



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

242 621

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 06 83
(21) PV 4923-83

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/76

(40) Zveřejněno 31 08 85

(45) Vydáno 01 05 88

(75)
Autor vynálezu

PODROUŽEK PETR MUDr.;
MANČAL PETR RNDr.;
KRABEC ZDENĚK RNDr.;
PRESL JIŘÍ MUDr. DrSc.;
POKORNÝ MILOŠ RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob stanovení lidského choriového gonadotropinu
v preparátech imunoglobulinů připravených z náhradních
surovin

Stanovení spočívá v tom, že preparát imunoglobulinu se ředí pufrém o pH 6,5 až 8,0 s přídavkem sérového albuminu, například hovězího albuminu v množství 0,005 až 1 %, načež se imunoenzymatickou metodou stanoví obsah lidského choriového gonadotropinu. Preparát imunoglobulinu lze ředit pufrém o pH 6,5 až 8,0 s přídavkem sérového albuminu a chloridu sodného maximálně do koncentrace 0,3 M. Výhodné je používat fosfátový pufr. Dále je výhodné použít imunoenzymatické metody, při níž se provádí adsorbce jedné z imunoreagencí na pevný nosič.

Vynález se týká stanovení lidského choriového gonadotropinu v purifikovaných i nepurifikovaných preparátech imunoglobulinů připravených z náhradních surovin - např. erymasy, poporodních a potratových sér užitím metody enzymimunoanalýzy. Uvedené výchozí suroviny obsahují lidský choriový gonadotropin /hCG/, který při výrobě přechází ze suroviny do konečného preparátu. Přítomnost hCG v konečném preparátu je nežádoucí, neboť jde o biologicky účinnou látku - hormon - za fyziologických okolností produkovanou lidskou placentou. Tento hormon v konečném preparátu zanášen do organismu příjemce-pacienta-což je velmi nežádoucí, přestože se jedná o poměrně malé dávky. Pacientem může být i dítě a jakékoli vnější hormonální vlivy jsou nežádoucí. Aby bylo možno vyvinout účinný způsob odstraňování hCG z preparátů imunoglobulinů při jejich výrobě, je nutno mít k dispozici spolehlivou metodu, kterou lze hormon v preparátech kvantitativně stanovit.

V současné době jsou k dispozici pouze testy na principu hemaglutinace /Wide, L.: Lancet, ii, 1969, s.863/ či latexové aglutinace /Olson, Adduci, : Amer.J.clin.Pathol., 39, 1963, s.589/. Tyto testy jsou málo citlivé, pro stanovení hCG v proteinovém mediu, jako jsou např. preparáty imunoglobulinů. Jsou značně ovlivňovány složením stanovovaného preparátu a výsledky jsou neobjektivní.

Jako vyhovující se ukazuje stanovení hCG v preparátech imunoglobulinů radioimunologickou metodou /RIA//Yalow, Berson, : Nature/Lond./, 184, 1959, s.1648/. Soupravy pro toto stanovení jsou však dostupné pouze z dovozu z devizové oblasti. Metoda má i řadu nevýhod, nutnost budování speciálních izotopových laboratoří, pro vyhodnocování výsledků je třeba nákladných počítačů impulsů,

komerční soupravy mají krátkou dobu použitelnosti - řádově týdnů, práci je nutno provádět dle přísných bezpečnostních předpisů a použité radioaktivní reagentie skladovat do inaktivace na místech k tomu určených. Navíc práce s radioizotopy představuje zdravotní riziko. Náklady na jedno vyšetření jsou poměrně vysoké.

Uvedené nedostatky odstraňuje postup dle vynálezu, který spočívá v tom, že preparát imunoglobulinu se ředí pufrům o pH 6,5 až 8,0 s přidavkem sérového albuminu, například hovězího albuminu v množství 0,005 až 1 %, načež se imunoenzymatickou metodou stanoví obsah lidského choriového gonadotropinu.

Preparát imunoglobulinu lze ředit pufrům o pH 6,5 až 8,0 s přidavkem sérového albuminu a chloridu sodného maximálně do koncentrace 0,3M. Výhodné je používat fosfátový pufr.

Dále je výhodné použít imunoenzymatické metody, při níž se provádí adsorbce jedné z imunoreagencií na pevný nosič.

Příklad stanovení: Imunoenzymatickou metodou byl stanovován lidský choriový gonadotropin v preparátech imunoglobulinů výrobce ÚSOL o.p. Praha - šarže č. 2/83, 4/83, 5/83, 8/83, 12/83 ve formě 16% roztoku. Dále byl stanovován obsah hCG v lyofilizovaných preparátech imunoglobulinů výrobce Imuna Šarišské Michelany, šarže 70/72, 26/77, ze kterých byly připraveny též 16% roztoky. Stanovení bylo provedeno na mikrotitračních destičkách typu P výrobce KOH-I-NOOR Dalečín.

