpunkter for positive reaksjoner. En forstyrrende faktor er at plasma inneholder fibrinogen. Mens protaminsulfatet utfeller både fibrinogen og fibrinogen-nedbrytningsprodukter som et hvitt, fjæraktig, fnokket produkt, er dette produkt vanligvis adskillbart fra den "gel" eller "streng" som dannes fra fibrin-monomerer eller fibrin-nedbrytningsprodukter i nærvær av protaminsulfat. Ved lave konsentrasjoner kan imidlertid en klar gjenkjennelse og identifisering av de tråd-lignende fibrin-strenger være meget vanskelig, spesielt i nærvær av det fjæraktige og fnokkede fibrinogen-bunnfallet.

Tidlig diagnose av intravaskulær koagulering er således noe usikker når det anvendes tilgjengelige testmetoder. Terapi for sykdomstilstander som innbefatter intravaskulær koagulering er tilgjengelig, men effektiv bruk av denne terapi avhenger i høy grad av at terapien starter før vevsødeleggelse eller funksjonsfeil oppstår. Tidlig diagnose av små mengder av intravaskulær koagulering er derfor kritisk.

Foreliggende oppfinnelse gjelder et forbedret testpreparat for påvisning av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blodplasma, omfattende en saltløsning inneholdende fra 0,0125 til 0,2 vekt% protaminsulfat basert på totalvekten av saltløsningen, og hvor saltløsningens pH er justert til $6,50 \pm 0,05$. Preparatet karakteriseres ved at det inneholder fra

0,00042 til 0,00165 vekt% findelte, farvede partikler basert på totalvekten av saltløsningen, kolloidalt suspendert i saltløsningen. Det forbedrede preparat fremstilles ved å oppløse protaminsulfatet i saltløsningen og justere pH, å suspendere de fargede partiklene (fortrinnsvis kjønrøk i form av en tusj) i saltløsningen og langsomt å tilsette suspensjonen av fargede partikler til protaminsulfatløsningen og justere pH til 6,50 ± 0,05. Eventuelt kan det forbedrede testpreparat lyofiliseres. Bestemmelse av små mengder intravaskulær koagulering i blodplasma er mulig ved bruk av dette forbedrede preparat.

Det er nå funnet at vanskeligheter som opptrer ved positiv identifikasjon av små mengder av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blod, kan overkommes ved å anvende de forbedrede protaminsulfat-testpreparater ifølge oppfinnelsen. Der er spesielt blitt funnet at suspensjonen av findelte, fargede partikler i protaminsulfat-utfelningsløsninger som anvendes for identifisering av fibrin-monomerer i blodplasma skaffer et mer bestemt sluttpunkt for denne test. De tilsatte fargede partikler er kolloidalt suspendert i protaminsulfatløsningen og blir innfanget når fibrin-strengene og fibrin-gelene faller ut og antar partiklenes farge. Fibrin-strengene og fibrin-gelene er således meget lettere å utskille selv ved relativt lave konsentrasjoner. Ved bruk av det forbedrede preparatet ifølge oppfinnelsen er det funnet at fibrin-monomerer i blodplasma i konsentrasjoner så lave som 0,89 mg/100 ml plasma kan påvises.

Fargede partikler som er egnet for bruk i det forbedrede protaminsulfat-preparatet ifølge oppfinnelsen omfatter fargede partikler som har en diameter som varierer i størrelse fra 90 til 400 nm, som kan suspenderes i protaminsulfatløsningen.

Fargede pigmenter som for eksempel "Red Oxide", "Yellow Oxide", "Carbon Black", "Benzidine Orange", "Phtalo Green", "Phtalo Blue", "Ultramarine Blue", "Brown Oxide" og lignende som er tilgjengelig kommersielt i vanndispersjoner kan således brukes ved utførelsen av oppfinnelsen. De sterkere fargede partikler foretrekkes, siden de er funnet å skaffe en lettere observerbar fargekontrast. Kjønrøk er effektiv i så henseende og sot er spesielt foretrukket. En form for sot som er funnet å være spesielt egnet er tusj. Soten i tusj er kolloidalt suspendert i vandig løsning som det er tilsatt forskjellige gummilignende suspenderingsmidler til.

