



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) **NR. 153910**

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ G 01 N 33/543

(21) Patentsøknad nr. **801830**
(22) Inngivelsesdag 18.06.80
(24) Løpedag 18.06.80
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **GEORGE R. SIBER,**
37 Corey Road,
Brookline, MA 02146,
USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 22.12.80
(44) Utlegningsdag 03.03.86
(72) Oppfinner Søkeren.

(74) Fullmektig A/S Oslo Patentkontor
Dr.ing. K.O. Berg, Oslo.

(30) Prioritet begjært 19.06.79, USA, nr. 50269.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **DIREKTE AGGLUTINERINGSPRØVE FOR
PÅVISNING AV ANTIGENER I KROPPS-
VÆSKER.**

(57) **Sammendrag** Analysemetode av type partikkel-agglutineringsanalyse som anvender en globulinfraksjon av Haemophilus Influenzae type b antiserum og gir følsomhet ned til 0,2 nanogram polyribosefosfat pr. millimeter. De sensibiliserte partikler vaskes. Ved analysen kombineres kroppsvæsken som skal undersøkes (serum eller plasma) med et flytende reagens bestående av en bærer belagt med hestedyrs antiserum og ikke immunt animalsk serum fra samme dyreart oppslemmet i et fysiologisk fordragelig puffersystem og dertil et puffersystem inneholdende et polyanion som kan nedsette virkningen av varmelabile bestanddeler i prøven og et reduksjonsmiddel som kan minske antiglobulinantistoffene i prøven. Blandingen inkuberes ca. 45 min. eller mer. Agglutineringsgraden bestemmes så visuelt. Polyanionet velges fra gruppen natriumpolyanetolsulfonat, dextransulfonat, karagenin, heparin o.l. Reduksjonsmiddelet velges fra gruppen 2-merkaptoetanol, ditiotreititol, glutation, cystein o.l.

(56) Antorte publikasjoner I.I. Duffy, Vaccine preparation techniques, 1980, Noyor Data Corporation, U.S.A., p. 270-278.

Foreliggende oppfinnelse vedrører direkte agglutineringsprøve for påvisning av antigener i kroppsvæsker, som angitt i krav 1's ingress.

Påvisning av mikrobielle antigener i kroppsvæsker kan være nyttig for rask diagnose av et økende antall infeksjoner. Et vesentlig problem er imidlertid at de i øyeblikket tilgjengelige fremgangsmåter ikke er tilstrekkelig følsomme (immuno-diffusjon, CIE) og kan således ikke anvendes for å indikere tilstedeværelse av antigener hos en vesentlig andel infiserte pasienter eller også er de altfor tidkrevende for rask diagnose (RIA, ELISA). I visse tilfeller dannes antigen/antistoffkomplekset langsomt og/eller også er de dannede partiklene altfor små til å kunne iakttas med sikkerhet. Påviseligheten er blitt forbedret ved anvendelse av agglutineringsprøver som benytter partikler som bærere hvor antigenet eller antistoffmolekylene er absorbert eller bundet på overflaten av disse.

Slike agglutineringsprøver kan utføres ifølge den indirekte metoden, hvorved den kliniske prøven blandes med antistoffer ved en spesifisert fortykning og etter en passende inkuberingsperiode kan et indikatorsystem bestående av et kompleks av antigenet bundet til en partikkelformig bærer tilsettes blandingen. Om antigenet er tilstede i den kliniske prøven er antistoffet ikke tilgjengelig for reaksjon med komplekset av antigen/bærer og noen agglutineringsreaksjon forekommer ikke og således er mangel på agglutineringsreaksjon en positiv prøve på antigenet. Om antigenet ikke er tilstede i den kliniske prøven reagerer derimot antistoffet med komplekset av antigen og bærer og agglutineringsreaksjon av indikatorprøven oppstår. Den teori som slike agglutineringsprøver bygger på er velkjent innenfor teknikken og belyses nærmere i de amerikanske patentskrifter 3.171.783, 3.775.536, 3.873.683, 3.879.262, 4.003.988 og 4.045.384.

153910

2

Man har lenge hatt den oppfatning at den eneste virkelige meningsfulle diagnostiske metoden med hensyn til infeksjonssykdommer er tidlig og rask påvisning av antigener som har tilknytning til det infiserende middel, hvormed man får mulighet for umiddelbar effektiv behandling.

