(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **164757 B**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3601/86
(22) Indleveringsdag: 29 jul 1986
(24) Løbedag: 05 dec 1985
(41) Alm. tilgængelig: 29 jul 1986
(44) Fremlagt: 10 aug 1992
(86) International ansøgning nr.: PCT/EP85/00675
(86) International indleveringsdag: 05 dec 1985
(85) Videreførelsesdag: 29 jul 1986
(30) Prioritet: 06 dec 1984 IT 23926/84

(51) Int.Cl.5 G 01 N 33/543
C 12 M 1/26

(71) Ansøger: *BOEHRINGER BIOCHEMIA ROBIN S.P.A.; Via S. Uguzzone 5; 20126 Milano, IT
(72) Opfinder: Ennio *Iaccheri; IT, Paola *Piro; IT

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Organ til kvalitativ diagnostisk bestemmelse af Herpes virus, Eppstein-Barr virus, Varicella Zoster virus eller Human T-lymfocyt virus

(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag:

3601-86

Opfindelsen angår et organ til diagnostisk bedømmelse af kliniske parametre ved direkte opsamling af biologiske materialer bestående af en fast bærer af egnede materialer, form og størrelse, som bærer fikseret på sin overflade en forud fastlagt mængde af et antistof, hvis det stof, som skal bedømmes, er et antigen, og et antigen, hvis stoffet, der skal bestemmes, er et antistof, samt den beslægtede diagnostiske metode.

Det biologiske materiale opsamlet som ovenfor anført, analyseres derefter kvalitativt eller kvantitativt ved sædvanlig teknik.

DK 164757 B

Den foreliggende opfindelse angår et organ til kvalitativ diagnostisk bestemmelse af Herpes virus, Eppstein-Barr virus, Varicella Zoster virus, Human T-lymfocyt virus bestående af en bærer, hvoraf en zone er belagt med en forud fastlagt mængde af de tilsvarende specifikke antistoffer til de nævnte viruser.

Organet ifølge opfindelsen består således af en fast bærer (af passende karakter, form og størrelse), som ved en egnet teknik bærer fikseret på sin overflade, en forud fastlagt mængde af et antistof. Organet ifølge opfindelsen kan anvendes ved en diagnostisk fremgangsmåde, som omfatter, at man bringer dette organ i kontakt med de biologiske væv indeholdende antigenerne, som skal analyseres. Det agglutinerede produkt, der er dannet og fikseret på organet, mærkes så enzymatisk ved reaktion med et specifikt antistof konjugeret med et enzym. Efter fjernelse af de mærkede antistoffer, der ikke er specifikt bundne, ved hjælp af vask (f.eks. med vand) dyppes organet i en egnet påvisningsopløsning indeholdende et substrat for det mærkende enzym, som er i stand til at give en reaktion, der er nyttig til kvalitative og/eller kvantitative målinger.

Data i litteraturen angiver, at bedømmelsen af mange parametre af klinisk interesse ved analyse af en biologisk væske kræver overføring af en nøjagtig målt mængde til en egnet beholder, hvor den skal inkuberes med en forud fastlagt mængde reagens for at give en påvisningsreaktion.

De sædvanlige fremgangsmåder indebærer ingen særlige vanskeligheder, når de biologiske materialer let kan opsamles og står til rådighed i forholdsvis høj mængde, således som det i reglen er tilfældet med urin og blod, men det samme er ikke tilfældet, når analytiske bestemmelser skal udføres på biologiske materialer, der står til rådighed i små eller meget små mængder (exudater, pus, slim, spyt osv.), eller af en hård samling fra histologisk ændrede væv og/eller væv i næppe tilgængelige områder, f.eks. pustuler, syphilomaer, sår osv.

Ulemperne ved den tidligere nævnte teknik overvindes med organet ifølge den foreliggende opfindelse, der som nævnt består af en bærer, hvoraf en zone er belagt med en forud fastlagt mængde af de tilsvarende specifikke antistoffer til de ovennævnte viruser, og som er ejendommeligt ved, at zonen har en form, der er egnet til direkte prøvetagning af de uopløselige antigener ved kontakt med og/eller punkter fra dyrekroppe eller menneskekroppe eller væv.

