

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

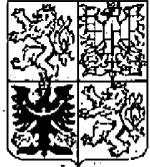
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2634-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9503406**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(86) PCT číslo: **PCT/GB96/00392**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/26443**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

G 01 N 33/68
G 01 N 33/569

(71) Přihlašovatel:

HAAHEIM Lars Reinhardt, Bergen, NO;

(72) Původce:

Haaheim Lars Reinhardt, Bergen, NO;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob detekce aktivní produkce protilátek

(57) Anotace:

Způsob detekce produkce aktivních protilátek v krevním vzorku zahrnuje kontaktování za přítomnosti a nepřítomnosti inhibitoru syntézy proteinu podílů uvedeného vzorku s pevnou fází za podmínek, které umožňují produkci a sekreci protilátky lymfocyty; detekci v roztoku, vazbu protilátky k antigenu(ům) na pevné fázi a porovnání vazby uvedené protilátky a přítomnosti nebo nepřítomnosti inhibitoru proteinové syntézy, čímž se stanoví množství sekrece aktivní protilátky v odpovědi na uvedený antigen(y). Způsob může být také modifikován pro umožnění detekce nespecifických infekčních indikátorů.

CZ 2634-97 A3

(aktivní)
Způsob detekce produkce protilátek

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu detekce produkce protilátek a zejména detekce aktivní syntézy protilátek v krevních vzorcích v odpovědi na infekci nebo na vakcinaci atd., prostřednictvím modifikovaného enzymově vázaného imunosorbentního testu (ELISA).

Dosavadní stav techniky

ELISA je dlouho používána pro detekci a měření protilátek (nebo antigenu). Nejčastěji je ELISA používána jako serologický test, ale je také používána pro studium imunochemických vlastností antigenů nebo protilátek, a často nachází uplatnění v, například, hodnocení a charakterizaci imunitních odpovědí, pro zkoumání produkce protilátek v buněčných kulturách, v hybridomní technologii, atd.

Díky své senzitivitě, jednoduchosti a snadnosti a rychlosti výkonu byla tato technika široce přijata jako diagnostický prostředek a je nyní rutinně používána v klinických laboratořích pro detekci protilátek k infekčním agens v séru nebo plasmě, po infekci nebo po vakcinaci. Tak například, mnoho testů na HIV infekci v závislosti na detekci protilátek k viru v plasmě nebo séru pacientů využívá běžného ELISA testu.

Nicméně, protože takový jednoduchý serologický ELISA test pouze měří přítomnost cílové protilátky ve vzorku, nemůže

rozlišit mezi nastupující syntézou protilátek v odpovědi na antigen a protilátkami již přítomnými od minulé infekce, nebo od pasivního přenosu atd. Ačkoliv v některých případech může být dostačující získat prostou informaci o přítomnosti protilátek, v jiných případech je žádoucí určit, zda je detekovaná cílová protilátka akutně syntetizována lymfocyty v době testování či nikoliv, například během vakcinace nebo v diagnostice infekce u dětí rozlišit jí od pasivně přenesený protilátek matky. Tohoto nemůže být dosaženo klasickou ELISA metodou.

Byly proto vyvinuty jiné metody, které umožňují detekci nastupující syntézy protilátek. V tomto směru může být uveden enzymově vázaný imunospot (ELISPOT) test (také známý jako spot ELISA nebo ELISA-plaque test), jak jej popisuje například Czerkinsky et al., v ELISA and other Solid Phase Immunoassays, Ed. D. M. Kenneney and S. J. Challacombe, 1988, kapitola 10, 217 - 239. Tato technika, založená na ELISA metodě, umožňuje počítání lymfocytů secernujících protilátku proti jednomu nebo více cílovým antigenům. Stručně, ELISPOT je variantou ELISA metody, kde mohou být protilátky secernující buňky (ASC) odhaleny kultivací lymfocytů ve speciálních modifikovaných ELISA jamkách potažených cílovým antigenem a nahrazením standardních ELISA reagens komplexem enzym-substrát, který dává barevný presipitát (skvrny) okolo secernujících buněk. Skvrny mohou být počítány za získání počtu protilátku secernujících buněk. Inhibitory proteinové syntézy mohou být obsaženy v kultivačním mediu, pro potvrzení toho, že skvrny jsou detekovány díky de novo syntéze protilátek, v průběhu in vitro inkubační periody.

Zatímco se ELISPOT ukázala jako velmi užitečná ve studiu

24.10.97

dynamiky humorální imunitní odpovědi a byla používána pro detekci spontánních ASC, které se přechodně objevují v periferní cirkulaci imunizovaných subjektů, jisté vlastnosti metody jsou na obtíž použití v klinické diagnostice. Za prvé, je nutné počítat každou jednotlivou skvrnu, což je časově náročné a pracné, proto není metoda vhodná pro analýzu většího množství vzorků, tak jak je tomu v klinických diagnostických laboratořích. Za druhé, Je počítán a uváděn pouze počet buněk secernujících protilátka, což vyžaduje významně vyšší objemy vzorku, např. několik ml. ELISPOT plotny jsou také nákladné a test nelze snadno přizpůsobit automatizaci.

Je zde možné vidět, že i přes pokroky v technikách detekce protilátek zde existuje potřeba testu, který je jednoduchý, rychlý a nenákladný pro provedení, který spolehlivě umožní přesnou kvantifikaci spontánně secernovaných protilátek, který je schopen rozlišit de novo syntézu protilátek, a zejména, který může být proveden na krevních vzorcích pro diagnostické účely. Předkládaný vynález se týká této potřeby.

Podstata vynálezu

V jednom aspektu předkládaný vynález proto poskytuje způsob detekce aktivní produkce protilátek v odpovědi na cílový antigen v krevním vzorku, kde uvedený způsob obsahuje:

kontaktování, v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, aliquot uvedeného vzorku, nebo volitelně, lymfocytů přímo izolovaných z uvedeného vzorku, s pevnou fází za podmínek, které umožňují produkci protilátek a jejich sekreci

lymfocyty;

detekování v roztoku, vazby protilátky na uvedený antigen(y) na pevné fázi; a

srovnání uvedené protilátky navázané v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy pomocí určení množství aktivní sekrece protilátky v odpovědi na uvedený antigen(y).

Jak je zde použito, "aktivní produkce protilátek" označuje spontánně secernované protilátky produkované lymfocyty ve vzorku, které aktivně produkují protilátky v průběhu testu v důsledku aktivního nástupu imunitní odpovědi. Ve všech případech jsou protilátky namířené proti antigenům, které jsou přítomny in vivo a nikoliv in vitro, ani před ani během způsobu testování podle vynálezu.

Jak je zde použito znamená fráze "aktivní sekrece protilátek v odpovědi na uvedený antigen" to, že aktivně secernované protilátky se vážou na antigen použitý v testu, ačkoliv použitý antigen nebyl imunogen stimulující imunitní odpovědi na prvním místě. Tak, zatímco oba antigeny použité v testu a imunogen, který stimuloval nebo stimuluje produkci protilátek in vivo se budou vázat na detekované protilátky prostřednictvím stejných nebo velmi podobných epitopů, v jiných ohledech nemusí být antigen a imunogen identické. Tak, zatímco antigenem použitým ve způsobu podle vynálezu může být materiál obsahující všechny nebo některé části relevantního imunogenu, např. odvozeného od infikovaných jedinců, nebo purifikovaných částic ze stejného nebo podobného materiálu, může být antigen podobně připraven

synteticky, např. chemickou syntézou nebo rekombinantní expresí, s připojením nebo delecí částí vzhledem k nativnímu antigenu. Takové fúsní proteiny, nebo molekuly exprimující pouze vhodný epitop(y) mohou být použity.