Ifølge foreliggende oppfinnelse har man utviklet en ytterst følsom agglutineringsstest for påvisning av antigener så som proteiner og polysakkarider fra ulikeartede mikroorganismer så som bakterier, protozoer og sopper i lave konsentrasjoner i kroppsvæsker. En prøve ifølge foreliggende oppfinnelse beskrives nedenfor, hvilken rutinemessig kan anvendes for å påvise så lite som 0,2 nanogram pr. milliliter av de kapsulære polysakkarider som er tilknyttet patogene bakterier. Dette innebærer en følsomhet som er 25 - 250 ganger større enn følsomheten for de allment anvendte motstrøms immunoelektroforesemetodene (CIE) og en følsomhet som minst tilsvarende den for radioimmunoanalyse (RIA). Selv om CIE er rask krever denne metoden dessuten trenet laboratoriepersonnel og moderne dyre reagenser og apparater og gir en begrenset følsomhet tilsvarende 10 - 50 nanogram pr. milliliter for de fleste bakteriepolysakkarider. Selv om lavere konsentrasjoner av antigen ofte forekommer i kroppsvæsker forekommer ofte falske negative CIE-prøver hos pasienter med kulturdokumenterte bakterielle infeksjoner. RIA er på den annen side 10 - 100 ganger mer følsom enn CIE, men er meget tidkrevende og dyr.

Før foreliggende oppfinnelse var en generell anvendelse av partikkelagglutineringsprøver begrenset selv om de var ytterst enkle og billige på grunn av den lave følsomhetsgraden til disse prøvene ved små konsentrasjoner av antigen og dårlig spesifisitet som viste seg i form av ikke-spesifikk agglutinerings, spesielt med serumsprøver. Ved tillempling av denne metoden ifølge foreliggende oppfinnelse hvilken beskrives nedenfor, oppnåes en følsomhet med størrelsesorden

0,2 ng/ml og frekvens av ikke-spesifikk agglutinerings med humansera reduseres til 2 % eller mindre. Videre har nøyaktig utvalg og tilberedning av antiserum gitt en prøve som utmerker seg ved enhetlig følsomhet, god stabilitet og spesifisitet.

Begrenset følsomhet er det vesentlige problem ved tidligere kjente metoder for mikrobiell antigenpåvisning. Som en følge herav kan bakterielle antigener ikke påvises hos samtlige pasienter med dokumenterte infeksjoner. Prøver har imidlertid vist at 7 - 22 % av pasienter med haemophilus influenzae type b (H.i.b.) meningitis, 38 % med H.i.b. epiglottitis, 20 - 39 % med bakteriell pneumokokkisk lungebetennelse og 50 - 90 % med ikke-bakteriell pneumokokkisk lungebetennelse ikke har påviselig antigen i serum eller cerebrospinalvæske ved prøvning med tilgjengelige analysemetoder basert på motstrøms immunoelektroforese eller partikkelagglutinerings. En radioimmunanalysemetode hvormed man kan påvise 0,5 ng/ml eller derunder, muliggjør imidlertid diagnose av samtlige tilfeller av H.i.b. meningitis når de ankommer til legen. Prøveresultatene viser også at konsentrasjonen av antigen hos 37 % av pasientene var mindre enn 10 ng/ml og således under følsomhetsgrensen for de fleste tilgjengelige fremgangsmåter basert på motstrømsimmunoelektroforese.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det utviklet en analysemetode som er særpreget ved det som er angitt i kravets karakteriserende del.

a. Sensitivitet

Valg av antiserum påvirker markant analysens følsomhet. Seks antisera fremstilt i tre dyrearter gir partikler med følsomheter varierende fra 0,2 nanogram til mer enn 1000 nanogram polyribosefosfat (PRP) pr. milliliter. Den funksjonelle kvaliteten til de spesifikke antistoffene samt deres konsentrasjon er av betydning. Det antiserum som gir de mest følsomme partikler har ikke den høyeste antistoffkonsentrasjon ved bestemmelse med radioantigenbindende analyse.

153910

4

Seks antisera mot hel Haemophilus Influenzae type b ble fremstilt i fire kaniner, et esel og en hest ifølge den immuniseringsplan som beskrives av H.E. Alexander et al i Journal of Immunology 54: 207 - 211, 1946.

Uttrykket "partikulær" i foreliggende sammenheng vedrører partikler som er inerte og nøytrale overfor de andre komponenter og som kan absorbere antisera på en irreversibel måte. Slike partikler kan være perler av glass, polybutadien, polystyren, polybutadien-styren etc. med en midlere partikkelstørrelse fra 0,15 til 0,9 μm . Fortrinnsvis sensitiviseres polystyrenlatex partikler med en enhetlig diameter på ca. 0,81 μm i form av en suspensjon inneholdende 10 % vekt/volum destillert vann med ovennevnte antisera på følgende måte:

De hele antisera som oppnås fra esel og kanin fortynnes hver 1/500 og helt hesteantiserum 1/200 i standardisert glycinbufret saltløsning (0,1 M glycin, 0,9 % natriumklorid, pH 8,2). Antistoffer absorberes på latexpartikler ved tilsetning av en del 10-prosentig latex suspensjon på 80 deler fortynnet antiserum og inkuberes ved romtemperatur i en time. Fritt antiserum dekanteres etter sentrifugering i 10 minutter ved 12.000 g. Latex pellets suspenderes i glycin-bufret saltløsning med en liten mengde protein, nemlig 0,1 % humant serumalbumin eller 0,1 % serum fra esel, kanin eller hest ved forskjellige tilfeller for å gi en 0,125-prosentig latex suspensjon hvilken på nytt sentrifugeres og suspenderes i glycinbufret saltløsning. Fetalt kalveserium, som ifølge radioimmunoanalyse viste seg ikke å ha noen anti-PRP-antistoffer, anvendes som fortynningsmiddel for standardiserte løsninger av PRP-antigen.

