(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **162726 B**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2304/85

(22) Indleveringsdag: 23 maj 1985

(41) Alm. tilgængelig: 26 nov 1985

(44) Fremlagt: 02 dec 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 25 maj 1984 JP 104472/84

(51) Int.Cl.5 G 01 N 33/569
G 01 N 33/574

(71) Ansøger: *Eisai Co., Ltd.; 6-10, Koishikawa 4-chome; Bunkyo-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Junichi *Tohmatsu; JP Takashi *Sawada; JP Isao *Miyoshi; JP Hirokuni *Taguchi; JP

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til eliminering af falsk positive resultater ved bestemmelse af ATL virus-antistof og reagens dertil

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 105465
GB off.g.skrift nr. 2122343

(57) Sammendrag

2304-85

Fremgangsmåde til bestemmelse af et ATL virus-antistof i et prøveeksemplar ved en metode, der benytter et ATL-associeret antigen og er valgt blandt enzymimmunoprøve, radioimmunoprøve og passiv hemagglutination, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at det prøveeksemplar, til hvilket der er sat et ATL virus-antigen, anvendes som et sammenlignings-prøveeksemplar.

DK 162726 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til eliminering af falsk positive resultater ved bestemmelse af et ATL virus-antistof i en prøve ved en metode, der benytter et ATL-associeret antigen og er valgt blandt enzymimmunassay, radioimmunassay og passiv hæmagglutinering, og et reagens dertil. Ved angivelsen "ATL virus" menes voksen T-celle-leukæmivirus, der også forkortes "ATLV". ATL virus og ATL virus-antistoffer, der skal bestemmes ifølge den foreliggende opfindelse, er beskrevet detaljeret i følgende litteratur, der her anvendes som reference:

1) Miyoshi, I., et al., Gann, 71, 155 (1980).

2) Miyoshi, I., et al., Jap. J. Clin. Oncol., 9 (Suppl.), 485 (1979).

3) Hinuma, Y., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 78, 6476 (1981).

4. Miyoshi, I., et al., Gann, 73, 399 (1982).

5. Miyoshi, I., et al., Lancet, 683 (1982).

6. Shimoyama, M., et al., Jap. J. Clin. Oncol., 12, 109 (1982).

7) Ohkouchi et al., Immunohaematology, 3 (5), 267 (1983).

Behovet for bestemmelse af ATL virus-antistoffer, en fremgangsmåde til fremstilling af et til bestemmelsen nødvendigt ATL-associeret antigen, en fremgangsmåde til bestemmelse af ATL virus-antistofferne ved anvendelse af nævnte antigen og et reagens deril er beskrevet detaljeret i japansk patentpublikation nr. 62527/1984, der benyttes som litteraturhenvisning.

Ovennævnte litteraturhenvisninger viser, at et signifikant stort antal blodtransfusion-donorer bærer ATL virus, således at der er en mulighed for, at blodtransfusion kan spille en vigtig rolle ved transmission af nævnte virus. Det er således nødvendigt at bestemme ATL virus-antistoffer i serum fra donorer for at frasortere ATL virus-bærere og således hindre infektion gennem blodtransfusion, og at tilvejebringe en meget sensibel fremgangsmåde til bestemmelse af nævnte antistoffer og et reagens dertil.

På denne baggrund er der i japansk patentpublikation nr. 187861/1983 beskrevet en fremgangsmåde til bestemmelse af ATL virus-antistoffer ved enzymimmunassay eller radioimmunassay ved anvendelse af celler, der producerer ATL-associeret antigen. Japansk patentpublikation nr. 62527/1984 omtalt ovenfor beskriver yderligere en fremgangsmåde til bestemmelse af ATL virus-antistoffer, hvor der anvendes et ATL-associeret antigen, som er fremstillet ved at behandle celler, der producerer ATL- associeret antigen, med et overfladeaktivt middel, og et reagens dertil.

GB offentliggørelsesskrift nr. 2 122 343 beskriver en fremgangsmåde til bestemmelse af ATL virus-antistof ved fluorescens-immunassay eller enzym-immunassay under anvendelse af et immobiliseret ATL-associeret antigen.