Obecně řečeno, způsob podle vynálezu zahrnuje inkubaci lymfocytů z krevního vzorku v kontaktu se vhodným pevným povrchem pro imobilizaci detekovaných protilátek za podmínek, které umožňují produkci a sekreci protilátek lymfocyty, a potom odstranění buněk a detekování vazby protilátek na antigen na pevnou fázi. Srovnáním hladiny navázaných protilátek, za přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, může být de novo syntéza protilátek odlišena a kvantifikována.

Překvapivě, způsob podle vynálezu umožňuje použití malých objemů krevních vzorků (např. μ l objemů, menších než 1 ml), přímo pro detekci spontánní produkce protilátek nestimulovanými lymfocyty, bez předchozího kroku pre-kultivace lymfocytů před inkubací s pevnou fází. Jinými slovy, lymfocyty ve vzorku jsou použity přímo v testovacím způsobu podle vynálezu bez jakéhokoliv předcházejícího ošetření nebo stimulace, např. in vitro stimulace antigenem. Tak mohou být detekovány protilátky produkované lymfocyty v době odběru vzorku. Tímto způsobem, i za použití malých objemů vzorku, spontánní nástup syntézy protilátek v odpovědi na testovaný antigen může být výhodně odlišen od okolních aktivací lymfocytů. Také jsou lymfocyty testovány v situaci, kdy spontánně secernují protilátky, bez stimulace buněk pro odhalení jakékoliv paměti. Toto je v kontrastu k jiným publikovaným způsobům, které využívají výhody in vitro antigenní stimulace pro zvýšení senzitivity testu. Předkládaný vynález

24.10.97

oproti tomu využívá výhody spontánní sekrece protilátek pro umožnění detekce protilátek v krvi, které jsou ukazatelem nástupu infekce testovaným antigenem; plasmatické lymfocyty budou secernovat protilátku proti testovanému antigenu v prvních několika týdnech po infekci, nebo vakcinaci atd. Detekce takových protilátek způsobem podle předkládaného vynálezu umožňuje diagnosu nebo určení infekce, nebo monitorování protilátkové odpovědi na vakcinaci a td. Toto je zejména užitečné u dětí a u novorozenců, kde je důležité odlišit nově syntetizované protilátky od pasivně přenesených mateřských protilátek. Stejný vzorek krve může být analyzován na protilátky proti několika odlišným infekčním agens buď v separátním testu, nebo ve stejném testu za použití mnohotných relevantních antigenů. Tak umožňuje použití relevantních kontaktních antigenů podle klinického syndromu, který se u pacienta prezentuje. V diagnostice infekcí je také důležité být schopen rozlišit mezi nástupem syntézy protilátek a protilátek již existujících od dřívější infekce. Vyvolání imunologické paměti antigenní stimulací in vitro není slučitelné s testem zaměřeným na nástup akutní infekce a proto předchozí metody založené na antigenní stimulaci nenesou tuto výhodu. Také, zahrnutí kroku antigenní stimulace bude nepříznivě ovlivňovat výhodný časový faktor testu podle předkládaného vynálezu, jehož provedení je velmi rychlé ve srovnání s předchozími v oboru známými způsoby.

Antigeny, ke kterým jsou protilátky pro detekci podle způsobu podle předkládaného vynálezu namířeny, zahrnují jak bakteriální, tak virové antigeny. Klinicky významné antigeny zahrnují, ale nejsou omezeny na, například antigeny Herpes Simplex viru, Cytomegaloviru, viru lidské imunodeficiencie (HIV) a jakýchkoliv

virů hepatitidy. Detekce takových může být použita pro rychlé stanovení toho, zda je pacient infikován např. pro účely skríningu krve nebo pro stanovení a/nebo monitorování infekce. Způsob je zejména užitečný vzhledem ke své jednoduchosti a může být použita tam, kde laboratorní vybavení není dostupné, např. v polních podmínkách.

Jak je zde použito, termín "detekování" a "určení množství" znamenají jak kvantitativní, tak kvalitativní zhodnocení hladiny produkce protilátek, ve smyslu získání absolutní hodnoty množství protilátek produkovaných ve vzorku a také index, poměr, procento nebo podobný ukazatel produkce protilátek, stejně jako semikvantitativní nebo kvalitativní zhodnocení.

Hlavní výhodou předkládaného vynálezu je potřeba pouze malého objemu vzorku, např. 50 - 500 μ l, lépe 100 - 300 μ l a běžně 100 - 200 μ l krve nebo krevního produktu ve srovnatelném objemu k plné krvi, oproti klasickým diagnostickým testům, které obvykle vyžadují objem několika ml séra. Toto je zejména užitečné v případech odběru vzorků od novorozenců, protože způsob podle předkládaného vynálezu vyžaduje objem pouze několik μ l.

Vzorky krve, obecně vzorky periferní krve, mohou být použity přímo, ačkoliv mohou být nejprve preferovaně izolovány lymfocyty ze vzorku. Toto může být provedeno za použití standardních technik v oboru dobře známých. Tak, například, mohou být běžně použity různé přípravky plné krve, například, heparinizovaná krev, EDTA-krev atd, jak jsou běžně připravovány v klinických laboratořích. Ačkoliv to není zásadní, erytrocyty přítomné ve vzorku mohou být lysovány, např. za použití běžných metod

krátkodobou expozicí destilované vodě nebo chloridu amonnému, nebo za použití jiných dobře známých technik hemolýzy. Musí být dáno, že všechny obohacené nebo čištěné přípravky musí obsahovat lymfocyty přítomné v plné krvi, ze které je přípravek odvozen, aby bylo možné detekovat spontánní produkci protilátek. Pokud je to žádoucí, mohou být lymfocyty separovány, například za použití standardního lymfocytárního separačního media, např. Lymphoprep (Nyegaard Co. Oslo, Norsko), nebo za použití imunomagnetické separace (IMS) nebo podobného ne pevné fázi založeného separačního systému nebo jiných běžných technik. V případě IMS nebo podobných separačních technik může být použita pevná fáze, např. magnetické korálky, potažená protilátkou specifickou pro jistou sadu leukocytů pro selektivní separování použitelných lymfocytů. Pokud jsou použity separované lymfocyty, pak mohou být buňky před použitím promyty, za použití standardních technik promytí. Bylo nicméně pozorováno, že extensivní promývání buněk není žádoucí. Kromě toho, pokud není použito rozsáhlé promývání, může být přežívání buněk zlepšeno a způsob může být urychlen.

Vzorek krve, ošetřený jak uvedeno výše, pokud je to žádoucí, nebo separované lymfocyty, jsou potom vhodně uvedeny do kontaktu s pevnou fází nesoucí vhodného vazebného partnera pro imobilizování protilátek nebo protilátky, které mají být detekovány. Běžně je vazebným partnerem testovaný antigen nebo antigeny, rozpoznávané protilátkou nebo protilátkami, které mají být detekovány. V jednom provedení tak předkládaný vynález poskytuje způsob pro detekci aktivní produkce protilátek v krevním vzorku, kde uvedený způsob obsahuje:

kontaktování, v přítomnosti nebo za absence inhibitoru

proteinové syntézy, aliquot uvedeného vzorku, nebo volitelně, lymfocytů přímo izolovaných z uvedeného vzorku, s pevnou fází nesoucí jeden nebo více antigenů rozpoznávaných protilátkou nebo protilátkami, které mají být detekovány;

detekování v roztoku, vazby protilátky na uvedený antigen(y);

a

srovnání uvedené protilátky navázané v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy pomocí určení množství aktivní sekrece protilátky v odpovědi na uvedený antigen(y).