Agglutineringsutførelse ved tilsetning av 0,05 deler væske inneholdende antigen til 0,01 ml sensitivisert latexløsning på en serologisk plate med keramiske ringer. Platen roteres (180 omdreining pr. minutt) i et fuktighetskammer ved romtemperatur og undersøkes med hensyn til agglutineringsgrad etter 45 minutter. Agglutineringsgraden graderes 4⁺ når aggluti-

neringsblandingen klarer og grovklumper av latexpartikler iakttas, 3⁺ når blandingen forblir uklar, men grove klumper iakttas, 2⁺ når blandingen forblir uklar, men granularitet lett iakttas og 1⁺ når blandingen forblir uklar, men bare minimal granularitet iakttas. Agglutineringsom er lik med 2⁺ eller større anses positiv. De sammenlignende sensitivitetene angis nedenfor i tabell 1.

TABELL 1

Sensitivitet ved LPA-analyse med seks antisera med hensyn på Haemophilis Influenzae type b

Serum	Anti-PRP-antistoff ¹ i helserum (µg Ab protein/ml)	Anti-PRP-antistoff ¹ absorbert på latexpartikler (µg Ab protein/ml LP)	Sensitivitet ² for LPA (ng PRP/ ml)
Esel	11.200	3,40	0,2
Kanin 1	96.000	7,84	1,0
2	68.000	7,20	1,0
3	45.000	6,56	5,0
4	10.300	1,95	10,0
Hest	3.100	1,84	1000,0

¹Bestemt ifølge radioantigenbindende analyse

²Laveste konsentrasjon av PRP-5 i fetalt kalveserum som gir agglutineringsom av 2⁺ eller større.

Tabell 1 viser klart at kvaliteten av det antiserum som anvendes for å sensibilisere latexpartiklene er kritisk for sensitiviteten til latexpartikkelagglutineringsprøven for påvisning av PRP-antigen. Av resultatene i tabell 1 fremgår klart at sensitiviteten ikke bare kan forutsies på basis av konsentrasjonen til PRP i antiserum bestemt ifølge radioantigenbindende analyse. Et eselantiserum som bare inne-

holdt 12 % mer antistoff enn i forhold til innholdet i det beste kaninantiserum, ga en 5 ganger mer sensitiv latexpartikkelblanding. Denne forskjell med hensyn på sensibilitet kunne ikke forklares ved mer effektiv belegning av latexpartiklene med eselantistoffer, mens latexpartikler belagt med kaninantiserum hadde 2,3 ganger mer absorbentantistoff. Agglutineringsaktiviteten for esel, og kaninantiserum for røde blodceller belagt med PRP fra får var lik tross den meget høye konsentrasjon av PRP-bindende aktivitet i kaninantiserum.

Bestemmelse av assosiasjonshastigheter viser at eselantistoffer kombineres meget raskere med PRP-antigen enn antistoffer fra kanin. Assosieringshalvtiden er 20 minutter for eselantistoffer og mer enn 60 minutter for kaninantistoffer. Grunnen til denne forskjell med hensyn til assosieringshastighet er ikke kjent.

Dissosiasjonshastigheten for komplekser av antigen/antistoff i nærvær av overskudd av antigen er et mål for bindingstettheten eller affiniteten for antistoffet. Kaninantistoff dissosierer langsommere fra polyribosefosfat enn eselantistoffer og har derfor en større affinitet til antigenet. Dette resultatet støtter hypotesen at kombinasjonshastigheten for antigen og antistoff er mer signifikant ved agglutineringsfremgangsmåter enn styrken til reaksjonen mellom antigen og antistoff.

b. Anvendelse av makroglobulinfraksjon for å belegge LP
Molekylsikt-kromatografi av forskjellige animalske antisera til bakterielle polysakkarider har vist at majoriteten av antipolysakkaridantistoffene hos hestedyr (esel, hest) gjenfinnes i makroglobulinklassen som elueres i void volumet fra denne kolonnen. I motsetning dertil gjenfinnes majoriteten av kaninantistoffer i klassen IgG som elueres senere. Som det fremgår av tabell 2 kan anvendelse av makroglobulinfraksjonen fra esel- eller hesteantiserum ved en konsentrasjon på 50 µg protein/ml for sensibilisering av latexpar-

tiklene markant forbedre sensitiviteten til relativt svake antisera fra hestedyr. Sensitiviteten til de beste antisera forbedres ikke ytterligere ved denne modifikasjon selv om agglutineringsreaksjonens klarhet generelt er bedre med void volumfraksjonen. Anvendelse av fraksjonen IgG i kanin- sera gir ikke sammenlignbare forbedringer med hensyn til sensitivitet eller agglutineringsklarhet.