EP offentliggørelsesskrift nr. 105 465 beskriver en fremgangsmåde til bestemmelse af ATL virus-antistof ved enzymimmunassay, radioimmunassay eller passiv hæmagglutinering under anvendelse af et ATL-associeret antigen opnået ved behandling af ATL-associeret antigen-producerende celler med et overfladeaktivt middel.

Celler, der producerer ATL-associeret antigen, og det ATL-associerede antigen, der er fremstillet ved partiel rensning, indeholder forskellige ikke-specifikke antigener foruden ATL virus-antigenet. En prøve, hvor et af disse materialer anvendes, kan således resultere i påvisning af ikke blot de tilsigtede ATL virus-antistoffer, men af andre ikke-specifikke antistoffer, såsom antinucleære og anti-T-cellemembran-antistoffer. Prøvens resultat viser derfor ikke altid nøjagtigt tilstedeværelsen af ATL virus-antistoffer. Når f.eks. serum fra en patient med systemisk lupus erythematodes anvendes som prøveeksemplar, vil dette prøveeksemplar, der oprindeligt er negativt for ATL virus-antistoffer, undertiden vise et positivt resultat. Det positive resultat kunne tænkes at skyldes en reaktion mellem antistoffer, der ledsager den systemiske lupus ery-

thematodes, og en ikke-specifik komponent i det ATL-associerede antigen.

For at løse ovennævnte problem tilvejebringer japansk patentansøgning nr. 144874/1983 en fremgangsmåde, hvor der til bestemmelsen anvendes et antigen, som er fremstillet uafhængigt ved at behandle en passende ATL virus-negativ cellestamme, f.eks. ved at behandle en cellestamme stammende fra en patient med akut lymfoblastisk leukæmi, og det således opnåede resultat anvendes som sammenligning ved bedømmelsen for derved at hindre fejlbestemmelse forårsaget af ikke-specifikke anti-stoffer. Ovennævnte opfindelse er imidlertid endnu genstand for diskussion. Den kan således ikke sikre, at de ikke-specifikke antistoffer, der er påvist ved hjælp af det ATL-associerede antigen, og det, der er påvist med antigenet stammende fra den ATL virus-negative cellestamme, er immunologisk identiske. Det må snarere formodes, at de to antistoffer er forskellige. Tilstedeværelse eller fraværelse af sidstnævnte afspejler således ikke altid tilstedeværelse eller fraværelse af førstnævnte, og bedømmelsen af tilstedeværelse af ATL virus-antistoffer ifølge ovennævnte opfindelse er derfor tvetydig.

Som ovenfor beskrevet, er fremgangsmåden til bestemmelse af ATL virus-antistoffer anført i japansk patentansøgning nr. 144874/1983 anvendelig ved praktisk bedømmelse af tilstedeværelse af nævnte antistoffer, men den er stadig genstand for diskussion. På denne baggrund er der søgt tilvejebragt en fremgangsmåde til nøjagtig bestemmelse af ATL virus-antistoffer. Som resultat af disse undersøgelser har det nu vist sig, at dette er muligt ved uafhængigt at fremstille en sammenlignings-prøve ved at sætte et ATL virus-antigen til test-prøven og subtrahere det resultat, der opnås ved anvendelse af sammenlignings-prøven, fra det resultat, der opnås ved anvendelse af test-prøven. Herved elimineres falsk positive resultater fra bestemmelsen.

Den foreliggende opfindelse har endvidere til formål at tilvejebringe et reagens til anvendelse ved en sådan fremgangsmåde.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at en prøve, til hvilken der er sat et ATL virus-antigen, anvendes som sammenlignings-prøve; og reagenset til anvendelse ved den omhandlede fremgangsmåde er ejendommeligt ved, at det omfatter et ATL virus-antigen.

Opfindelsen beskrives detaljeret i det følgende.