Alternativní vazebné partnery mohou být také použity, například protein A, protein G nebo protilátky, které rozpoznávají a vážou protilátku, která má být detekována. V posledním případě, vysoce specifická vazba není žádoucí, protože specifita je v tomto provedení testovací metody zajištěna následnou vazbou antigenů, které se vážou specificky na protilátky, které mají být detekovány. Tak je ve všech provedeních tvořen komplex antigen-protilátka. Přítomnost takových komplexů na pevném nosiči je zjištěna krokem detekce způsobu podle předkládaného vynálezu. Pevnou fází může být jakýkoliv z dobře známých nosičů nebo matrice, které jsou nyní běžně používány nebo navrženy pro imobilizaci, separaci atd. Tyto mohou mít formu částic, listů, gelů, membrán nebo mikrotitračních proužků, tub nebo ploten atd. a vhodně mohou být vyrobeny z polymerního materiálu. Nicméně, pro snadnou manipulaci a jednoduchost mohou být použity standardní mikrotitrační plotny a jamky, preferovaně standardní ELISA plotny.

Pevná fáze může být také modifikována tak, aby umožnila detekci protilátek specifických pro řadu různých antigenů. Tak například, disky nebo proužky atd. ze vhodného materiálu pevné fáze, např. nitrocelulozy a podobně, mohou být potaženy různými antigeny a přidány simultánně do mikrotitrační jamky nebo jiné vhodné nádoby, která neobsahuje žádný kontaktní antigen. Způsob detekce navázaných protilátek může potom být použit pro odlišení mezi různými antigeny. Sady disků, které jsou každý potažen relevantními antigeny pro jisté klinické stavy nebo syndromy mohou být použity pro identifikaci toho, které z podezřelých agens způsobuje infekci. Disky budou potom jednotlivě zpracovány v separátních jamkách. Toto je zejména postup šetřící materiál, protože testy mohou být provedeny pro simultánní testování mnoha různých agens (buď od stejného infekčního agens nebo od různých agens relevantních pro klinický syndrom nebo stav v určitém případě) za použití stejného malého objemu krve. Alternativním přístupem je použití mnoha vzorků krve v separátních jamkách, která je každá potažena jiným vazebným partnerem, např. antigenem nebo protilátkou, a provedením testu.

Techniky pro vazbu vazebného partnera, např. antigenu, na pevnou fázi, jsou také v oboru velmi dobře známé a jsou rozsáhle popsány v literatuře. Mnoho standardních postupů pro potažení antigenem je popsáno například v ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects; 1988, ed. D. M. Kemeny and S. J. Challacombe, John Wiley and Sons. Pokud je to žádoucí, mohou být plotny promyty a blokovány, opět za použití standardních technik. Tak například, standardní mikrotitrační plotny, např. ELISA plotny, mohou být jednoduše potaženy vazebným partnerem inkubací přes noc při 4 °C ve vhodném pufru; například



fosfátem pufovaném salinickém roztoku (PBS), obsahujícím vazebný partner, např. v koncentraci 0,01 až 150 $\mu\text{g/ml}$ proteinu, po čemž následuje blokování vhodným blokovacím médiem (obecně buněčným kultivačním médiem) a inkubace např. při 37 °C po 1 až 5 hodin. Po odstranění blokovacího roztoku jsou plotny připraveny pro použití.

Nicméně, je vhodné, aby materiály potřebné k provedení způsobu podle předkládaného vynálezu byly poskytnuty ve formě kitu, kde je dodán pevný nosič potažený vazebným partnerem a vhodně blokován.

Jak je uvedeno výše, krok kontaktování obecně vyžaduje inkubaci vzorku nebo separovaných lymfocytů v přítomnosti pevné fáze za podmínek, které umožňují syntézu protilátek a jejich sekreci. Mohou být použity standardní ELISPOT inkubační podmínky, jak je popsal například Czerkinsky et al., 1988 (výše). Obecně, vzorek nebo buňky jsou inkubovány při 37 °C s 5% CO_2 ve vzduchu, kde medium, ve kterém jsou buňky inkubovány, počítá s CO_2 jako se součástí pufovacího systému. CO_2 nezávislé medium může také být použito, kde v tomto mediu pracuje alternativní pufovací systém, jako je medium využívající dobře známého HEPES konstituentu. V tomto případě jsou buňky jednoduše inkubovány při 37 °C, což dále zjednodušuje test a jeho požadavek na laboratorní vybavení. inkubační doba se může lišit, ale obecně jsou požadovány alespoň 1 - 2 hodiny. Inkubační doba okolo 2 - 6 hodin, např. 2 až 4 hodiny, může dávat dobré výsledky, ačkoliv delší inkubační doba, např. více než 12 nebo 24 hodin, nebo přes noc, může být také žádoucí. Vhodná media pro inkubaci jsou v oboru dobře známá a zahrnují jakákoliv standardní kultivační media, např. Dulbecco

modifikované Eaglovo medium (DMEM) nebo RPMI nebo jiná dobře známá kultivační media užívající HEPES jako CO_2 nezávislý pufrovací systém, obsahující vhodné sérum, např. fetální telecí sérum (FCS) nebo jiné složky, např. glutamin, podle potřeby. Další volitelné složky v mediu mohou zahrnovat antibiotika, např. gentamycin, penicilin, streptomycin, atd., jiné aminokyseliny, růstové faktory atd.

Může být žádoucí ředit suspenzi vzorek/buňka před krokem kontaktování a vhodný rozsah buňka/vzorek ředění může být použit. Ředění bude obvykle použito za použití kultivačního media jako ředidla.

Pro odlišení nastupující syntézy protilátek je inkubace provedena za přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy. Tak je před inkubací přidán inhibitor k části aliquot vzorku/buněk, pro blokování syntézy proteinů, a proto protilátek a část je inkubována bez inhibitoru. Mohou být použity jakékoliv známé inhibitory syntézy proteinů, např. cykloheximid. Může být použita koncentrace 10 - 5000 $\mu\text{g/ml}$, např. 50 - 500 $\mu\text{g/ml}$ cykloheximidu.

Také je preferováno, aby byl obsažen inhibitor ATPasy, jako je azid sodný, nebo jiné podobné inhibitory spolu s inhibitorem proteinové syntézy, aby se rychle a úplně zastavil metabolismus buněk.

Po inkubaci jsou vzorky/buňky odstraněny z pevné fáze. Toto může obecně být provedeno jednoduše promytím za použití vhodného media, např. pufru jako je PBS. Nicméně, bylo shledáno, že

extenzivní promývání není žádoucí.

Pevná fáze je potom podrobena kroku detekce vazby protilátky. Krok detekce, ve smyslu čtení signálu, probíhá v roztoku. Mohou být použity jakékoliv známé prostředky pro detekování vazby protilátky, podle toho, jaký signál je generován v roztoku; například v závislosti na fluorescenci, chemiluminiscenci, kolorimetrii nebo enzymové reakci k produkování detekovatelného signálu. Nicméně, je vhodné použít imunotest jako prostředek detekce, preferovaně enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA).

Techniky pro imunotesty, a zejména pro ELISA, jsou dobře známy v oboru a jsou popsány v literatuře (například v ELISA and other solid phase Immunoassays, Theoretical and Practical Aspects; 1988, ed. D. M. Kemeny and S. J. Challacombe, John Wiley and sons).