Organet ifølge opfindelsen muliggør faktisk direkte samling af det biologiske materiale, som skal undersøges, uden at der tyes til måling af prøven. Prøven kan faktisk opsamles direkte på patienten eller senere på prøven af væske eller biologisk væv opsamlet ved en af de sædvanlige laboratorieteknikker.

For tiden er de eneste diagnostiske fremgangsmåder til påvisning af viruser i biologisk væv (f.eks. under virusinfektioner eller for at bedømme mulige sunde bærere i en befolkning) baseret på cellekulturmetoder, som kræver kostbart apparatur, trænet personale og lang tid (3 eller flere dage) til bedømmelse af resultaterne.

Disse grunde vanskeliggør rettidig diagnostisk analyse, som kunne være nyttig til forhindring af sygdomsspredning til epidemiologiske undersøgelser og generelt til tidlig diagnose af virussygdomme.

Eksempler på viruser, hvis tilstedeværelse ofte må påvises omfatter herpesviruser (type 1 og 2), Eppstein-Barr virus, Varicella Zoster virus, Human T-Lymfocyt virus 3 (HTLV-3).

Det er derfor et ønske at tilvejebringe et organ til anvendelse ved en fremgangsmåde til påvisning af disse viruser, hvilken kan udføres selv i ikke specialiserede centre af ikke højt uddannede eller specialiserede personer, og uden specielle apparater, såsom sterile værelser og lignende.

Organet ifølge opfindelsen muliggør, at ulemperne ved de kendte fremgangsmåder. overvindes. Dets anvendelse er faktisk særlig enkel, billig, hurtig, sikker og nøjagtig.

Det forudsættes ved anvendelse af organet ifølge opfindelsen at der haves et specifikt antistof, og specifikke antistoffer mærket med enzymer. Antistoffet mod viruset, der skal bestemmes, er bundet på organet ifølge opfindelsen. Efter agglutineringsreaktionen bringes organet i kontakt med antistoffet mærket med enzymet, og neddykkes så i den tilsvarende påvisningsopløsning efter fjernelse af det enzymmærkede antistof, der ikke er specifikt bundet.

Hvor det drejer sig om herpes virus absorberes f.eks. et monoklonalt eller polyklonalt anti-HVS på et organ, som har en form, der er egnet til direkte prøveudtagning af vævene (f.eks. en hudblære).

250 patienter er blevet underkastet denne diagnostiske metode sammenlignet med de kendte cellekulturmetoder. Anvendelsen af organet ifølge opfindelsen viste sig at være yderst pålidelig og i fuldstændig overensstemmelse med de tidligere metoder. Resultaterne blev imidlertid opnået på kun en time, medens cellekulturmetoderne krævede mindst 3 dage.

Analogt er organet ifølge opfindelsen egnet til påvisning af HTLV-3, en virus der er ansvarlig for sygdommen, der er kendt som AIDS, både til analyse af blodprøver fra individuelle personer og af blod fra ukendte donorer.

En anden vigtig fordel ved anvendelse af organet ifølge den foreliggende opfindelse er, at det er muligt at påvise virusen selv i en inaktiv, ikke replikativ fase, medens cellekulturmetoderne kræver, at viruserne kan replicere, idet der ellers behøves en aktivering (med deraf følgende yderligere operative vanskeligheder).

Organet ifølge opfindelsen bringes i kontakt med det biologiske materiale, der skal undersøges, hvilket organ består i det væsentlige af et håndgreb og en ekstremitet, der er beregnet til at komme i kontakt med det biologiske materiale, og som ved passende teknik bærer fikserede, forud fastlagte mængder af antistoffer, der er specifikke eller delvis specifikke for de antigen-forbindelser, som skal bestemmes.

Antistofferne fikseret på ekstremiteten af organet ifølge opfindelsen vil derfor ved immunokemisk reaktion binde til antigenerne, der findes i materialet som undersøges, i en grad, der er proportional med mængden indeholdt i materialet selv.