Det ATL-associerede antigen, der har relation til den foreliggende opfindelse, er det såkaldte voksen T-celle-leukæmi-associerede antigen. Nærmere angivet forekommer det i form af antigenproteiner eller virale C-type-partikler i celler, der producerer ATL-associeret antigen. Det reagerer specifikt med ATL virus-antistoffer, om tilstede. Det ATL virus-associerede antigen kan fremstilles ved at behandle en antigen-producerende cellestamme, fortrinsvis MT-2 celler, der stammer fra humane funiske leucocyter og er etableret ved hjælp af en blandet kultur med leukæmiceller indsamlet fra perifert blod fra en patient med voksen T-celle-leukæmi, med et overfladeaktivt middel. Yderligere beskrivelse af det ATL-associerede antigen og fremgangsmåden til behandling af MT-2 med et overfladeaktivt middel findes i følgende litteraturhenvisninger:

7) Yoshida, M., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 79, 2031 (1982).

8) Miyochi, I. et al., Gann, 72, 978 (1981).

9) Miyoshi, I, et al., Nature, 294, 770 (1981).

10) Japansk patentansøgning nr. 169670/1982.

Det ATL virus-antigen, der har relation til den foreliggende opfindelse, er et for nævnte virus særegent antigen og stammer fra patogene virale partikler fra voksen T-celle-leukæmi. Det reagerer specifikt med ATL virus-antistoffer, om tilstede. ATL virus-antigenet kan fremstilles ved at behandle ATL virus, der er fremstillet

ved at koncentrere supernatanten fra et medium, hvori ATL antigen-producerende celler er dyrket efterfulgt af rensning, med et overfladeaktivt middel. For eksempel bliver supernatanten fra et medium, hvori MT-2 celler er dyrket, koncentreret og ultracentrifugeret for at fraskille ATL virus, og det således indsamlede ATL virus underkastes yderligere sucrosekoncentrationsgradient-ultracentrifugering for at fraktionere, og antigen-positive fraktioner dialyseres for at vinde renset ATL virus. Det herved vundne rensede ATL virus behandles ved at tilsætte natriumdeoxycholat og dialyseres til opnåelse af det tilsigtede ATL virus-antigen.

De producerende celler til fremstilling af det ATL-associerede antigen og dem til fremstilling af ATL viruset og ATL virus-antigenet er ikke nødvendigvis identiske. Det er imidlertid ønskeligt, at de to ovenfor beskrevne antigener framstilles ud fra de samme producerende celler i forbindelse med den foreliggende opfindelse, da ATL virus-antigenet ifølge den foreliggende opfindelse anvendes til at fremstille et sammenlignings-prøveeksemplar ved bestemmelsen under anvendelse af det ATL-associerede antigen.

Behandlingen af de ATL antigen-producerende celler eller ATL-viruset til opnåelse af henholdsvis det ATL-associerede antigen eller ATL virus-antigenet kan foregå på en hvilken som helst måde. For eksempel kan der foretages en behandling med et overfladeaktivt middel, såsom natriumdeoxycholat,octylphenoxypolyethoxyethanol og polyoxyethylen(10)-octylphenylether. Behandlingen med et overfladeaktivt middel er beskrevet detaljeret i japansk patentpublikation nr. 62527/1984.

I det følgende vil prøvemetoden ifølge den foreliggende opfindelse blive beskrevet detaljeret.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres ved en metode valgt blandt enzymimmunassay, radioimmunassay og passiv hæmagglutinering. De generelle processer

ved disse metoder er velkendte. For eksempel kan fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved enzymimmunassay gennemføres på følgende måde.

Hele assaysystemet omfatter en fast fase, et ATL-associeret antigen, et ATL virus-antigen, en prøve, et anti-humant IgG-antistof, der skal mærkes, et enzym og et substrat. Eksempler på den faste fase er en skål med en mikrotiterplade til enzymimmunassay eller en glasperle. Forud for bestemmelsen bliver det ATL-associerede antigen opløst i en 0,15M phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning, indført i f. eks. en polystyrenskål til enzymimmunassay og henstillet natten over ved $4^{\circ}C$ for at dække overfladen af den faste fase med det ATL-associerede antigen.