Po odstranění vzorku/buněk může být přidán konjugát enzym - protilátka, například v ELISA detekčním způsobu, který se váže na protilátku navázanou na antigen na pevné fázi. Obdobně, pokud je protilátka, která má být detekována, navázána na pevnou fázi nespecificky, cestou vazebného partnera, například protilátkou proti protilátkám různých druhů, pak může být přidán konjugát enzym - antigen, který se bude specificky vázat na imobilizovanou protilátku, která má být detekována. Potom je přidán substrát pro enzym, aby se mohl vyvinout detekovatelný signál. V předkládaném vynálezu je vhodné použít solubilní substrát, který dává signál detekovatelný v roztoku. Toto je výhodné, protože to zjednodušuje a usnadňuje manipulaci a zpracování velkého množství vzorků a umožňuje to hodnocení produkce protilátek, ačkoliv, jak je

zmíněno výše, absolutní hodnocení kvantity není nezbytné, a pokud je to žádoucí, mohou být získány kvalitativní nebo semikvantitativní výsledky. Výhodně, substrát může být vybrán tak, aby dával spektrofotometricky detekovatelný signál, který může být snadno určen přečtením absorbance, například za použití standardní ELISA čtečky mikroploten. Kromě toho, mohou být použita standardní ELISA reagens, což má tu výhodu, že se test podle předkládaného vynálezu stane kompatibilním s existujícími metodami a technikami rutinně používanými v klinických laboratořích. Nicméně, jiné detekční/signál generující signály mohou být použity, které činí signál detekovatelným za použití fluorescence, chemiluminiscence atd.

Imunoenzymatické amplifikační metody mohou také být použity pro vylepšení signálu nebo pro zvýšení sensitivity, například za použití avidin biotinové metody jako je Extravidin system dostupný od Sigma. Biotinylované sekundární protilátky jsou použity jako ELISA reagens, v kombinaci s komplexem peroxidasa avidin. Protože jedna molekula avidinu je schopna vázat několik molekul biotinu, zvyšuje použití avidin-biotin peroxidasového komplexu povrchovou koncentraci peroxidasových molekul, což dává způsobu větší senzitivitu.

Materiály a metody potřebné pro krok inkubace (kontaktování) buněk a pro krok detekce vazby protilátek mohou také být výhodně dodány ve formě kitu s pevnou fází potaženou vazebným partnerem. Informace získaná z testu podle předkládaného vynálezu může být doplněna použitím jiných testovacích metod. Další a užitečná data o pre existujících serových/plasmatických protilátkách mohou být získána v klasickém ELISA testu. Dále, po separaci lymfocytů ze

krvního vzorku, pokud je toto provedeno, zbylá plasmatická tekutina může být použita pro detekci preexistujících protilátek za použití stejné pevné fáze potažené vazebným partnerem jako je použit v testu podle předkládaného vynálezu.

Pro zajištění toho, že způsob podle předkládaného vynálezu pracuje spolehlivě může být obsažena vhodná kontrola. Za prvé, srovnání jamkami s blokovanou syntézou proteinu a jamkami s neblokovanou syntézou proteinů ověří, že vynález je zaměřen na akutní produkci protilátek testovanými buňkami a že není zaměřen pouze na preexistující protilátky z periferní krve. V případě použití purifikovaných lymfocytárních přípravků jako vzorku je zajištěno, že stopové množství stopované protilátky z periferní krve ve vzorku lymfocytů neovlivní test. Za druhé, pro zajištění toho, aby zaznamenaný rozdíl mezi signály z blokovaných a z neblokovaných jamek nebyl způsoben sporadicky a okolními nespecificky aktivovanými lymfocyty, je použit negativní kontrolní antigen. Tento antigen bude od infekčního agens, které s největší pravděpodobností nezpůsobuje akutní onemocnění pacienta, např. tetanický toxoid. Počet takových okolních aktivovaných lymfocytů bude za jakýchkoliv okolností o mnoho nižší než je potřeba pro pozitivní testovací výsledky za použití způsobu podle předkládaného vynálezu. Provedení vynálezu bere tento bod v úvahu.

Jak bylo zmíněno výše, vzhledem ke snadnosti a rychlosti provedení a jednoduchosti je test podle vynálezu vhodný pro diagnostické nebo jiné klinické nebo veterinární použití, např. při chovu ryb. Kromě malého objemu vzorku je další výhodou to, že je potřeba pouze jeden vzorek a ne vzorky séra odebírané ve 2 až

3 týdením intervalu, jak je to vyžadováno pro většinu serologických testů. Pracné zpracování není potřebné a test je snadno automatizován. Kromě toho, je snadno možné testovat různé imunoglobulinové izotypy, pokud je to potřeba.

Výše uvedená testovací metoda podle předkládaného vynálezu poskytuje jednu metodu pro hodnocení přítomnosti nebo rozsahu nastupující infekce prostřednictvím analýzy spontánní exprese specifických protilátek k definovanému antigenu. Taková metoda je jednoduše aplikovatelná na hodnocení chorobných stavů, které jsou známé a ke kterým jsou antigeny týkající se relevantních imunogenů dostupné a tak poskytují specifický marker infekce. V některých klinických situacích, nicméně, nemůže být specifická choroba nebo infekce identifikována a/nebo vhodný antigen nemusí být dostupný pro použití v testu. V takovém případě může být test modifikován na hodnocení přítomnosti nebo rozsahu nespecifických ukazatelů infekce. Tak například, lymfocyty obsahující vzorky, např. plná krev nebo její purifikované nebo obohacené lymfocytární přípravky mohou být vyšetřovány s ohledem na jejich produkci infekčních markerů, např. cytokinů nebo interferonů, například interferonu gamma.

Z tohoto pohledu poskytuje ještě další aspekt vynálezu způsob pro detekci přítomnosti nespecifických ukazatelů infekce ve vzorku krve, kde uvedený způsob obsahuje:

kontaktování, v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, aliquot uvedeného vzorku, nebo volitelně, lymfocytů přímo izolovaných z uvedeného vzorku, s pevnou fází za podmínek, které umožňují produkci a sekreci ukazatelů infekce

lymfocyty;

detekování v roztoku, vazby ukazatele infekce na vazebný partner pevné fáze; a

srovnání vazby uvedeného ukazatele infekce v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy pomocí určení množství ukazatele infekce v uvedeném vzorku.

Pro provedení této metody může být pevná fáze poskytnuta s vhodnými zachycovacími molekulami, například protilátkami k ukazatelům infekce pro detekci. Pro detekci přítomnosti uvedených ukazatelů infekce imobilizovaných na pevné fázi mohou být použity způsoby jak byly popsány dříve, například použití značených protilátek nebo ligandů. V této metodě mohou být specifické markery identifikovány vhodnou volbou imobilizující skupiny nebo detekční molekuly. Tak, například, všechny proteiny ve vzorku mohou být imobilizovány na pevném nosiči a detekce může být provedena za použití značené specifické protilátky nebo ligandu. Alternativně, specifický vazebný partner může být použit pro imobilizaci týkající se ukazatelů infekce a může být potom vhodně značen, buď pozitivně nebo negativně, například v prvním případě vazbou na doménu přítomnou na ukazateli infekce, ale ne výlučně na této molekule, nebo v druhém případě značením nenavázaného vazebného partnera na pevné fázi. Kity pro provedení tohoto způsobu tvoří také část tohoto vynálezu.