Ved fremstilling av det forbedrede reagenspreparatet for påvisning av intravaskulær koagulering ifølge oppfinnelsen er konsentrasjonen så vel som størrelsen av de findelte, fargede partiklene i protaminsulfatløsningen kritisk. Dersom det er for høy konsentrasjon vil noen fargede partikler forbli i suspensjon når fibrin-gelen eller -strengen dannes, og det vil ikke bli den nødvendige kontrast mellom suspensjonen og gelen eller strengen til å forbedre synligheten av sluttproduktet. Om en utilstrekkelig mengde findelte, fargede partikler er til stede vil fibrin-strengene og/eller fibrin-gelene bli bare svakt farget. Igjen vil det ikke opptre noen forbedring i synligheten av sluttproduktet.

For å forbedre påvisningen av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blodplasma er det således ifølge det som læres i oppfinnelsen skaffet en saltløsning inneholdende fra 0,0125 til 0,2 vekt%, fortrinnsvis 0,025 til 0,1 vekt%, mest foretrukket 0,1 vekt% protaminsulfat basert på totalvekten av saltløsningen, og fra 0,00042 til 0,00165, fortrinnsvis 0,00065 til 0,00109, mest foretrukket 0,00083 vekt% av findelte, fargede partikler basert på totalvekten av saltløsningen, suspendert i saltløsningen. pH i saltløsningen som inneholder protaminsulfatet og de findelte, fargede partikler, bør justeres til 6,50 $\pm$ 0,05. Det forbedrede testpreparatet ifølge oppfinnelsen kan eventuelt lyofiliseres og rekonstitueres med vann for bruk ved bestemmelse av intravaskulær koagulering i blodplasma.

For å oppnå det ovenfor beskrevne forbedrede preparat for påvisning av intravaskulær koagulering er det nødvendig først å fremstille en løsning av protaminsulfatet i saltløsningen som inneholder 0,7 til 0,95 % natriumklorid. Fortrinnsvis brukes en fysiologisk saltløsning inneholdende 0,85 % natriumklorid. Denne løsnings pH bør justeres til 6,50 $\pm$ 0,05. De findelte, fargede partiklene suspenderes så i en like stor mengde saltløsning. Derpå tilsettes et volum av suspensjonen av fargede partikler i saltløsning til et like stort volum protaminsulfat-saltløsning. Sluttpreparatets pH justeres til 6,50 $\pm$ 0,05. Vanligvis anvendes 0,1n natriumhydroksyd for pH-justeringene. Det oppnås på denne måten et forbedret reagenspreparat som kan lyofiliseres for å lette transport og for å øke stabiliteten ved oppbevaring. Det er funnet at rekonstitusjon av det lyofiliserte preparatet ifølge oppfinnelsen med vann vil gi en suspensjon av de findelte fargede partiklene i protaminsulfat-saltløsningen som uten vanskelighet kan brukes for å påvise intravaskulær koagulering.

En fremgangsmåte for påvisning av nærvær av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blodplasma anvender seg av seriefortynning av det forbedrede preparatet ifølge oppfinnelsen. Seriefortynningene fremstilles som følger:

A. En saltløsning inneholdende 0,4 vekt% protaminsulfat fremstilles og pH justeres til 6,50± 0,05.

B. En konsentrasjon av 0,00165 vekt% findelte, fargede partikler suspenderes i en ytterligere mengde saltløsning.

C. Et volum av den kolloidale suspensjon av fargede partikler (B.) tilsettes gradvis til et like stort volum av saltløsningen inneholdende protaminsulfat (A.) for å skaffe et kombinert reagenspreparat inneholdende 0,2 vekt% protaminsulfat og 0,00083 vekt% av findelte, fargede partikler. Dette kombinerte preparats pH justeres igjen til 6,50 ± 0,05.

D. En gjenværende porsjon av saltløsningen med 0,00165 vekt% suspenderte fargede partikler fortynnes med ytterligere saltløsning slik at det oppnås en saltløsning inneholdende 0,00083 vekt% findelte, fargede partikler suspendert i saltløsningen.