I en foretrukken udførelsesform ifølge opfindelsen efter vask med et egnet opløsningsmiddel eller opløsning for at fjerne stofferne, der ikke er fikseret med en specifik binding til antistoffet, der forud er fikseret på organet, skal en direkte kvantitativ og/eller kvalitativ bestemmelse af den undersøgte kliniske parameter fortrinsvis udføres ved at benytte allerede kendt teknik baseret f.eks. på kemiske, immunokemiske, immunoenzymatiske, enzymatiske osv. reaktioner.

Formen og størrelsen af organet ifølge opfindelsen og især af ekstremiteten, der er belagt med antistofferne, er ikke i sig selv afgørende for opfindelsens karakter, idet det naturligvis er betinget af den tilsigtede anvendelse og den type opsamling, som kræves til den analytiske bestemmelse.

Hvis der f.eks. skal ske opsamling ved hudpunktur, skal der hensigtsmæssigt anvendes et organ, som er karakteristisk ved en mere eller mindre tilspidset, men i hovedsagen konisk form med en ekstremitet, der er belagt med antistoffer. Hvis på den anden side opsamlingen kræver en simpel kontakt med vævet eller en dypning i en biologisk væske, kan overfladen belagt med antistofferne have en cylindrisk, kugleformet, ægformet, konisk eller keglestubformet facon.

Hvis opsamling skal ske ved hudpunktur, har et organ vist sig særlig egnet bestående af en metalkerne, eventuelt belagt med plastmateriale, og som i sin ekstremitet er udstyret med et legeme belagt med antistoffer af passende størrelse og form (f.eks. en lille kugle med en diameter på 2-5 mm), hvorfra en metalspids egnet til injektion rager nogle få mm frem (f.eks. 0,5-2 mm). Under brugen vil metalspidsen bevirke, at den biologiske væske siver ud (f.eks. en dråbe blod) og imprægnerer legemet, der er belagt med antistof, idet den er i umiddelbar kontakt dermed på grund af den minimale afstand.

Som egnende materialer til bæreren, der skal belægges, kan anvendes plastmaterialer, som er i stand til at binde antistoffer ved adsorption ifølge opfindelsen såsom polyethylen, polypropylen, polystyren, polyurethaner, polyvinylchlorid, BUNA-N, nylon, polyacrylater, polymethacrylater, polytetrafluorethylenharpikser (Teflon^{R}), phenolharpikser, polyacrylamider, Delrin^{R}, Lexan^{R}, cellulosederivater, siliconederivater osv.

Disse materialer kan også belægge en metalkerne.

Bindingen af antistoffet med organet ifølge opfindelsen kan også være kemisk, hvis det konstruktive plastmateriale indeholder aminogrupper, hydroxygrupper, carboxygrupper eller isocyanogrupper, som er egnet til at fiksere forbindelser med en kemisk binding. Det egnede plastmateriale kan eventuelt aktiveres ved at dyppe det i en pufret opløsning med pH-værdi 9 af glutaraldehyd i overensstemmelse med allerede velkendt teknik eller i overensstemmelse med andre lignende velkendte metoder f.eks. inden for området enzymimmobilisering.

Metalmeterialer kan også anvendes, når de forud har været underkastet en fremgangsmåde, der gør dem porøse eller i hvert tilfælde i stand til at adsorbere antistoffer f.eks. ved galvanisk teknik til aflejring af colloidt guld eller andre metaller i colloid form.

Eksempler på belægning af disse materialer med et antistof på de nævnte fremgangsmåder er beskrevet i amerikansk patent nr. 4.003.988 og i følgende artikler:

(a) IMMUNOASSAY USING ANTIGEN-ENZYME CONJUGATES
B.K. Van Weemen og A.H.W. Schuurs febs. letters bind 15, nr. 3, juni 1971, side 232-235.

(b) SOLID PHASE ANTIBODY ASSAY BY MEANS OF ENZYME CONJUGATED TO ANTI-IMMUNOGLOBULIN
P. Leinikki og Suvi Passila, J. Clin. Path., 1976, 29, side 1116-1120.

(c) ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WITH POLYVALENT GONOCOCCAL ANTIGEN
B.R. Brodeur, F.E. Ashton og B.B. Diena, The Journal of Medical Microbiology, bind 15, nr. 1, 1981, side 1-9.