Postup stanovení:

- 1/ Lyofilizovaná protilátka proti hCG byla rozpuštěna v pufru a do každé jamky destičky bylo aplikováno 0,2 ml roztoku protilátky. Za 20 hodin při teplotě +4 °C /inkubace do druhého dne v lednici/ je navázání protilátky na stěnu jamek ukončeno. Roztok ze všech jamek byl odstráněn do výlevky a každá jamka destičky byla pufrům 3x promyta.
- 2/ Do celkem 2xdevíti jamek /vždy ve dvojicích/ byly do jamek vždy v objemu 0,1 ml aplikovány standardy hCG, do zbývajících jamek naředěné preparáty imunoglobulinů /ředění je prováděno geo-

metrickou řadou 2^n 0,01 M fosfátovým pufrém 0,14 M NaCl 0,01% merthiolát 0,1 % hovězí sérový albumin pH 7,5 /lze použít i jiných vhodných pufrů/ vždy v objemu 0,1 ml do každé jamky. Ředění vzorků je prováděno proto, aby bylo možno výsledné hodnoty absorbancí přepočítávat proti kalibrační křivce /z více bodů/. Destička se standardy a vzorky se poté inkubovala 2,5 hod v termostatu při 37 °C.

- 3/ Obsah jamek destičky byl odstříknut do výlevky a jednotlivé jamky 2x po sobě promyty pufrém. Do každé jamky bylo aplikováno 0,1 ml enzymem značené druhé protilátky proti hCG /jako enzym je použita křenová peroxidáza/. Destička byla inkubována 1,5 hod v termostatu při 37 °C.
- 4/ Obsah jamek destičky byl odstříknut do výlevky a destička 4x po sobě promyta pufrém. Do každé jamky bylo aplikováno 0,1 ml roztoku substrátu s chromogenem. Destička byla inkubována 40 minut v termostatu při 37 °C. Nastává rozklad substrátu enzymem, který se projevuje změnou barvy chromogenu.
- 5/ Reakce ve všech jamkách byla zastavena přidáním 0,05 ml 4 N H_2SO_4 .

Výsledné zbarvení obsahu jamek se odečte na fotometru. Čím vyšší byla koncentrace hCG ve vyšetřovaném vzorku, tím intenzivněji proběhla reakce a tím intenzivnější je zbarvení chromogenu - reakce je tedy kvantitativní. Zabarvení lze odečítat fotometricky - jako absorbanci. Pokud vyšetřovaný vzorek neobsahoval hCG nedochází k žádné vazbě na prvou vrstvu, následující vrstva se nemá též možnost vázat, ve zkumavce po propláchnutí tedy není přítomen enzym, nedochází k rozkladu substrátu a změně barvy chromogenu.

Pokud se k neznámým vyšetřovaným vzorkům přiřadí i několik vzorků o známé koncentraci hCG /tzv. standardních/, lze podle kalibrační závislosti - vynesení známých koncentrací standardu a jim příslušejících absorbancí na dvě na sebe kolmé osy sestavit kalibrační křivku. Ze zjištěné absorbance vzorků, při nichž byly aplikovány standardy hCG se sestaví kalibrační křivka, z níž se na základě zjištěné absorbance vzorků ředěných imunoglobulinu odečte koncentrace hCG. K vynesení křivky a výpočtu koncentrace

hCG lze též použít počítáče. Ke stanovení lze použít namísto mikrotitračních destiček, kde každá jamka destičky je jakoby malou zkumavkou, zkumavky.

Výsledky /dle přepočtu mikropočítáče Tesla PMD-85/:

I. preparáty imunoglobulinů ÚSOL o.p. Praha

šarže č.	jednotkový obsah hCG /IU/ml/ v 16% roztoku	chyba stanovení v % /variační koef./
2/83	20,557	18,59
4/83	27,711	25,49
5/83	24,982	9,37
8/83	40,899	20,43
12/83	36,853	9,857

II. preparáty imunoglobulinů Imuna Šarišské Michalany

Ve stanovených šaržích č. 70/72 a 26/77 se nepodařilo prokázat lidský choriový gonadotropin. Dotazem u výrobce bylo poté zjištěno, že tyto šarže nebyly připraveny z náhradních surovin, ale z krve zdravých netěhotných dárců /tedy hCG neobsahujících surovin/.

Opakovanými pokusy bylo prokázáno, že imunoenzymatickou metodou lze provádět stanovení lidského choriového gonadotropinu v preparátech imunoglobulinů připravených z druhotných surovin. Způsob stanovení podle vynálezu je 200x citlivější než hemaglutinační či latex-aglutinanční testy ani netrpí nevýhodami radioimunologických testů.

Test lze v provedení na zkumavkách užít v každé laboratoři vybavené běžným spektrofotometrem, k provedení je třeba jen pipet vhodných objemů, běžného termostatu a domácí suroviny. Není omezen bezpečnostními předpisy a náklady na jedno stanovení jsou nízké. Využití imunoenzymatické metody pro stanovení hCG přináší možnost citlivé a přesné kvantifikace hCG v preparátech imunoglobulinů a může významně přispět k péči o zdraví obyvatelstva.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Ž Ě

242 621

1. Způsob stanovení lidského choriového gonadotropinu v preparátech imunoglobulinů připravených z náhradních surovin, vyznačující se tím, že se preparát imunoglobulinu ředí puforem o pH 6,5 až 8,0 s přídavkem sérového albuminu, například hovězího albuminu v množství 0,005 až 1,00 % hmot., načež se imunoenzymatickou metodou stanoví obsah lidského choriového gonadotropinu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že preparát imunoglobulinu se ředí puforem o pH 6,5 až 8,0 s přídavkem sérového albuminu a chloridu sodného maximálně do koncentrace 0,3 M.
3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se preparát imunoglobulinu ředí fosfátovým puforem.
4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se lidský choriový gonadotropin stanoví imunoenzymatickou metodou, při níž se provádí adsorbce jedné z imunoreagencií na pevný nosič.