E. Fire ytterligere seriefortynninger av det forbedrede testpreparatet ifølge oppfinnelsen oppnås ved å fortynne (C.) med (D.).

Seriefortynninger av det forbedrede preparatet ifølge oppfinnelsen inneholdende 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 og 0,0125 vekt% protaminsulfat oppnås således. Hver fortynning inneholder også 0,00083 vekt% findelte, fargede partikler.

Aktuell påvisning av intravaskulær koagulering ved anvendelse av det forbedrede preparat ifølge oppfinnelsen foregår ved å tilsette en mengde av en blodplasmaprøve til et reagensrør inneholdende det forbedrede preparat ifølge oppfinnelsen. Innholdet blandes så ved å gynge reagensrøret forsiktig og så la det stå ved romtemperatur i 30 minutter. I løpet av denne tiden vil det danne seg fargede fibrin-strenger eller fargede fibrin-geler dersom det har funnet sted intravaskulær koagulering, og fibrin-monomerer og/eller fibrin-nedbrytningsprodukter finnes i blodplasmaet. Ved forsiktig rysting av reagensrøret og visuell observasjon på nærvær av disse fargede fibrin-strenger og/eller

fargede fibrin-geler, kan det gjøres en positiv observasjon av intravaskulær koagulering. Dersom det hverken kommer til syne fargede fibrin-strenger eller fargede fibrin-geler er testresultatet negativt. Det er også funnet at nærvær av fibrinogen og/eller fibrinogen-nedbrytningsprodukter ikke påvirker det spesifikke sluttpunktet for den forbedrede testfremgangsmåte ifølge oppfinnelsen. Gjenkjennelse og identifikasjon av de tråd-lignende fibrin-strengene som indikerer tidlig intravaskulær koagulering, kan utføres i nærvær av det fjærlignende og fnokkede bunnfallet som oppstår fra utfelte fibrinogen- og/eller fibrinogen-nedbrytningsprodukter.

Ved utnyttelse av den ovenfor beskrevne seriefortynningstestmetode ifølge oppfinnelsen tilsettes 0,2 ml blodplasmaprøve til 0,2 ml av hver av seriefortynningene av C og E beskrevet ovenfor. Blodplasma og seriefortynningene blandes og observeres visuelt som beskrevet ovenfor på nærvær av fargede fibrin-strenger eller fargede fibrin-geler. Den foran nevnte seriefortynnings-testmetode kan gjøres semi-kvantitativ om den kjøres mot standard plasmatestløsninger som inneholder kjente konsentrasjoner av fibrin-monomer.

For å oppnå nøyaktige positive/negative testresultater uten hensyn til mengder er det funnet mulig å utnytte bare den andre seriefortynningen i den foran nevnte seriefortynnings-testmetoden. Et testpreparat inneholdende 0,1 vekt% protaminsulfat og 0,00083 vekt% av findelte, fargede partikler i en saltløsning fremstilles således og pH i preparatet justeres til 6,50 $\pm$ 0,05. Dette sistnevnte preparat kan lyofiliseres for å lette transport og å øke stabiliteten ved oppbevaring. For å utføre testen rekonstitueres det lyofiliserte preparat og 0,2 ml blodplasmaprøve tilsettes til 0,2 ml av det rekonstituerte reagenstestpreparat. Testprøven og reagenspreparatet blandes ved forsiktig gynging, innholdet får stå ved romtemperatur i 30 minutter og rystes så forsiktig. Nærværet av fargede fibrin-strenger og/eller fargede fibrin-geler er en positiv indikasjon på intravaskulær koagulering dersom det er visuelt observerbart.

Det er funnet at konsentrasjoner av fibrin-monomer i blodplasma så lave som 0,89 mg/100 ml plasma er påvisbare enten ved å bruke denne sistnevnte testmetode eller den tidligere beskrevne seriefortynningstestmetode. En ytterligere fordel ved det forbedrede preparat ifølge oppfinnelsen er at det bare behøves minimal trening for å oppnå nøyaktige testresultater. Samtidig prøveanalyse er relativt rask siden alle nødvendige reagenser er

fremstilt på forhånd. Tidlig påvisning av intravaskulær koagulering er således mulig ved å bruke det forbedrede preparatet og den forbedrede testmetode ifølge oppfinnelsen.