Vynález bude nyní popsán podrobněji s odkazem na následující nelimitující příklady, ve kterých je testovací způsob podle předkládaného vynálezu označován jako Plasmacuté test.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Obecný postup

Buňky: Heparinizovaná krev byla odebrána různou dobu po vakcinaci od dobrovolníků, kterým byla podána inaktivovaná vakcína proti chřipce. Krev byla smísena se stejným objemem PBS. Lymfocyty byly separovány Lymphoprep (Nyegaard and Co., Oslo). Buňky byly promyty dvakrát v PBS, resuspendovány (ředění) v Dulbecco modifikovaném Eaglově mediu doplněném 20% FCS, 2 mM L-glutaminem, 100 IU/ml penicilinem a 100 µg/ml streptomycinem (Pen + Strep) = MEDIUM.

Stop roztok: 1 mg/ml cykloheximidu v PBS obsahujícím 10% azid sodný.

ELISA a chřipkové antigeny: Purifikované povrchové antigeny ze tří kmenů viru v chřipkové vakcině byly použité v klinickém pokusu a zde jsou označeny krátce H3N2, H1N1 a B.

ELISA plotny: Greiner EIA plotny 655001 F-forma, nebo Costar EIA plotny 3590. Potažené 100 µl/jemku roztokem 10 µg/ml proteinu v PBS přes noc při 4 °C. Blokovány v MEDIUM po 1 hodinu při pokojové teplotě. Promyty jedenkrát v PBS.

Test: 100 µl ředění buněčné suspence v MEDIUM přidáno do trojích jamek ve dvou paralelních sadách pro každý ze tří chřipkových antigenů. Jedna sada trojích jamek je blokována

v počátečním kroku přidáním 50 μ l STOP roztoku. Jsou inkubovány po různou dobu při 37 °C při 5% CO₂ na vzduchu. ELISA plotna je promyta jedenkrát PBS, potom dvakrát PBS s 0,05% Tween 20. 50 μ l/jamku vhodně ředěného králičího anti lidského Ig peroxidasa konjugátu (Sigma) je přidáno a ponecháno při pokojové teplotě po 1 hodinu. Plotna je potom vyvíjena za použití o-fenylendiaminu (OPD) substrátu a je čtena absorbance při 492 nm.

Vzorky odebrané 11 dní po vakcinaci

Doba inkubace buněk: 4 hodiny, 0 hodin = blokové jamky

	Počet buněk	H3N2	H1N1	B
0/4 h	$6,6 \times 10^4$	264/522	199/490	352/327
0/4 h	$6,6 \times 10^3$	238/290	143/194	331/353

Všechny hodnoty jsou průměrem trojích jamek jako absorbance x 1000. průměr $\pm$ 10%

Závěr: $6,6 \times 10^4$ = 66000 buněk dávalo signifikantní zvýšení signálu po 4 hodinové inkubaci. H3N2 absorbance stoupla na 98%, H1N1 na 153% a B na 50%.

Toto je reprezentativní pokus. Další testy ukázaly, že inkubace buněk přes noc dala zřetelnější rozlišení mezi blokovánými a neblokovánými jamkami s absorbancí více než 1000. System také pracoval při kratší inkubační době, např. 2 - 3 hodiny. 10 krát více buněk, např. $6,6 \times 10^3$ buněk/jamku může také, ale ne vždy, dát jasnější rozlišení.

Příklad 2

Obecné postupy

Buňky: Heparinizovaná krev byla odebrána 7 dní po vakcinaci od dobrovolníků, kterým byla podána inaktivovaná vakcína proti chřipce. Krev byla smísena se stejným objemem PBS. Lymfocyty byly separovány Lymphoprep (Nyegaard and Co., Oslo). Buňky byly promyty dvakrát v PBS, resuspendovány (ředění) v Dulbecco modifikovaném Eaglově mediu doplněném 20% FCS, 2 mM L-glutaminem, Pen + Strep (jako v předchozím) = MEDIUM.

Stop roztok: 1 mg/ml cykloheximidu v PBS obsahujícím 10% azid sodný.

Testovací antigeny: Purifikované povrchové antigeny ze tří kmenů viru v chřipkové vakcině byly použité v klinickém pokusu a zde jsou označeny krátce H3N2, H1N1 a B.

Kontrolní antigen: Tetanový toxoid (neadsorbovaný na hliník; Lederle).

ELISA plotny: Greiner EIA plotny 655001 F-forma, nebo Costar EIA plotny 3590. Potažené 100 μ l/jemku roztokem 10 μ g/ml proteinu v PBS přes noc při 4 °C, tetanus: 10 Lf/ml. Blokovány v MEDIUM po 1 hodinu při pokojové teplotě. Promyty jedenkrát v PBS.

Test: 100 μ l ředění buněčné suspence v MEDIUM bylo přidáno do trojích jamek ve dvou paralelních sadách pro každý ze tří chřipkových antigenů a tetanový kontrolní antigen. Jedna sada

trojích jamek je blokována v počátečním kroku přidáním 50 μ l STOP roztoku. Jsou inkubovány při 37 °C v inkubátoru s 5% CO₂ na vzduchu po 3 hodiny. Po inkubaci je ELISA plotna promyta jedenkrát PBS, potom dvakrát PBS s 0,05% Tween 20. 50 μ l/jamku vhodně ředěného králičího anti lidského Ig peroxidasa konjugátu (Sigma) je přidáno a ponecháno při pokojové teplotě po 1 hodinu. Plotna je potom vyvíjena za použití o-fenylendiaminového (OPD) substrátu a je čtena absorbance při 492 nm. (Test může být modifikován pro zvýšení sensitivity dalším krokem před substrátem za použití 1 hodinového kroku Extravidin/peroxidasa (Sigma). Toto vyžaduje použití biotinylovaného konjugátu in lieu peroxidasového konjugátu (Sigma)).

Representativní experimentální výsledky

7 dní po vakcinaci (subjekty; č. 1 a č. 2)

Doba inkubace buněk: 3 hodiny, 0 hodin = blokové jamky

Počet buněk			H3N2	H1N1	B	Tetanus
0/3 h	10 ⁵	č.1	063/410	055/269	206/258	046/050
		č.2	045/077	048/242	182/207	040/046

Všechny hodnoty jsou průměrem trojích jamek jako absorbance x 1000. průměr $\pm$ 16%

Subjekty jsou náctiletí (16 let). Je dobře známé, že mladí lidé odpovídají lépe na A/H1N1 chřipkovou vakcinu. To je jasně vidět výše, oba subjekty č. 1 a č. 2 odpovídají dobře. Nicméně,

obvyklé vakcíny odpovídají různě na různé složky vakcín, takže musí být očekáván rozdíl v absorbanci. Toto je zde demonstrováno, když subjekt č. 1 odpovídá slabě na B virus, zatímco č. 2 odpovídá signifikantně pouze na H1N1 virus. Jak je očekáváno, žádný z nich neodpovídá na tetanový toxoid. Pokud nicméně byly buňky stimulovány in vitro toxoidem po dobu několika dní, jejich časná imunologická paměť (díky dětské vakcinaci) může vést k produkci tetanových protilátek. V reálné případu infekce testovaném v diagnostické laboratoři za použití metody podle předkládaného vynálezu bude pouze testované agens/antigen dávat pozitivní signál.

Příklad 3

Obecné postupy:

Buňky: Heparinizovaná krev byla odebrána 6 dní po vakcinaci od dospělých (muži věku 24 let) a dětí (muži věku 3 let), kteří dostali inaktivovanou podjednotkovou chřipkovou vakcínu.