Eksempler på anti-humant IgG-antistof, der skal mærkes, er gede-anti-humant IgG-antistof og monoklonalt muse-anti-humant Fc-antistof. Eksempler på enzymet er alkalisk phosphatase, glucoseoxidase, peroxidase og β-galactosidase. Forud for bestemmelsen kan det antistof, der skal mærkes, kombineres med enzymet ved anvendelse af et bindemiddel, såsom glutaraldehyd, til dannelse af en konjugat, hvorved der tilvejebringes ét af reagenserne til fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Substratet kan eventuelt vælges i afhængighed af det enzym, der skal anvendes. Når f.eks. alkalisk phosphatase vælges som enzym, kan der anvendes p-nitrophenylphosphat eller lignende substrater.

Elementerne til det totale assaysystem bortset fra prøven og ATL virus-antigenet omtalt ovenfor illustrerer foretrukne udførelsesformer for opfindelsen.

Prøven foreligger som oftest som en serumprøve vundet f.eks. fra transfusionsblod. Den foreliggende opfindelse er imidlertid ikke begrænset hertil, og enhver prøve er anvendelig uanset form eller oprindelse. Prøven kan sættes til assaysystemet som sådant. Alternativt kan den fortyndes med f.eks. normal kaninserum (NRS) til en for bestemmelsen passende koncentration.

ATL virus-antigenet kan sættes til assaysystemet som sådant, men det er ønskeligt at fortynde det til en passende koncentration med NRS. Overdreven fortynding deraf skal imidlertid undgås, da det kan føre til svingende resultater. Det er følgelig nødvendigt at bestemme det optimale fortyndingsforhold ved anvendelse af serum, der er positiv med hensyn til ATL virus-antistof. For eksempel var proteinkoncentrationen af ATL virus-antigenet fremstillet i Forsøgseksempel 1, som nedenfor vist, på 1,23 ved $OD_{280\ nm}$. I dette tilfælde er det optimalt at fortynde 16 gange med NRS. To prøver, dvs. test- og kontrolprøver, underkastes bestemmelse. Sidstnævnte fremstilles ved at sætte et ATL virus-antigen til førstnævnte. Det er imidlertid i almindelighed påkrævet at fortynde hver prøve til en passende koncentration med f.eks. NRS for at lette bestemmelsen og begrænse fejl til et minimum. I dette tilfælde skal ikke blot test- og kontrol-prøverne, men også en blindprøve omfattende alene opløsningsmidlet fremstilles og underkastes bestemmelse.

Bestemmelsen kan foregå ved de sædvanlige processer ved enzymimmunassay. Hvert af test-, sammenlignings- og blind-prøverne indføres således i en skål belagt med et ATL-associeret antigen og inkuberes deri. Et antistof mærket med et enzym, f.eks. gede-anti-humant IgG/alkaliphosphatase-konjugat, tilsættes og inkuberes deri. Et substrat, f.eks. p-nitrophenylphosphat, tilsættes og inkuberes deri, og mængden af dekomponeret substrat bestemmes med et spektrofotometer.

Til slut beregnes repressionsforholdet (%) ved anvendelse af de data A, B og C, der er opnået fra henholdsvis test-, sammenlignings- og kontrol-prøveeksemplaret.

Repressionsforhold (%) = $(A - B)/(A - C) \times 100$.

Det er muligt at bestemme ATL virus-antistoffer i en test-prøve ved at bestemme repressionsfor-

holdet (%) ved anvendelse af en pæøve indeholdende en kendt mængde ATL virus-antistoffer og optegne en kalibreringskurve for repressionsforholdet (%).

Det er endvidere muligt nøjagtigt og uden risiko for falsk positive resultater at bestemme tilstedeværelse af ATL virus-antistoffer i en prøve (testserum)baseret på det kriterium, at prøven er positiv med hensyn til ATL virus-antistof, når repressionsforholdet er 50% eller højere, mens den er negativ, når forholdet er lavere end 50%.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det muligt nøjagtigt at skelne mellem serum, der er positiv og negativ med hensyn til ATL virus-antistof.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer også et reagens, der hovedsageligt indeholder et ATL-associeret antigen og ATL virus-antigen.