TABELL 2

Sammenligning av sensitiviteter for latexpartikler belagt med helt serum eller makroglobulinfraksjoner i antisera fra hestedyr overfor bakterielle polysakkarider.

Dyr	Antiserum mot	Sensitivitet ^x for LP belagt med helt serum (1/500 utspedning)	Sensitivitet for LP belagt med makroglobulinfraksjon (50 µg protein/ml)
Esel-F	H. influenzae type b	1 ng/ml	0,2 ng/ml
Esel-132	H. influenzae type b	0,2 ng/ml	0,2 ng/ml
Esel-W.J.	H. influenzae type b	2 ng/ml	0,5 ng/ml
Esel-Y	Neisseria meningitidis gruppe Y	1 ng/ml	0,2 ng/ml
Hest-49	N. meningitidis gruppe A	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml
Hest-46	N. meningitidis gruppe B	>10.000 ng/ml	2 ng/ml

^xDen laveste konsentrasjon av antigen som gir 2⁺-agglutineringsring eller derover angis.

c. Vasking av belagt LP

For å bevirke ytterligere forbedring av sensitiviteten til eselantisera sammenlignes de antistoffbelagte latexpartikl-

153910

8

ene belagt med forskjellige fortynninger av eselantiserum i glycinpuffret saltløsning, i uvasket tilstand og etter 1, 2 og 3 vask med glycinbuffret saltløsning inneholdende 1/1000 deler fetalt kalveserum og resultatene angis i tabell 3.

TABELL 3

Virkning av fortynning av antiserum og vask av latexpartikler på sensitiviteten ved latexpartikkelagglutineringsprøve for polyribosefosfat.

Utspedning av eselantiserum som anvendes for sensitivering av latexpartikler	Minste påviste konsentrasjon av PRP ^x (ng/ml)			
	Uvasket	Vasket x 1	Vasket x 2	Vasket x 3
1/10	200	>1000	>1000	>1000
1/100	50	0,5	0,5	0,5
1/500	2	0,2	0,2	0,2
1/1000	0,5	0,2	0,2	0,2
1/2000	0,2	0,2	0,2	0,2
1/5000	>1000	>1000	>1000	>1000

^x₂⁺-agglutineringsprøve eller derover ble ansett for å være et positivt resultat.

Som det fremgår av de i tabell 3 angitte resultater er lave fortynninger av antiserum insensitive. Med fortynninger på 1/500 og derover oppnås maksimal sensitivitet forutsatt at latexpartiklene er vasket. Uvaskete latexpartikler oppnår maksimal sensitivitet med bare et snevert intervall av fortynninger. To vask ga maksimal sensitivitet, mens tre vask kan resultere i redusert sensitivitet.

Sensitiviserte latexpartikler fra vaskeforsøket lagres ved 4°C og prøves på nytt etter 12 og 24 måneder. Latexpartikler sensitivisert med eselantiserum med fortynningene 1/500 og 1/1000 og vasket to ganger bibeholdt sine opprinnelige

sensiviteter mens ikke-vaskete latexpartikler var 2 - 4 ganger mindre sensitive etter 24 måneder.

d. Inkubasjonsperiodens lengde

Figuren viser sammenhengen mellom analysesensitivitet og inkubasjonsperiode. Store konsentrasjoner av antigen agglutinererte latexpartiklene i løpet av 5 minutter. Sensitiviteten økte raskt under de første 45 - 60 minutter og deretter langsomt og nådde et maksimum på 0,05 nanogram/ml ved de mest sensitive preparatene ved 10 timer. Hestedyrserumet var mer sensitivt enn kaninserum ved samtlige inkubasjonsperioder. Ved utførelsen av de sammenlignende forsøk ble 50 mikroliter prøveløsning og 10 mikroliter belagte latexpartikler som beskrevet nedenfor blandet på en serologisk skive og rotert ved 180 omdreining pr. minutt ved romtemperatur. Skivene ble belagt og fuktigheten opprettholdt med svamper mett med varmt vann. Skivene ble deretter iaktatt ved angitte tidspunkter.