Lymfocyty byly separovány jak je popsáno v příkladech 1 a 2. Buňky byly uvedeny do kontaktu s pevnou fází nesoucí antigen H3N2, H1N1 a B jak je popsáno v příkladech 1 a 2 po 3 hodiny při 37 °C, a potom test probíhal jak je popsáno (žádný stop roztok nebo kontrolní antigen nebyl použit v tomto pokusu).

Tabulka 1 ukazuje výsledky od dvou jedinců, u kterých jsou výsledky pro každý antigen průměrem trojích jamek jako absorbance x 1000.

Tabulka 1

dospělý subjekt				dětský subjekt			
počet buněk (tisíce)	A/H3N2	A/H1N1	B	počet buněk (tisíce)	A/H3N2	A/H1N1	B
224	475	322	913	275	1268	97	10
112	189	193	567	138	951	65	10
56	93	62	162	69	672	51	20

Výsledky ukazují, že malé dítě, mající pouze jednu časnou epizodu chřipky, A/H3N2 infekci, má velmi silnou imunitní odpověď na A/H3N2 složku v trivalentní vakcině. Jak bylo očekáváno pro toto dítě, nebyla zde žádná odpověď na A/H1N1 nebo B složku. Takto malé dítě obvykle potřebuje 2 dávky vakciny pro vyvolání dostatečné imunitní odpovědi. Okolo 70000 lymfocytů, což koresponduje asi 70 μ L objemu plné krve, bylo dostačující pro definitivně pozitivní výsledek. Pro dospělý subjekt, který měl mnoho epizod chřipky, nebyla odpověď takto silná, přesto však byla signifikantní pro všechny tři složky vakciny, i když v různém stupni. Pro B složku bylo potřeba asi 100000 lymfocytů pro pozitivní výsledek, zatímco pro dvě A složky bylo potřeba minimálně 100000 buněk a lépe 200000 buněk.

Příklad 4: Detekce Herpes simplex typ 2 klasickou testovací metodou a Phasmacute testovací metodou

Obecné postupy

Tkáňová kultura a serologické analýzy

Materiál z genitálií pěti subjektů majících příznaky podezřelé z genitální infekce virem herpes byly podrobeny rutinnímu postupu tkáňové kultivace s cílem detekovat virus ze vzorku (provedeno Virus Laboratory, Haukeland University Hospital, Bergen). Stejná laboratoř provedla rutinní serologické analýzy sérových vzorků za použití komerčních ELISA kitů (Behringer Enzygnost od Behringer, Germany obsahujících HSV antigeny pro detekci IgG a IgM.

Separace lymfocytů

Lymfocyty byly separovány za použití lymfoprepu (Nycomed) centrifugace podle gradientu density heparinizované krve od pěti subjektů majících příznaky podezřelé z genitální infekce virem herpes, odebrané simultáně se vzorkami pro analýzu v laboratoři. Buňky byly promyty třikrát v PBS, resuspendovány v kultivačním mediu DMEM obsahujícím 20% FCS, 1 mM L- glutamin, 50 IU/ml penicilinu a 50 µg/ml streptomycinu (DMEM/FCS). Přežívající buňky byly počítány vylučováním trypanové modři (0,2%).

Plasmacute test za použití Behringer Enzygnost anti-HSV IgM a IgG ELISA

Behringer Enzygnost anti-HSV IgM a IgG jsou dodány jako proužky

obsahující 8 jamek potažených antigenem odvozeným od permanentních opičích buněk ledvin infikovaných HSV a 8 jamek potažených kontrolním antigenem od neinfikovaných buněk. Proužky byly blokovány 200 μ l/jamku DMEM/FCS při 37 °C v 5% CO₂ po 1 hodinu. Jedno sto μ l na jamku vhodného ředění lymfocytů bylo přidáno a inkubováno po 3 hodiny při 37 °C v 5% CO₂. Všechny další postupy byly přesně podle instrukcí daných dodavatelem kitu. Plotny byly vyvíjeny za použití konjugátů, reagens a pufrů dodaných stejným dodavatelem. Substrát, tetramethylbenzidin hydrochlorid (TMB), vyžadoval čtení OD při 450 nm, za použití dostupné Titertek Multiskan MCC/340 čtečky ploten (Flow Laboratories).

Plasmacut test za použití Bioelisa HSV-2 IgG

Bioelisa IgG HSV-2 (Biokit, Spain) je dodán jako proužky obsahující 8 jamek potažených inaktivovaným HSV-2 antigenem. Proužky byly blokovány 200 μ l/jamku DMEM/FCS při 37 °C v 5% CO₂ po 1 hodinu. Jedno sto μ l na jamku vhodného ředění lymfocytů bylo přidáno a inkubováno po 3 hodiny při 37 °C v 5% CO₂. Všechny další postupy byly přesně podle instrukcí daných dodavatelem kitu. Plotny byly vyvíjeny za použití konjugátů, reagens a pufrů dodaných stejným dodavatelem. Substrát, tetramethylbenzidin hydrochlorid (TMB), vyžadoval čtení OD při 450 nm, za použití dostupné Titertek Multiskan MCC/340 čtečky ploten (Flow Laboratories).

Plasmacut test za použití Bioelisa HSV IgM

Bioelisa HSV IgM (Immunocapture) test (Biokit, Spain) je dodán

jako proužky obsahující 8 jamek potažených kraličími anti lidský IgM protilátkami. Proužky byly blokovány 200 μ l/jamku DMEM/FCS při 37 °C v 5% CO₂ po 1 hodinu. Jedno sto μ l na jamku vhodného ředění lymfocytů bylo přidáno a inkubováno po 3 hodiny při 37 °C v 5% CO₂. Všechny další postupy byly přesně podle instrukcí daných dodavatelem kitu. Přesněji, navázaná protilátka byla detekována 100 μ l/jamku HSV antigenu značeného křenovou peroxidasou (purifikovaný a inaktivovaný HSV, který byl propagován in vitro v lidských fibroblastech) a pro minimalizaci nespecifických reakcí neznačeného kontrolního antigenu, skládajícího se z neinfikovaných buněčných složek (dodaných s kitem), 10 μ l HSV antigenu a 10 μ l kontrolního antigenu na jamku. Plotny byly čteny na Titertek Multiskan MCC/340 čteče ploten (Flow Laboratories).

Výsledky pokusu jsou ukázány v tabulce 2.

Tabulka 2

pacient	čas po nástupu příznaků Sex/věk	AGE	předpokl. primární/ rekurentní infekce	izolace viry	sérové protilátky		Plasmacut testy				Zachycení protilátky Plasmacut test	
					IgM	IgG	Behring IgM	Behring IgG	Bioelisa IgG	Bioelisa IgM		
1	6	F/40	primární infekce	-ve	-			205 000	103 000	-		
2	6	F/21	primární infekce	usv-1	-			223 000	111 000	-		
3	2 20	M/47	rekurentní infekce	usv-2 usv-2	-			48 000 nt	96 000	-		
4	5 19	F/22	primární infekce	-ve		braniční hodnota nt		15 000 40 500	121 000 20 250	<8 000 40 500		
5	7	F/21	primární infekce	-ve								

nt = netestováno

Tabulka 2 shrnuje data pro pacienty 1 - 5. Diagnostická laboratoř v Haukeland University Hospital se pokusila izolovat virus z klinických vzorků a také provedla rutinní ELISA testy na sérové IgG a IgM za použití Behringer Enzygnost ELISA kitů. Je uveden typ izolovaného viru, -ve znamená negativní izolaci. Sérové ELISA hraniční hodnoty jsou definovány výrobcem kitu; + = OD > 0,2, hraniční - OD 0,1 / 0,2, definováno jako neurčitý výsledek výrobcem kitu; a -- = OD < 0,1.