Reagenset ifølge opfindelsen er direkte tilgængeligt ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som beskrevet ovenfor, med henblik på samme formål som for denne.

Reagenset ifølge opfindelsen kan anvendes ved ethvert enzymimmunassay, radioimmunassay og passiv hæmagglutinering. For eksempel kan reagenset ifølge opfindelsen i praksis anvendes ved enzymimmunassay på følgende måde. Reagenset ifølge opfindelsen foreligger i form af en kombination af et ATL-associeret antigen og et ATL virus-antigen som sådan eller et udstyr omfattende ét til fire elementer valgt vilkårligt blandt et ATL-associeret antigen og et ATL virus-antigen, en fast fase, et antistof, der skal mærkes, et enzym og et substrat. Når udstyret omfatter en fast fase, kan den faste fase være belagt med det ATL-associerede antigen. Når udstyret omfatter et antistof, der skal mærkes, og et enzym, kan disse to materialer foreligge i form af et konjugat, dvs. et mærket antistof. Det skal bemærkes, at disse tilfælde også er omfattet af opfindelsen. Det skal også bemærkes, at udstyret yderligere kan omfatte en passende puffer eller NRS for at lette bestemmelsen, uden at man derfor kommer uden for opfindelsens område.

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler.

Eksempel 1

En 0,15M phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning (pH 7,2) blev sat til 2,4 x 10^7 MT-2 celler, og blandingen blev centrifugeret for at fraskille cellerne, der derefter blev sammenpresset. 5 ml Veronalpufferopløsning (pH 7,5,μ = 0,145) indeholdende 0,2% natriumdeoxycholat blev tilsat, og den vundne blanding blev omrørt med en omrører ved 4°C i fire timer og derefter centrifugeret ved 10.000 rpm i 30 minutter. Supernatanten blev fyldt i et dialyserør, dialyseret mod en 0,15M phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning ved 4°C i to dage og derefter centrifugeret ved 10.000 rpm i 30 minutter. Den således vundne supernatant blev betegnet som en supernatant indeholdende et ATL-associeret antigen. OD_{280}-værdien af ovennævnte supernatant var 15 /ml.

Det vundne serum indeholdende det ATL-associerede antigen blev fortyndet med 0,15M phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning til opnåelse af en OD_{280}-værdi på 0,4. Portioner på 150 µl af opløsningen indførtes i polystyrenskåle til enzymimmunassay.

Hver skål blev henstillet natten over ved 4°C og blev derefter drænet og vasket med deioniseret vand. Den således fremstillede skål blev kombineret med et gede-anti-humant IgG-antistof/alkaliphosphatase-konjugat, p-nitrophenylphosphat og et ATL virus-antigen til tilvejebringelse af et reagens til enzymimmunassay. For at lette bestemmelsen forelå yderligere i et sæt NRS, en 0,9% natriumchloridopløsning og 1N NaOH.

ATL virus-antigenet blev fremstillet som følger. 3 liter af supernatanten fra et medium, hvori MT-2 celler var dyrket, blev centrifugeret ved 10.000 rpm i 30 minutter for at opsamle supernatanten, der derefter blev koncentreret og centrifugeret ved 10.000 G i to timer. ATL virus blev indsamlet som et bundfald. Bundfaldet blev derefter suspenderet grundigt i 4 ml af en 0,01M tris-