Forlengelse av inkubasjonsperioden fra 5 minutter til 45 minutter eller derover fører til en 10 - 20 gangers sensitivitetsøkning. For praktiske kliniske formål valgte en inkubasjonsperiode på 15 minutter som normalt ble avlest ved intervaller på 5 - 15 minutter ved anvendelse av latexpartikler belagt med et hestedyrs antiserum. Slike latexpartikler hadde en sensitivitet på 0,2 nanogram antigen pr. milliliter væske. Det kunne ventes at økning av sensitiviteten for partikkelagglutineringsanalysen også skulle øke tilstedeværelsen av ikke-spesifikk agglutinerings og når det gjelder serumprøver agglutinererte disse latexpartiklene 69 % av sera fra sykehusbehandlede barn. Denne vesentlige ulempe har tidligere begrenset en utstrakt anvendelse av denne analysemetoden. Faktorer som påvirket agglutinerings av latexpartiklene belagt med gammaglobuliner er varmelabile serumkomponenter (formodentlig komplement) og varrestabile antiglobuliner, hvorav lave innhold vesentlig gjenfinnes i humansera, særlig fra pasienter med kroniske betennelsesykdommer.

Ikke-spesifikk agglutineringskonstatert ved agglutineringsav kontrollatexpartikler som sensitiviseres med helt ikke-immunt animalsk serum. Når latexpartikler belagt med makroglobulin anvendes, er kontrollatexpartiklene belagt med makroglobulinfraksjonen fra ikke-immunserum.

Ved å benytte foreliggende oppfinnelse reduseres frekvensen av ikke-spesifikk agglutineringsmed humansera til 2 % eller lavere ved (i) tilsetning av ikke-immunt animalsk serum til sensitiviserede latexpartikler; (ii) ved tilsetning av en serum-buffer inneholdende et polyanion og/eller et reduserende middel direkte til inkubasjonsblandingen og/eller (iii) ved varmeinaktivering av sera.

Forekomst av ikke-spesifikk agglutineringsble bestemt med sera fra barn og voksne som var pasienter på sykehus og ikke hadde H.i.b.-sykdom. Samtlige sera ble prøvet med latexpartikler sensitivisert med eselantiserum (anti-PRP LP) og med latexpartikler sensitivisert med ikke-immunt eselserum (kontroll-LP).

Ved innledende forsøk prøvdes sera inneholdende varmestabile agglutiner ved tilsetning av 10 mikroliter av et reduksjonsmiddel så som 1,4-ditiotreitol (DTT) eller 2-merkaptoetanol (ME) til inkubasjonsblandingen på inkubasjonens begynnelse. Optimale konsentrasjoner var 0,018 M for DTT og 0,35 M for ME (sluttkonsentrasjonene i inkubasjonsblandingen var 0,0026 M for DTT og 0,05 M for ME).

Tabell 4 nedenfor sammenfatter de resultater som ble oppnådd med 104 pediatriske sera som ble lagret i minst 24 timer ved 4°C før prøving.

TABELL 4

Forekomst av ikke-spesifikk agglutineringsi lagrede sera¹ fra sykehusbehandlede barn uten Haemophilus influenzae type b.

Agglutinerings med anti-PRP LP	negativ	positiv	negativ	positiv
Agglutinerings med kontroll-LP	negativ	positiv	positiv	negativ
Ingen behandling av serum (n=104)	32 (31%)	65 (63%)	3 (3%)	4 (4%)
Varmeinaktivering av serum (n = 104)	49 (47%)	47 (45%)	1 (1%)	7 (7%)
Tilsetning av normalt eselserum (2,5%) til LP (n = 104)	72 (69%)	23 (22%)	7 (7%)	2 (2%)
Varmeinaktivering av serum og tilsetning av normalt eselserum (2,5%) til LP (n = 104)	75 (72%)	23 (22%)	5 (5%)	1 (1%)
Tilsetning av normalt eselserum (2,5%) til LP ₂ og tilsetning av DTT ² til serum (n = 53) ³	52 (98%)	1 (2%)	0	0

¹Lagret i minst 24 timer ved 4°C før prøving.

²Ditiotreitol, sluttkonsentrasjon 0,0026 M i inkubasjonsblandingen.

³Bare 53 av 104 prøver inneholder tilstrekkelig med serum for denne prøven.

69 % av disse sera ga ikke-spesifikk agglutinerings med anti-PRP og alle foruten 4 % ble identifisert ved kontroll-LP.

Varmeinaktivering (60°C i 15 minutter) reduserte bare i liten grad ikke-spesifikk agglutinerings til 53 % og tilsetning av ikke-immunt eselserum til både anti-PRP og kontroll-LP reduserte ikke-spesifikk agglutinerings til 31 %; tilsetning av 10 mikroliter av et reduksjonsmiddel, d.v.s. ditiotreitol, reduserte forekomsten av ikke-spesifikke reduksjoner til 2 %. Resultat erholdt med 52 lagrede sera fra voksne personer var lignende. Bare et serum som ga ikke-spesifikk agglutinerings (positiv med anti-PRP-LP og kontroll-LP) ved tilsetning av 2,5 % normalt eselserum sattes til latexpartiklene og DTT sattes til inkubasjonsblandingen.