Pro Plasmacut test jsme použili OD > 0,2 jako pozitivní a v tabulce jsme uvedli počet lymfocytů nezbytných pro vyvolání takové odpovědi.

Pouze Bioelisa IgG test si nárokuje identifikaci HSV2 protilátek, zatímco ostatní ukazují infekci HSV (1 a/nebo 2).

Výsledky

Pacient 1 měl klinické příznaky primární HSV-2 infekce. Nemocniční testy selhaly při izolaci viru z klinického vzorku a žádný IgM nebyl nalezen při standardním ELISA testu. Hraniční sérové IgG protilátky byly nalezeny standardními nemocničními ELISA testy. V potvrzení těchto výsledků zde nebyly nalezeny žádné buňky, které by produkovaly IgM protilátky v Plasmacut testu. Jak Behringer IgG, tak Bioelisa IgG Plasmacut testy detekovaly buňky produkující IgG protilátku k HSV. 205000 lymfocytů bylo potřeba pro pozitivní hodnotu absorbance v Plasmacut testu a v Bioelisa IgG bylo vyžadováno 103000 lymfocytů pro dosažení pozitivní absorbance.

U pacienta 2 proběhla primární infekce, což bylo potvrzeno izolací viru HSV typ 1. Žádný sérový IgM nebyl detekován v nemocniční laboratoři, ale IgG protilátka byla detekována. V Plasmacut testu nebyly detekovány žádné buňky produkující IgM, nicméně, jak Behringer, tak Bioelisa Plasmacut test detekoval IgG produkující buňky, 223000 a 111000 buněk bylo potřeba, v příslušném pořadí.

Pacient 3 měl rekurentní HSV-2 infekci, která byla potvrzena izolací HSV-2 viru z klinických vzorků. IgG byl přítomen v klinickém vzorku odebraném 2 dny po nástupu klinických příznaků, nicméně žádný sérový IgM nebyl v tuto dobu detekován. V Plasmacut testu nebyl žádný IgM detekován 2 dny po nástupu klinických příznaků, nicméně jak Behringer, tak Bioelisa Plasmacut test detekoval IgG produkující buňky (bylo požadováno 48000 - 96000 buněk). IgM sérové protilátky byly detekovány nemocnicí v sérovém vzorku odebraném 20 dní po nástupu klinických příznaků. 182000 byly požadováno pro produkci pozitivní absorbance v Plasmacut Behringer IgM testu, nicméně žádné buňky nebyly detekovány v Bioelisa IgM Plasmacut testu.

Pacient 4 měl primární infekci HSV. Žádný virus nebyl detekován v klinickém vzorku zaslaném do nemocniční laboratoře. Hraniční sérové IgM protilátky byly detekovány a byly nalezeny pozitivní hladiny sérových IgG protilátek. Jak IgG, tak IgM protilátky byly detekovány v Plasmacut testu za použití jak Behringer, tak Bioelisa kitů ve vzorcích krve odebraných 5 a 19 (žádný Behringer IgM nebyl detekován) dní po nástupu klinických příznaků. V Plasmacut testu bylo vyžadováno méně než 8000 buněk pro Bioelisa IgM test a 60500 buněk bylo vyžadováno pro Behringer.

IgM test a oba tyto vyžadovaly méně než 100 μ l heparinisoované krve.

U pacienta 5 bylo podezření na primární infekci HSV. Nicméně, laboratoří nebyl izolován žádný virus a nebyly detekovány žádné sérové protilátky. V Plasmacut testu nebyly detekovány žádné buňky produkující IgG nebo IgM protilátky k HSV.

Diskuse

Plasmacut test byl ukázán jako funkční jak pro primární, tak pro rekurentní infekci herpes simplex. Ve všech případech byl Plasmacut test alespoň stejně účinný jako tradiční ELISA postupy zde použité. Jednotlivě, pro pacienta 1, ačkoliv nebyl z klinického vzorku izolován žádný virus, a skorování bylo pouze hraniční (t.j. nesměrodatné) v rutinním nemocnočním testu, Plasmacut test (Bioelisa IgG a Behringer IgG) ukázal, že přibližně 100000 buněk a 200000 buněk, v příslušném pořadí, dává nedvojsmyslné pozitivní výsledky. Je možné, že tento pacient má dvojitou infekci (HSV1 a HSV2), ze které byl pouze HSV1 zaznamenán v místě izolace viru. Nemůže být nicméně vyloučeno, že pozitivní HSV2 výsledek (Bioelisa IgG) byl způsoben serologickou zkříženou reakcí. Pro dva časově vzdálené vzorky od pacienta 4, od kterého nebyl izolován žádný virus, ukázal Plasmacut test posun počtu herpes specifických IgM a IgG produkujících lymfocytů od časně fázi k pozdní fázi infekce, což je slučitelné s dobře známou dynamikou po primární infekci a jasně to potvrzuje aktivní imunitní odpověď. Bioelisa IgM Plasmacut test byl zejména sensitivní, protože méně než 8000 lymfocytů bylo požadováno pro vyvolání pozitivního signálu v prvním ze dvou vzorků.

V tomto pokusu jsme ukázali, že Plasmacut metoda je účinná pro klinické případy virových infekcí u lidí.

Příklad 5: Mnohonásobné disky - Potažení nitrocelulosových disků protilátkami specifickými pro IgG, IgA a IgM protilátky.

Tento pokus byl proveden pro stanovení toho, zda system mnohonásobných disků může být použit v Plasmacut testu pro detekování protilátek různých specificit.

Obecné postupy:

Vzorky heparinizované plné krve byly odebrány od dvou zdravých dospělých subjektů. Protože tyto subjekty nebyly v akutní fázi jakékoliv infekce, dali jsme si za cíl analyzovat IgG, IgA a IgM spontánní protilátkovou sekreci bez ohledu na jejich (neznámou) antigenní specificitu.

Subjekt 1 byl použit pro stanovení toho, zda může být použit system používající disků potažených 3 různými antigeny v jedné jamce v Plasmacut testu. Jedna jamka (č. 1).

Subjekt 2 byl použit pro stanovení toho, zda existuje oslabení signálu za přítomnosti počtu disků potažených stejným antigenem. Tři separátní jamky v Plasmacut testu (jamky č. 2, 3 a 4).

Separace lymfocytů

Lymfocyty byly separovány za použití lymfoprepu (Nycomed) centrifugace podle gradientu density heparinizované krve. Buňky

byly promyty třikrát v PBS a resuspendovány v kultivačním mediu DMEM obsahujícím 20% FCS, 1 mM L- glutamin, 50 IU/ml penicilinu a 50 μ g/ml streptomycinu (DMEM/FCS). Přežívající buňky byly počítány vylučováním trypanové modři (0,2%).