hydrochlorid-pufferopløsning (pH 7,5) indeholdende 0,15M NaCl, 0,002M EDTA og 1,1% NaN_3, og den vundne suspension blev centrifugeret ved 10.000 rpm i 30 minutter for at indsamle supernatanten som et råt viralt koncentrat. 45 ml Sucrosegraditientkoncentrationsopløsning (15 til 60 vægt%) blev fremstillet i et nitrocelluloserør, og 2 ml af det ovennævnte rå virale koncentrat blev lamineret derpå og ultracentrifugeret ved 2.000 rpm i 15 timer med en RPS-25-2-rotor (Hitachi). Derefter blev portioner på 50 dråber (ca. 2 ml) af eluenten opsamlet fra bunden af røret. ATL virus i hver fraktion blev bestemt ved enzymimmunassay, hvor humane ATLA-antistoffer anvendtes som inhibitions-antistoffer. Fraktioner, der var positive med hensyn til ATL virus, blev samlet og dialyseret mod en 0,01M tris-hydrochlorid-pufferopløsning (pH 7,5) indeholdende 0,15M NaCl, 0,002M EDTA og 0,1% NaN_3 til opnåelse af 1,15 g/ml af en ATL virus-opløsning. Efter endt dialyse blev der tilsat natriumdeoxycholat til opnåelse af en koncentration på 0,2%, og den vundne blanding blev omrørt ved $4^{\circ}C$ i 30 minutter. Derefter blev den dialyseret mod en 0,01M tris-hydrochlorid-pufferopløsning (pH 7,5) indeholdende 0,15M NaCl, 0,002M EDTA og 0,1% NaN_3 for at fjerne natriumdeoxycholat, hvorved vandtes et ATL virus-antigen. På denne måde blev der opsamlet 35 ml af ATL virus-antigenet indeholdende 1,23 af protein ved $OD_{280\ nm}$.

Eksempel 2

Gede-anti-humant IgG-antistof eller muse-anti-humant IgG (Fc)-antistof blev opløst i en 0,05M phosphatpufferopløsning (pH 7,5) til opnåelse af en proteinkoncentration på 1 mg/ml. Til 10 µl af den således vundne opløsning blev der successivt sat 10 µl ^{125}I-Na på 1 mCi og 10 µl af en opløsning fremstillet ved at sætte 1,5 mg/ml chloramin T til den foregående phosphatpufferopløsning, og den vundne blanding blev omrørt i 30 sekunder. Deref-

ter blev der for at stoppe reaktionen tilsat 100 µl af en opløsning fremstillet ved at opløse 2 mg/ml af natriumhydromethasulfat i den foregående phosphatpufferopløsning. 100 µl Opløsning, der var fremstillet ved at opløse 10 mg/ml af kaliumiodid i den foregående phosphatpufferopløsning, blev sat til reaktionsvæsken, og blandingen blev straks underkastet gelfiltrering med Sephadex G-50 for at fraskille det ^{125}I-mærkede stof fra ^{125}I. Det ^{125}I-mærkede stof udviste en specifik radioaktivitet på omtrent 5 til 20 µCi/µg.

Dette ^{125}I-mærkede stof blev kombineret med en skål og et ATL virus-antigen begge fremstillet på samme måde som beskrevet i Eksempel 1, hvorved vandtes et sæt, der kunne anvendes ved radioimmunassay.

Eksempel 3

Fåreblod blev centrifugeret ved 2.000 rpm i 10 minutter fem gange i et rør under anvendelse af en fysiologisk saltopløsning til vask af erythrocyter deri. Til erythrocyterne blev der sat en 0,15M phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning (pH 7,5) til opnåelse af en koncentration på 5%. En glutaraldehydopløsning indstillet på en koncentration på 2,5% med den foregående phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning blev sat til den ovennævnte erythrocytsuspension i en mængde på en femtedel volumen. Den vundne blanding fik lov at reagere ved stuetemperatur under omrøring i omtrent fem timer for at fiksere erythrocyterne. Derefter blev opløsningen centrifugeret til opnåelse af fikserede erythrocyter, der derefter blev vasket med en fysiologisk saltopløsning flere gange under anvendelse af en centrifuge. De fikserede erythrocyter blev derefter indstillet til en 5% suspension med den ovennævnte phosphatpufferopløsning, og samme mængde af en garvesyreopløsning indstillet på en koncentration på 5 mg/dl med ovennævnte phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning blev tilsat efterfulgt af om-

røring i 30 minutter. Den således vundne opløsning blev centrifugeret til opnåelse af fikserede garvesyre-behandlede erythrocyter, der derefter blev centrifugeret yderligere flere gange under anvendelse af en fysiologisk saltopløsning. Den ovennævnte phosphatpufferopløsning blev sat til de vundne, fikserede, garvesyre-behandlede erythrocyter til opnåelse af en 5% erythrocyt-suspension.