For å bestemme hvorvidt ferske sera ga en større forekomst av ikke-spesifikk agglutineringsreaksjon ble 100 sera tatt frem fra voksne og plasert umiddelbart på is og analysert samme dag. Hvert serum ble prøvet med og uten reduksjonsmiddel (ME) og med og uten varmeinaktivering (60°C i 5 minutter). Agglutineringsreaksjonen ble prøvet med anti-PRP-LP og kontroll-LP som hver inneholdt 2,5 % normalt eselserum og korresponderte i samtlige tilfeller. Agglutineringsmønsteret er sammenfattet i tabell 5.

TABELL 5

Ikke-spesifikk agglutineringsreaksjon med ferske sera fra 100 voksne uten *Haemophilus influenzae* type b¹.

Mønster	Ingen varmeinaktivering		Varmeinaktivering		Antall sera	Tolkning
	- ME	+ ME ²	- ME	+ ME ²		
1.	(-)	(-)	(-)	(-)	43	Ingen antiglobuliner Ikke noe komplement
2.	(+)	(-)	(+)	(-)	28	Bare antiglobuliner
3.	(+)	(+)	(-)	(-)	4	Bare komplement
4.	(-)	(+)	(-)	(-)	14	Bare komplement ("reaktivert" med ME)
5.	(+)	(+)	(+)	(-)	10	Antiglobuliner og komplement
6.	(-)	(-)	(-)	(+)	1	

Antall sera som ga ikke-spesifikk agglutineringsreaksjon	Ingen varmeinaktivering		Varmeinaktivering	
	- ME	+ ME ²	- ME	+ ME ²
	42	38	38	1

¹ Alle analyser ble utført med anti-PRP- og kontroll-LP inneholdende 2,5 % normalt eselserum. Fullstendig overensstemmelse rådde mellom resultatene beholdt med anti-PRP- og kontroll-LP.

² 2-merkapttoetanol, sluttkonsentrasjon 0,05 M i inkubasjonsblandingen.

42 % av de ubehandlede sera (ingen varme, ikke noe reduksjonsmiddel) ga ikke-spesifikk agglutineringsreaksjon. Når et reduk-

sjonsmiddel (ME) ble tilsatt, ble 28 av disse sera negative (mønster 2) som viser tilstedeværelse av antiglobuliner. 14 sera som i begynnelsen var negative ble positive (mønster 4) hvilket viser at et varmemestabilt agglutinin ble reaktivert av merkaptoetanol. Nettoeffekten av ME var bare å redusere ikke-spesifikk agglutineringsgrad til 38 %. En lignende forekomst av ikke-spesifikk agglutineringsgrad oppnås ved varmeinaktivering alene. Kombinering av varmeinaktivering av disse sera og tilsetning av et reduksjonsmiddel til inkuberingsblandingen reduserte imidlertid forekomsten av ikke-spesifikk agglutineringsgrad til størrelsesorden 2 % eller lavere. Mens varmeinaktivering er tidkrevende, er det utviklet en alternativ metode for å eliminere ikke-spesifikk agglutineringsgrad ved innvirkning av varmelabile serumfaktorer. Ulike artede polyanioner omfattende natriumpolyetanolsulfonat (SPS) dextransulfat, karragenin og heparin forhindrer den ikke-spesifikke agglutineringsgrad av globulinbelagte latexpartikler ved innvirkning av varmelabile serumfaktorer.

100 ferske sera fra voksne personer ble prøvet med en serumbuffer inneholdende både ME (som ovenfor) og SPS ved en konsentrasjon ved 0,05 %. Bare et av de 100 sera ga ikke-spesifikk agglutineringsgrad med anti-PRP og kontroll-LP. Ikke-spesifikk agglutineringsgrad med dette serum ble eliminert ved oppvarming. Som ønskelig tilsattes en serumbuffer inneholdende både reduksjonsmiddel og et polyanion til inkuberingsblandingen av en stabilisert sensitivisert latexpartikkel og en serumprøve.

En slik serumbuffer ble fremstilt på følgende måte; Fortynn 14 molar 2-merkaptoetanol (standardisert fullstyrkeløsning) 1/40 i glycinbuffret saltløsning (GBS) (0,1 M glycin, 0,9 % natriumklorid, pH 8,2). Spe ut 5 % vannløsning av polyetanolsulfonat 1/100 i samme GBS.