Plasmacut test používající disků jako pevné fáze

Směsné estery celulosových disků s velikostí porů 8 μ m (Millipore SCWP 01300) byly potaženy 10 μ g/ml kozími anti-lidskými pro třídy specifickými protilátkami (Sigma, anti-IgG I-3382; anti-IgA I-0884; anti-IgM I-0759) ředěnými v PBS azidu (0,001%) přes noc při pokojové teplotě. Disky byly blokovány DMEM/FCS při 37 °C v 5% CO₂ po 1 hodinu. Lymfocyty byly přidány k 12 mm čirým příčným jamkám (clear transwell) s velikostí porů 0,4 μ m (Costar 3460) a disk byly umístěny na spodní stranu a inkubovány po dobu 3 hodin při 37 °C v 5% CO₂. Jednotlivé disk byly přeneseny do separátních jamek 24 jamkové plotny (Costar) a byly 3x promyty PBS a 3x PBS Tween (0,05%). Navázaná protilátka byla detekována 200 μ l/jamku kozími anti-lidskými pro třídu specifickými s peroxidasou konjugovanými protilátkami (Sigma, IgG A-6029; IgA A-4165; IgM A-4290) ředěnými v DMEM/FCS a inkubovanými 2 hodiny při pokojové teplotě. Disky byly promyty pro odstranění nenavázané protilátky, jak bylo popsáno dříve a vyvíjeny za použití 200 μ l/jamku o-fenylendiamin-dihydrochlorid (OPD) (Sigma P-7288) v 0,05 M fosforečnanovém-citrátovém pufru (pH 5,0). Třicet minut po přidání substrátu byl vývoj ukončen za použití 100 μ l/jamku 1M H₂SO₄. Jedno sto μ l na jamku bylo přeneseno do 96 jamkové ELISA plotny (Greiner EIA plotny 65501 F-forma) a OD byly čteny na Titertek Multiskan MCC/340 čtečce ploten (Flow Laboratories) při

492 nm.

Výsledky pokusů jsou ukázány v tabulce 3, ve které jsou výsledky pro každou zachycovací protilátku průměrem ze tří jamek jako absorbance x 1000.

Tabulka 3



Subjekt 1			Subjekt 2		
Jamka 1			Jamka 2		
Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)	Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)
1	IgG	405	1	IgG	198
2	IgA	140	2	IgG	162
3	IgM	85	3	IgG	112
4	IgG	410	4	IgG	157
5	IgA	125	5	IgG	142
6	IgM	64	6	IgG	123
7	IgG	375	7	IgG	144
8	IgA	168	8	IgG	125
9	IgM	61			
buňky			buňky		
Jamka 1			Jamka 2		
Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)	Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)
1	IgM	82	1	IgA	182
2	IgM	107	2	IgA	202
3	IgM	124	3	IgA	221
4	IgM	145	4	IgA	263
5	IgM	119	5	IgA	190
6	IgM	127	6	IgA	209
7	IgM	138	7	IgA	172
8	IgM	134	8	IgA	151
buňky			buňky		
Jamka 1			Jamka 2		
Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)	Disk. č.	Anti-lidská zachycovací protilátka	OD (492nm)
1	IgM	82	1	IgA	182
2	IgM	107	2	IgA	202
3	IgM	124	3	IgA	221
4	IgM	145	4	IgA	263
5	IgM	119	5	IgA	190
6	IgM	127	6	IgA	209
7	IgM	138	7	IgA	172
8	IgM	134	8	IgA	151
buňky			buňky		

Jamka 1 obsahovala 2 miliony lymfocytů, jamky 2 - 4 obsahovaly 1 milion lymfocytů. "buňka" ukazuje, které číslo disku byly umístěno nejbližší k vrstvě buněk.

Výsledky:

Test se subjektem 1 ukázal, že i 9 disků může být snadno použito v jamce obsahující lymfocyty. Odpověď pro tři IgG disky, tři IgA disky a tři IgA disky byly pro všechny praktické účely identické pro každou sadu, což ukazuje, že aktuální umístění disku vzhledem k protilátce není zásadní. Test s lymfocyty od subjektu 2 ukázal, že alespoň 8 identicky potažených jamek může být umístěno v jedné lymfocyty obsahující jamce za vzniku prakticky shodných výsledků. Tak vynález umožňuje mnohonásobné testy pro stejné přípravky lymfocytů v jedné jamce.

P a t e n t o v é n á r o k y

ce

1. Způsob ~~pro~~ detekování aktivní produkce protilátek v odpovědi na cílový antigen v krevním vzorku v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) kontaktování, v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, aliquot uvedeného vzorku, nebo volitelně, lymfocytů přímo izolovaných z uvedeného vzorku, se pevnou fází za podmínek, které umožňují produkci protilátek a jejich sekreci lymfocyty;

b) detekci vazby protilátky na uvedený antigen(y) na pevné fázi v roztoku; a

c) srovnání vazby uvedené protilátky v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, čímž se získá určení množství aktivní sekrece protilátky v odpovědi na uvedený antigen(y).

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená pevná fáze nese jeden nebo více antigenů rozpoznávaných protilátkou nebo protilátkami, které mají být detekovány:

3. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená pevná fáze nese jednu nebo více protilátek, které rozpoznávají protilátku nebo protilátky, které mají být detekovány.

4. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 3
v y z n a č u j í c í s e t í m, že vzorek krve použitý ve
způsobu, nebo použitý pro přípravu lymfocytů pro použití ve
způsobu, má objem menší než 1 ml.

5. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 4
v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob je proveden na
vzorcích krve od novorozenců nebo dětí pro odlišení mezi nově
syntetizovanými protilátkami a pasivně přenesenými mateřskými
protilátkami.

6. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 5
v y z n a č u j í c í s e t í m, že vzorek krve je získán postupy
purifikace nebo obohacení krve získané přímo od pacienta.

7. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 6
v y z n a č u j í c í s e t í m, že lymfocyty, které jsou přímo
izolovány z uvedeného vzorku, jsou použity ve způsobu.

8. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 7
v y z n a č u j í c í s e t í m, že před krokem kontaktování
nároku 1 je pevný nosič blokován.

9. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 8
v y z n a č u j í c í s e t í m, že inhibitor proteinové syntézy
je cykloheximid použitý v koncentraci 50 - 500 $\mu\text{g/ml}$.

10. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 9
v y z n a č u j í c í s e t í m, že inhibitor ATPasy je použit v
konjunkci s inhibitorem syntézy proteinů.

11. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že krok detekce nároku 1 je proveden imunotestem.

12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunotestem je ELISA.

13. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 3 až 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden nebo více antigenů rozpoznávaných protilátkou nebo protilátkami, které mají být detekovány, imobilizovaných na uvedené pevné fázi je uveden do kontaktu s uvedenou pevnou fází.

14. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 2 a 4 až 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že jedna nebo více protilátek rozpoznávajících protilátku nebo protilátky, které mají být detekovány, imobilizovaných na uvedené pevné fázi je uvedeno do kontaktu s uvedenou pevnou fází.

15. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že solubilní substrát je použit pro krok detekce nároku 1 a dává spektrofotometricky detekovatelný signál.

16. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je použit negativní kontrolní antigen.

17. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 1 až 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je detekována aktivní

produkce protilátek k Herpes viru.

18. Způsob podle jakéhokoliv z předešlých nároků 2 a 4 až 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je využito více pevných fází, která každá nese různý cílový antigen.

19. Způsob pro detekování přítomnosti nespecifických ukazatelů infekce ve vzorku krve v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

kontaktování, v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, aliquot uvedeného vzorku, nebo volitelně, lymfocytů přímo izolovaných z uvedeného vzorku, se pevnou fází za podmínek, které umožňují produkci sekrecí ukazatelů infekce lymfocyty;

detekci vazby ukazatele infekce na vazebný partner na pevné fázi; a

srovnání vazby uvedeného ukazatele infekce v přítomnosti nebo za absence inhibitoru proteinové syntézy, čímž se získá určení množství ukazatele infekce v uvedeném vzorku.