(d) A MICROPLATE ENZYME-IMMUNOASSAY FOR TOXOPLASMA ANTIBODY
J. Clin. Path., 1976, nr. 29, side 150-153.

(e) ENZYMOLOGY (Immobilized Enzymes, Antigens, Antiobodies and Peptides - Preparation and Characterization, bind I, red. af H. Howard Weetall, Marcel Dekker Inc., New York (1975).

Antistoffet eller antistofferne, der anvendes til at belægge bæreren, kan være polyklonalt eller monoklonalt eller eventuelt blandinger deraf og kan være specifikt for et eller flere aktive steder af antigenet, der skal bestemmes. Endvidere kan denne specificitet være rettet mod et eller flere antigener.

Antistoffer kan fikseres på bæreren uden nogen mængdebegrænsninger, men en mængde, der er egnet til den tilsigtede analysetype bør vælges, og ligger sandsynligvis mellem et picogram og et milligram pr. kvadratcentimeter.

Organet ifølge opfindelsen kan anvendes til direkte bestemmelse af viruser.

I reglen udføres påvisningsreaktionen rigtigt ved hjælp af et antistof mærket med et egnet enzym, som er specifikt for antigen-antistofkomplekset, der er fikseret på bæreren efter prøve-

opsamlingen. Til dette formål bliver organet, som bærer antigen-antistofkomplekset, fikseret derpå, vasket med en egnet stødpude og/eller vandig opløsning for at fjerne det uspecifikt bundne antigen eller antistof, og bliver derefter dyppet og inkuberet i passende tid i en opløsning af antistoffet konjugeret med et enzym.

Disse antistofopløsninger indeholder fortrinsvis ikke-ioniske, ioniske og amfotere stødpudemidler og emulgeringsmidler med en koncentration af enzymmærket antistof, der ligger fra 0,01 til 0,005 vægt%. Det enzymmærkede antistof-antigen-antistofkompleks vil derfor blive fikseret på bæreren. Efter fjernelse af et muligt uspecifikt bundet mærket antistof ved vask med en egnet stødpude og/eller vandig opløsning, dypning af bæreren, behandling som ovenfor anført i en opløsning indeholdende et egnet chromogent system baseret på et substrat for enzymet muliggøres en enkelt og direkte antigenbestemmelse af produktet fra den enzymatiske reaktion ved kolorimetrisk, spektrofotometrisk eller forskellig anden teknik.

Tegningen, der illustrerer opfindelsen, viser skematisk et organ ifølge opfindelsen. Henvisningstallet 1 viser den kegleformede bærer, som er belagt med antistoffet, og som skal komme i kontakt med det biologiske materiale. Stilken 2 virker som håndtag og kan være af en sådan form og størrelse, at brugen gøres let og komfortabel. 3, 4 og 5 viser henholdsvis antistoffet, antigenet og det enzymmærkede antistof.

Organet ifølge opfindelsen, der også muliggør at undgå en nøjagtig bestemmelse af mængden af biologisk materiale, der skal undersøges, frembyder også den fordel indenfor metodens følsomhedsgrænser, at give en højere pålidelighed og nøjagtighed i kraft af minimeringen af eksperimentalfejlene. Analysen bliver endvidere hurtigere og mere rettidig, uden at der er behov for kostbart udstyr, således at der endog kan forudses en direkte anvendelse i hjemmet af analytisk udstyr.

Organerne ifølge opfindelsen skal fremstilles under strenge sterile betingelser, under egnede aseptiske forudsætninger og til sidst indføres i egnede sterile beholdere, f.eks. reagensglas forseglet med steriliserede propper.

Det følgende ikke-begrænsende eksempel illustrerer nogle mulige anvendelser af organet ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL

(a) Fremstilling af et organ, der er egnet til bestemmelse af Herpes virus (HSV)

Polyvinylchloridpinde med en kegleformet ekstremitet blev anvendt som fast fase.