Serumbufferen kan inneholde andre reduksjonsmidler så som ditiotreititol glutation, cystein og lignende istedet for 2-merkaptoetanol. Dessuten kan andre polyanioner anvendes så som dextransulfat, heparin, karragenin og lignende såvidt

153910

14

de ikke forstyrrer antigen-antistoffreaksjonen.

Tabell 6 nedenfor viser den optimale konsentrasjonen av reagenser i serumbuffere. Høye konsentrasjoner av reduksjonsmiddel eller polyanioner reduserte analysens følsomhet og lavere konsentrasjoner kunne ikke eliminere ikke-spesifikk agglutinerings i samtlige sera.

TABELL 6

Optimale konsentrasjoner av reagenser i "serumbuffer".

	DTT	2-ME	SPS
	(Sluttkonsentrasjon i analyseblanding)		
Redusert sensitivitet	12,8 mM	400 mM	0,07 %
God sensitivitet + eliminering av ikke spesifikk agglutinerings	2,6 mM	50 mM	0,007%
Eliminerer ikke ikke- spesifikk agglutinerings	0,65 mM	10 mM	0,0007%

DTT - ditiotreitoll

2-ME - 2-merkaptoetanol

SPS - natriumpolyetanolulfonat

Den effektive konsentrasjonen av ikke-immunt animalsk serum i latexsuspensjonen ble undersøkt på nytt i forsøkssystemet med anvendelse av den ovenfor beskrevne serumbuffer.

Konsentrasjoner av ikke-immunt animalsk serum mindre enn 0,25 % i partikkelsuspensjonen (mindre enn 0,035 % i den endelige analyseblanding) resulterte i eventuell ikke-spesifikk agglutinerings tross anvendelsen av serumbuffer.

Konsentrasjoner av ikke-immunt animalsk serum opp til ca. 25 % i latexsuspensjonen (3,5 % av den endelige analyseblanding) er effektive med hensyn til reduksjon av forekomst av ikke-spesifikk agglutinerings, men den høyeste konsentrasjonen, d.v.s. 25 %, reduserte imidlertid analysens

sensitivitet for polyribosfosfat to ganger.

Ikke-spesifikk agglutinerings i andre kroppsvæsker

De fleste urinprøver gir ikke-spesifikk agglutinerings med anti-PRP og kontroll-LP. Dette kan elimineres enten ved oppvarming (100°C i 5 minutter) eller ved å filtrere urinen. Ved den foretrukne utførelsesform anvendes et filter med porestørrelse 0,45 µm.

Prøve av cerebros spinalvæske gir meget sjelden ikke-spesifikk agglutinerings, hvilket elimineres ved oppvarming (100°C i 5 minutter). PRP-antigenet er stabilt ved den ovenfor nevnte oppvarming og filtrering.

Følgende spesifikke eksempler belyser oppfinnelsen i dens foretrukne utførelsesform.

EKSEMPEL I

a. Belegg av latexpartikler

For fremstilling av anti-PRP-latexpartikler fortynnes helt eselantiserum til H.influenzae type b i forholdet med 1/500 glycinbuffret saltløsning (GBS) og oppvarmes til 56°C i 30 minutter. En del latexsuspensjon (en 10-prosentig suspensjon med partikkel diameter 0,81 µm i destilert vann) ble satt til 80 deler fortynnet antiserum til en endelig latexpartikkelkonsentrasjon på 0,125 %. Blandingen ble inkubert en time ved romtemperatur, sentrifugert ved 12.000g i 10 minutter og supernatanten ble kastet. "Pellet"-en ble gjenoppslemmet i et lite volum GBS inneholdende 0,1 % ikke-immunt eselserum gjensentrifugert som ovenfor og suspendert deretter igjen i et likt volum GBS inneholdende 2,5 % ikke-immunt eselserum. Kontrollatexpartikler fremstilt som ovenfor nevnt bortsett fra at ikke-immunt eselserum fortynnet til 1/500 i GBS ble anvendt for initiell dekking av latexpartiklene. Det ikke-immune eselserum som ble anvendt herunder skal være serum som taes før immunisering fra samme dyr som immuniserer.

Når makroglobulinfraksjonen skal anvendes, kromatograferes det hele ikke-immune og immune eselserumet på en gelfiltrer-

153910

16

ingskolonne inneholdende "Sephacryl G-200" og fraksjonene som elueres i kolonnens voidvolum sammenslås. De sammen-
slåtte volumfraksjonene fortynnes til en proteinkonsen-
trasjon på 50 µg protein pr. milliliter i GBS og anvendes
siden i stedet for fortynnet helt antiserum i den ovenfor
beskrevne metoden.

b. Fremstilling av serumbuffer

Fortynn 14 molar 2-merkapttoetanol (standardisert fullstyrke-
løsning) 1/40 i GBS. Tilsett natriumpolyetanolsulfonat til
en sluttkonsentrasjon av 0,05.

c. Analysemetode

Analysemetoden ifølge oppfinnelsen utføres på følgende måte:

50 mikroliter positivt kontrollserum, negativt kontroll-
serum og hvert serum, cerebrospinalvæske og urinprøve som
skal undersøkes settes til hver og en av to kilder i en ren
tørr serologisk skive ifølge det følgende diagram. Det
positive kontrollserumet inneholder 2 ng PRP antigen/ml.
Det negative kontrollserumet inneholder antiglobuliner som
agglutinerer både anti-PRP-LP og kontroll-LP om ikke SB til-
settes og gir således en kontroll av aktiviteten av SB.
Urinprøve forfiltreres med et 0,45 µm filter.