Den således vundne erythrocyt-suspension blev blandet med samme mængde af en opløsning, der var fremstillet ved at fortynde supernatanten indeholdende et ATL-associeret antigen, som fremstillet i Eksempel 1, med den ovennævnte phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning til opnåelse af en proteinkoncentration på omtrent 5 mg/ml, og blandingen blev sensibiliseret ved omrøring ved stuetemperatur i 60 minutter. Den vundne opløsning blev centrifugeret til opnåelse af sensibiliserede erythrocyter, der derefter blev vasket med en fysiologisk saltopløsning ved centrifugering flere gange. Til de således vundne sensibiliserede erythrocyter blev der sat en phosphatpuffer/fysiologisk saltopløsning indeholdende 2% NRS til opnåelse af en 7% suspension. De sensibiliserede erythrocyter blev kombineret med ATL virus-antigenet, fremstillet som i Eksempel 1, til opnåelse af et reagens til passiv hæmagglutinering.

Eksempel 4

En serum-prøve blev bedømt som positiv eller negativ med hensyn til ATL virus-antistof ved anvendelse af reagenser i et sæt fremstillet som i Eksempel 1.

Portioner på 100 µl af NRS og en ATL virus-antigenopløsning, der var fremstillet ved 16 ganges fortynding af ATL virus-antigenet vist i Eksempel 1 med NRS, indførtes uafhængigt i testrør. Af serum-prøven blev 20 µl indført i hvert rør. Førstnævnte blev refereret til som test-prøven, mens sidstnævnte blev refereret til som en sammenlignings-prøve.

Separat blev NRS som sådant benyttet til opnåelse af en blindprøve.

Hver prøve blev omrørt grundigt og henstillet ved 37°C i én time eller ved 4°C natten over. Derefter indførtes 100 µl af hver prøve i en belagt skål som vist i Eksempel 1 og blev inkuberet ved 37°C i 60 minutter. Efter endt inkubation blev der tilsat en 0,9% natriumchloridopløsning for at udvaske ikke-reagerede materialer, og 100 µl af en gede-anti-human IgG/alkali-phosphatase-konjugatopløsning blev sat til reaktionsblandingen. Efter reinkubation ved 37°C i 60 minutter blev der tilsat en 0,9% natriumchloridopløsning for at udvaske ikke-reagerede materialer, og 100 µl p-nitrophenyl-phosphatopløsning blev sat til reaktionsblandingen. Blandingen blev omsat ved 37°C i 30 minutter, og derefter blev der tilsat 100 µl 1N NaOH for at stoppe reaktionen. Til slut blev den optiske tæthed af hver prøve bestemt ved 405 nm. Den optiske tæthed af test-prøven blev refereret til som A, tætheden af sammenlignings-prøven som B og tætheden af blind-prøven som C. Repressionsforholdet (%) blev beregnet ud fra A, B og C efter følgende ligning:

$$\text{Repressionsforhold (\%)} = (A - B)/(A - C) \times 100.$$

Når repressionsforholdet er 50% eller højere, er serumprøven positiv med hensyn til ATL virus-antistoffer, mens den er negativ, når repressionsforholdet er lavere end 50%.

For yderligere at illustrere virkningen af den foreliggende opfindelse angives følgende forsøgseksempler.

Forsøgseksempel 1

Som vist i Tabel I blev der fremstillet serum-prøver Nr. 1 til 11. Det var bekræftet, at Nr. 1 til 5 og Nr. 6 til 11 var henholdsvis positive og negative med hensyn til ATL virus-antistoffer ved immunofluorescens-antistofassay. Blandt disse negative serum'er

var nr. 6 til 8 normale humane serum'er (NHS), mens nr. 9 til 11 stammede fra patienter med systemisk lupus erythematodes.