For ytterligere å illustrere oppfinnelsens utførelse hitsettes følgende eksempler:

Eksempel I

Fremstilling av seriefortynninger av protaminsulfat-reagens inneholdende fargede partikler

A. En 0,4 % løsning av protaminsulfat fremstilles ved oppløsning av 1,20 gram protaminsulfat i 300 ml 0,85 % saltløsning og pH justeres til 6,50 ± 0,05 med 0,1n natriumhydroksyd.

B. 0,075 ml tusj suspenderes i 300 ml 0,85 %-ig saltløsning for å skaffe 0,00165 vekt% sotpartikler.

C. Et like stort volum av (B.) tilsettes gradvis til et like stort volum av (A.) for å danne et kombinert reagenspreparat som inneholder 0,2 vekt% protaminsulfat og 0,00083 vekt% sotpartikler og pH justeres til 6,50 ± 0,05 med 0,1n natriumhydroksyd.

D. Den gjenværende porsjon av (B.) fortynnes med et like stort volum av 0,85 %-ig saltløsning for å skaffe 0,00083 vekt% sotpartikler. Denne suspensjon av fargede partikler brukes for å seriefortynne (C.) og skaffe i alt fem seriefortynninger av det kombinerte reagenspreparat inneholdende 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 og 0,0125 % protaminsulfat, hvilke hver inneholder 0,00083 vekt% sotpartikler.

Eksempel II

Bestemmelse av intravaskulær koagulering

0,2 ml prøve av blodplasma tilsettes til 0,2 ml av hver av seriefortynningene fra (D.) i eksempel I ovenfor i adskilte beholdere. Prøven av blodplasma og seriefortynningene blandes ved forsiktig gynging av de enkelte beholderne og de får stå ved romtemperatur i 30 minutter. De enkelte beholderne rystes så og de observeres på fargede fibrin-strenger og fargede fibrin-geler som en positiv indikasjon på spredd intravaskulær koagulering.

Eksempel III

Fremstilling av protaminsulfatreagens inneholdende fargede partikler

0,2 % protaminsulfatløsning fremstilles ved å oppløse 0,60 gram protaminsulfat i 300 ml 0,85 % saltløsning og justere av pH til ca. 6,50 ± 0,05 med 0,1n natriumhydroksyd, tilsette 0,075 ml

tusj til 300 ml 0,85%ig saltløsning
for å skaffe 0,00165 vekt% sotpartikler, gradvis tilsette tusj/saltløsningen til protaminsulfat-saltløsningen og på nytt justere pH til 6,50 ± 0,05 og lyofilisere i 2,0 ml alikvoter.

Eksempel IV

Bestemmelse av intravaskulær koagulering

En lyofilisert alikvot fra eksempel III rekonstitueres med 2 ml vann og beveges forsiktig for å løse den opp. 0,2 ml blodplasmaprøve tilsettes til 0,2 ml rekonstituert reagens fra eksempel III og blandes forsiktig ved å gynge beholderen. Beholderen får stå ved romtemperatur i 30 minutter hvoretter den rystes forsiktig og observeres for å påvise nærvær av fargede fibrin-strenger og fargede fibrin-geler som en positiv indikasjon på spredd intravaskulær koagulering.

P a t e n t k r a v

1. Testpreparat for påvisning av fibrin-monomerer og fibrin-nedbrytningsprodukter i blodplasma, omfattende en saltløsning inneholdende fra 0,0125 til 0,2 vekt% protaminsulfat basert på totalvekten av saltløsningen, og hvor saltløsningens pH er justert til 6,50± 0,05, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder fra 0,00042 til 0,00165 vekt% findelte, farvede partikler basert på totalvekten av saltløsningen, kolloidalt suspendert i saltløsningen.

2. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de farvede partiklene har en diameter på fra 90 til 400 nm.

3. Preparat ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder fra 0,025 til 0,1 vekt% protaminsulfat og fra 0,00065 til 0,001097 vekt% kjønrøk.

4. Preparat ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder 0,1 vekt% protaminsulfat og 0,00083 vekt% sotpartikler.