Ekstremiteten af pindene fik lov at inkubere med et anti-HSV-2 antiserum fortyndet i forholdt 1:300 med 50 mM pH 9,6 carbonat/bicarbonatstødpude. Teknisk set blev antiserumet fikseret på bæreren ved at dyppe pindens koniske ekstremitet i fordybningerne i en polyvinylchlorid mikroskive indeholdende 0,15 ml antiserum, således at hele det koniske areal kunne dyppes i opløsningen. Mikroskiven fik derefter lov at inkubere i 2 timer ved 37°C i et fugtigt kammer og derpå natten over ved 4°C.

Efter denne inkubation blev pindene vasket nøjagtigt med pH 7,4 saltvand med phosphatstødpude (KH_2PO_4 15 mM, Na_2HPO_4 85 mM, NaCl 15 mM, KCl 25 mM) indeholdende 0,05% Tween, indført i fordybningerne i en anden skive indeholdende samme saltvand med stødpude sammen med 0,3% okseserumalbumin og fik lov at inkubere i 1 time ved 37°C i et fugtigt kammer. Denne behandling har det formål at mætte alle mulige frie steder på polyvinylchloridet, som i de følgende trin også kan bringes til at adsorbere de virale partikler eller det konjugerede antiserum.

På lignende måde blev fremstillet et organ til bestemmelse af Hepstein-Barr virus, Varicella Zoster virus og Human T-Lymphocyt virus-3 (HTLV).

(b) In vitro bestemmelse af HSV

Efter et identisk trin fik pindene lov til i kort tid ved stuetemperatur at komme i kontakt med en HSV virus suspension fortyndet 1:5 i saltvand (0,9% NaCl).

Efter vask blev pindene indført i reagensglas indeholdende anti-HSV-2-antiserum konjugeret med peroxidase i en 1:150 fortynding i saltvand med phosphatstødpude indeholdende 0,05% Tween 20. Denne procedure blev efterfulgt af 30-40 minutters inkubation ved stuetemperatur og af vask i saltvand med phosphatstødpude indeholdende 0,05% Tween 20 for at forhindre en mulig analytisk genererende indblanding af det konjugerede antiserum, der er uspecifikt bundet med antigenet.

Efter det sidste trin af behandlingen blev pindene indført i en chromogen opløsning bestående af 3,4 mg ortho-phenylendiamin opløst i 10 ml stødpude, dannet af lige dele 0,1 M citronsyre og 0,2 M Na_2HPO_4, hvortil der lige før brugen var sat 50 mcl af en 3% H_2O_2 opløsning.

De registrerede resultater kunne vise den gode specificitet og følsomhed af denne teknik: de positive prøver viser faktisk gennem det chromogene system en intens farve, der tydeligt kunne skelnes fra den næsten ikke eksisterende farve af de negative prøver.

(c) Forklarende procedure af en HSV bestemmelse ved direkte opsamling

Herpesinfektioner type 1, type 2 eller type 1 og 2 forekommer i reglen med dannelsen af blærer af forskellig størrelse i genitalområdet og/eller labialområdet. Dannelsen af herpesblærer i andre legemsorganer er sjældnere.

Med det formål, at diagnostisere en faktisk viral infektion af herpetisk oprindelse, fik organet fremstillet ved fremgangsmå-

den, som vist under (a), lov til at komme i kontakt med blæren med sin lancetformede ekstremitet og bragte derved blæren til at briste.

Organet drejes derefter rundt og væsken fra den brudte blære får lov at komme i kontakt med anti-HSV-antistofferne, der forud var fikseret på pinden.

Så snart væskeopsamlingen er afsluttet, indføres organet i en ampul indeholdende 300 mcl af en opløsning af anti-HSV konjugeret med peroxidaseenzym og fortyndet i en 30 mM phosphatstødpude indeholdende 0,05% Tween 20 og 1% okseserumalbumin.