	Positivt kontroll- serum	Negativt kontroll- serum	Prøve- serum	Prøve- CSF	Prøve- urin
Rad A: anti-PRP-LP	⊙ SB	⊙ SB	⊙ SB	○	○
Rad B: kontroll-LP	⊙ SB	⊙ SB	⊙ SB	○	○

SB = tilsatt serumbuffer.

Tilsett 10 mikroliter serumbuffer til hver kilde innehold-
ende positivt kontrollserum, negativt kontrollserum eller
en serumprøve.

Latexsuspensjonene blandes forsiktig uten skumming og 10
mikroliter anti-PRP-latexpartikler settes til en kilde i

hvert par (rad A) og reagensene blandes nøyaktig.

10 mikroliter kontrollatexpartikler settes til den andre kilden i hvert par og reagensene blandes nøyaktig.

Skiven plasseres på et serologisk risteapparat og roteres i 45 minutter. Kamrene skal fuktes med svamper dyppet i varmt vann slik at kondensasjonen blir synlig under forsøket. Skivene tas ut fra kamrene, tørkes fri for kondensat og agglutineringsstudien studeres ved at skivene bøyes frem og tilbake i skrått innfallendelys over sort bakgrunn og i følge følgende skala:

- 4+ store klumper - klar bakgrunn
- 3+ store klumper - uklar bakgrunn
- 2+ små klumper
- 1+ fine granuler
- 0 uklart

Bedømmelsene 3+ og 4+ skal være lette å skille fra kontrollene ved betraktning av skiven på en armlengdes avstand. Reaksjoner 2+ krever nøyaktige studium.

Tolkning av resultater.

Hemophilus-LP	Kontroll-LP	Tolkning
(+)	(-)	Positivt for H. influenzae type b-antigen
(-)	(-)	Negativt for H. influenzae type b-antigen
(+)	(+)	Ikke-spesifikk agglutineringsstudie for H. influenzae type b-antigen kan eventuelt være nærværende

Positiv agglutineringsstudie ifølge bedømmelsen 2+ skal angis som å være "svakt positiv".

De i foreliggende sammenheng angitte tidsrommene og temperaturene for varmebehandling og inkubering er optimale, hvorved det imidlertid skal forstås at samme resultat kan erholdes ved høyere temperaturer og under kortere tidsrom.

153910

18

eller omvendt ved lavere temperaturer under lengre tidsrom. Beskrivelsen ovenfor angir videre reagenser, media og fremgangsmåter som anvendes for å konstatere funksjonen til foreliggende oppfinnelse.

P a t e n t k r a v

Direkte agglutineringsprøve for påvisning av antigen-er i kroppsvæsker, hvor man kombinerer en prøve av en kroppsvæske, som eventuelt kan være varmebehandlet, bestående av serum eller plasma med et flytende reagens som agglutineres ved kontakt med væsker som inneholder antigen-er, hvilket reagens omfatter en bærer belagt med animalsk antiserum mot nevnte antigen-er oppslemmet i et passende fysiologisk buffersystem og ikke-immunt animalsk serum fra samme dyreart som dannet antiserumet, hvilket antiserum er hestedyrsantiserum, spesielt makroglobulinfraksjonen derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det benyttes et buffersystem inneholdende et polyanion som kan redusere virkningen til varmelabile bestanddeler i prøven, og et reduksjonsmiddel som kan redusere antiglobulinantistoffene i prøven, og inkubering utføres over et tidsrom på 45 minutter eller lengere, og deretter bestemmes visuelt agglutineringsgraden, hvorunder polyanionene velges blandt natriumpolyetanolsulfonat, dekstransulfonat, karragenin og heparin, og hvorunder reduksjonsmiddelet velges blandt 2-merkapttoetanol, ditiotreitól, glutation og cystein.

153910

Figur

Minste konsentrasjon av PRP-5 påvist av LPA etter forskjellige inkuberingsperioder.

Agglutineringsgrad med størrelse 2+ eller større ble ansett som et positivt resultat.

Linjen Δ — Δ vedrører LP belagt med kaninantiserum nr. 144; linjen \circ — \circ vedrører LP belagt med eselantiserum nr. 132.