Hver serum-prøve blev underkastet bestemmelse på samme måde som beskrevet i Eksempel 4, og repressionsforholdet (%) blev beregnet ud fra A, B og C for at vurdere, om prøven var positiv eller negativ med hensyn til ATL virus-antistoffer på den i Eksempel 4 beskrevne måde. Tabel I viser resultatet. Tabel I lader formode, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan give en utvetydig og nøjagtig bestemmelse af ATL virus-antistoffer. Det er særligt bemærkelsesværdigt, at serum-prøverne nr. 9 til 11, der oprindeligt er negative med hensyn til ATL virus-antistoffer, fortolkes som falsk positive ved den konventionelle metode, hvor bedømmelsen er baseret på alene A, mens fremgangsmåden ifølge opfindelsen baseret på repressionsforholdet giver korrekt bedømmelse og klart skelner dem fra sande positive, som vist i Tabel I. Dette er en karakteristisk fordel ved den foreliggende opfindelse.

Tabel I

Serum-prøve-eksemplar nr.	IF-bedømmelse *	Data			Repressions-forhold (%)	Bedømmelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
		A	B	C		
1	+	1,291	0,295	0,019	78,3	Positiv
2	+	0,296	0,022	0,019	98,9	"
3	+	0,142	0,046	0,019	78,0	"
4	+	1,649	0,124	0,021	93,7	"
5	+	0,612	0,043	0,021	96,3	"
6	-	0,031	0,031	0,021	0	Negativ
7	-	0,033	0,031	0,021	I6,7	"
8	-	0,032	0,036	0,021	0	"
9	-	0,132	0,166	0,019	0	Positiv
10	-	0,115	0,113	0,019	2,1	"
11	-	0,142	0,136	0,019	4,9	"

* IF- bedømmelse refererer til en bedømmelse ved immunofluorescens-antistofassay, og + og - repræsenterer henholdsvis positiv og negativ med hensyn til ATL virus-antistoffer ved ovennævnte bedømmelse.

Forsøgseksempel 2

Dette eksempel illustrerer fremgangsmåden til bestemmelse af det optimale fortyndingsforhold for et ATL virus-antigen.

ATL virus-antigenet vundet i Forsøgseksempel 1 blev fortyndet 2^n gange (dvs. 2 til 128 gange) med 100 µl af NRS. Separat blev der fremstillet NRS som sådant. Til hver prøve blev der sat 20 µl humant serum, der var positivt med hensyn til ATL virus-antistoffer, og blandingen blev inkuberet ved 37°C i én time eller ved 4°C natten over. Derefter indførtes 100 µl af reaktionsblandingen i en belægningsskål fra reagenssættet som

vist i Eksempel 1, og OD-værdien for sammenlignings-prøven blev bestemt, dvs. B, blev bestemt ved metoden beskrevet i Eksempel 4. For hvert NRS anvendt til fortynding blev C bestemt ved metoden vist i Eksempel 4.

Tabel II viser resultatet. NRS i fortyndingsforhold-kolonnen i Tabel II refererer til normalt kaninserum anvendt som kontrol, der er negativ med hensyn til ATL virus-antistoffer. Tabel II viser, at repressionen som følge af ATL virus-antigenet når ligevægt og giver stabile data, når der er fortyndet 16 gange.

Tabel II

Fortyndings-forhold	Data B	Data C
NRS	0,437	0,019
1 : 128	0,075	0,018
1 : 64	0,054	0,019
1 : 32	0,042	0,019
1 : 16	0,035	0,018
1 : 8	0,038	0,020
1 : 4	0,035	0,019
1 : 2	0,035	0,018

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til eliminering af falske positive resultater ved bestemmelse af et ATL virus-antistof i en prøve ved en metode, der benytter et ATL-associeret antigen og er valgt blandt enzymimmunassay, radioimmunassay og passiv hæmagglutinering, kendetegnet ved, at en prøve, til hvilken der er sat et ATL virus-antigen, anvendes som sammenlignings-prøve.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det ATL-associerede antigen stammer fra MT-2 celler.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at ATL virus-antigenet stammer fra MT-2 celler.

4. Reagens til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1-3, kendetegnet ved, at det omfatter et ATL virus-antigen.

5. Reagens ifølge krav 4, kendetegnet ved, at det ATL-associerede antigen stammer fra MT-2 celler.

6. Reagens ifølge krav 4, kendetegnet ved, at ATL virus-antigenet stammer fra MT-2 celler.