EFter 15 minutters inkubation vaskes bæreren med rindende vand i ca. 60 sek. og overføres til en ampul indeholdende 300 mcl af en pH 5 opløsning karakteriseret ved følgende procentiske sammensætning (w/v):

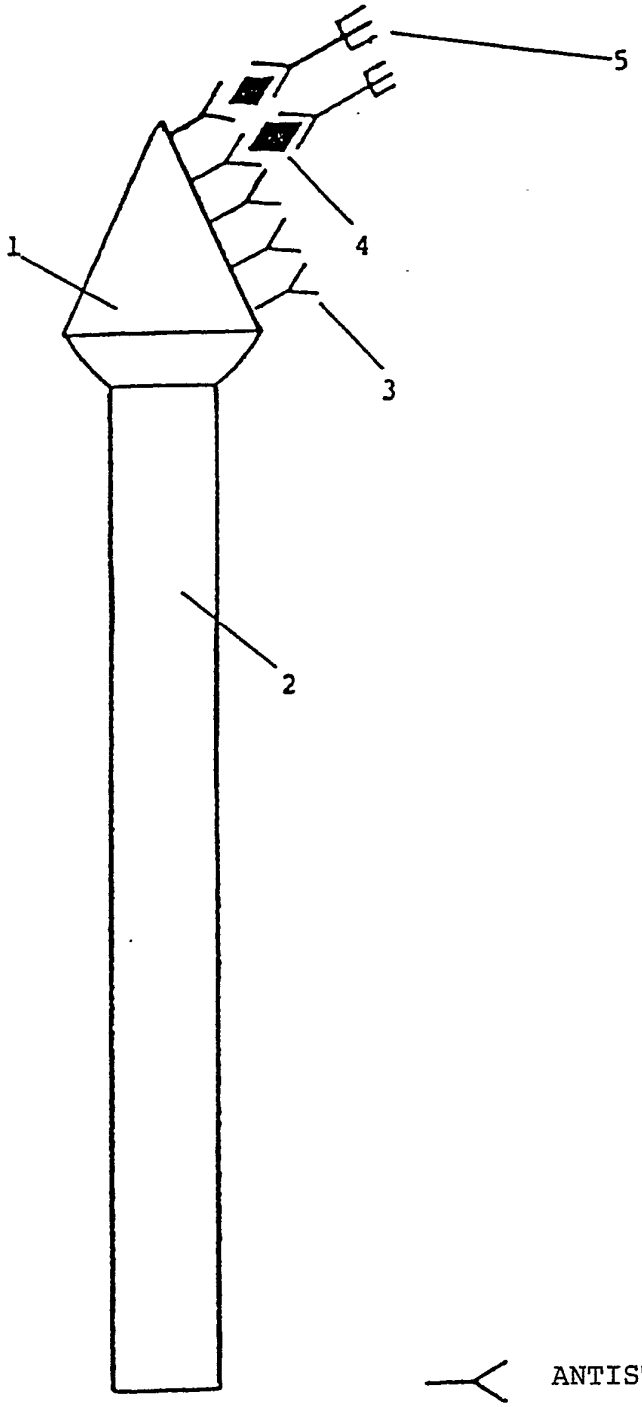
Tetramethylbenzidin	0,02
Citronsyre	2,10
Natriumperborat	0,07
Dibasisk natriumphosphat	3,00
Dimethylsulfoxid	20,00
Destilleret vand	75,00

Efter 15 minutters inkubation iagttages opløsningen indeholdt i ampullen. Den kan være:
(a) farveløs i tilfælde af et negativt resultat (fravær af HSV i patientens blære),
(b) blå i tilfælde af et positivt resultat (tilstedeværelse af HSV i patientens blære).

P a t e n t k r a v.

Organ til kvalitativ diagnostisk bestemmelse af Herpes virus, Eppstein-Barr virus, Varicella Zoster virus, Human T-lymfocyt

virus bestående af en bærer, hvoraf en zone er belagt med en forud fastlagt mængde af de tilsvarende specifikke antistoffer til de nævnte viruser, k e n d e t e g n e t ved, at zonen har en form, der er egnet til direkte prøvetagning af de uopløselige antigener ved kontakt med og/eller punktur fra dyrekroppe eller menneskekroppe eller væv.



ANTISTOF

ANTIGEN

ANTISTOF MÆRKET MED ENZYM

ANTISTOF-ANTIGEN-ANTISTOF
MÆRKET MED ENZYMKOMPLEKS