



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 63493
UTLÄGGNINGSSKRIFT
C Patentti myönnetty 10.06.1983
(45) Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ G 01 N 33/54

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	760326
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	11.02.76
(23) Alkuperäisyys — Giftighetsdag	11.02.76
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	20.08.76
(44) Nähtävöisyys ja kuulutus julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	28.02.83
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	19.02.75

USA(US) 550949

- (71) Warner-Lambert Company, 201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey
07950, USA(US)
- (72) George Edward Lowke, Gales Ferry, Connecticut, Bela Zoltan Horvath,
Ledyard, Connecticut, USA(US)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Hepatitis B pinta-antigeenin toteaminen lateksi-agglutinaation avulla -
Påvisande av hepatitis B ytantigen genom latex-agglutination

Keksinnön kohteena on hepatitis B pinta-antigeenin havaitseminen lateksi-agglutinaation avulla.

Hepatitis B pinta-antigeeni (Australia-antigeeni), jonka löysi Blumberg et al., Bull. N.Y. Acad. Med., 40, 377 (1964), ja myöhempi korrelaatio pitkän inkuboisajan vaativan hepatitoksen kanssa on kannustanut aktiivisuuden verrenluovuttajaväestön seulonnassa yleisessä terveydenhuoltomielessä.

Vasta-aineelle herkistettyjen lateksihiukkasten käyttö, joka on esitetty US-patenttijulkaisussa 3 085 875 ja 3 551 555, on erikoisesti sovellettu hepatitis B pinta-antigeenin havaitsemiseksi veriseerumista, kuten on kuvattu julkaisussa The Journal of Immunology, n:o 1, sivut 108-111, tammikuu 19, 1972.

Diagnostinen koe Australia-antigeenin tai sen vasta-aineen toteamiseksi on esitetty DE-hakemusjulkaisussa 2 237 204.

Herkän, mutta aikaa vievän radioimmuno-määrityksen ovat kuvanneet Ling, C.M. ja Overby, L.R. julkaisussa The Journal of Immunology 109, n:o 4, sivut 834-841 (1971) (1972).

Tarvitaan kuitenkin parannettua diagnostista menetelmää, joka on nopea, herkkä ja mikä tärkeintä, luotettava (vähin mahdollinen määrä "väärää positiivisia").

Keksinnön kohteena on menetelmä hepatitis B pinta-antigeenin toteamiseksi ihmisverestä, jolloin verinäyte, josta punaiset verisolut on poistettu, sekoitetaan diagnostiseen koostumukseen, joka muodostuu vesisuspensiosta, jossa on käytännöllisesti katsoen samanlaisia pallomaisia polystyreenihiukkasia, joiden halkaisija on 0,05 - 2,0 μm ja jotka on päällystetty puhdistetulla hepatitis B pinta-antigeenille spesifisellä vasta-aineella, jolloin tämä vasta-aine on eristetty sellaisten marsujen seerumista, jotka on immunisoitu puhdistetulla ihmisverestä eristetyllä hepatitis B pinta-antigeenilla ja jolloin tämä vasta-aine ei sisällä muita ihmisseerumiproteiineille spesifisiä vasta-aineita, ja jolloin vesisuspensio sisältää myös liuenneena normaalia marsun seerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta ja jolloin polystyreenihiukkaset on päällystetty sellaisella määrällä mainittua vasta-ainetta, joka juuri estää hiukkasten aggregoitumisen itsestään, ja verinäytteen ja suspension seoksesta tutkitaan, tapahtuuko siinä agglutinoitumista.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että (a) polystyreenihiukkasten päällystykseen käytetty vasta-aine on puhdistettu tunnetulla tavalla saattamalla antigeeni/vasta-ainekompleksin liuos, joka on valmistettu sekoittamalla vasta-ainetta sisältävää marsun seerumia ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeenille spesifisiä antigeenipitoisia vasta-aineita, kosketukseen tiheysgradientin sisältävän nestemäisen väliaineen tiheämmän pään kanssa, minkä jälkeen nestemäinen väliaine ultrasentrifugoidaan, kunnes seerumikomponenttien jakautuminen tiheysgradienttiin on saavuttanut tasapainotilan, ja sen jälkeen hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta sisältävät fraktiot erotetaan,

(b) kaikki verinäytteet, joissa havaitaan agglutinoitumista, neutraloidaan sekoittamalla niihin ihmisen hepatitiksiin sidottua vasta-ainetta,

(c) vaiheesta (b) saaduista näytteistä erotetaan reumafaktori sekoittamalla näytteet lateksipallojen kanssa, jotka on päällystetty ihmisen gamma-globuliinilla, ja pallot yhdessä niihin absorboituneen reumafaktorin kanssa erotetaan, ja

(d) mainitut näytteet, joissa agglutinoitumista on havaittu, sekoitetaan uudelleen mainittuun diagnostiseen koostumukseen.

Marsut tehdään immuuneiksi hepatitis B pinta-antigeenillä, joka on puhdistettu menetelmällä, joka on kuvattu US-patenttijulkaisussa 3 838 144. Alkuimmunointi suoritetaan antigeenilla Freund'in apuaineessa eläimen jalan polkukänsiin, minkä jälkeen suoritetaan toistuvia antigeenirokotuksia, joko apuaineen kanssa tai ilman sitä, vatsaontelonsisäisesti, lihaksensisäisesti, ihonalaisesti tai laskimonsisäisesti. Immunoituista eläimistä kerätyt seerumit yhdistetään ja mahdollisesti jäljellejäänyt ihmisen seerumiproteiinille spesifinen vasta-aine poistetaan saattamalla antiseerumi kosketukseen normaalin ihmis-seerumin kanssa. Gammaglobuliini voidaan sitten eristää saostamalla 14-%:isella vesipitoisella natriumsulfaatilla, dialysoida vesipitoista fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta vastaan ja edullisesti kuumentaa 56°C:ssa n. 30 minuuttia komplementin hävittämiseksi.

Vasta-ainetta puhdistetaan edelleen yleisillä menetelmillä, joita on kuvattu julkaisuissa The Journal of Immunology, Vol. 106, no 3, sivut 589-597, maaliskuu 1971, ja Biochemistry, Vol 6, no 5, sivut 1460-1466, toukokuu 1967. Spesifinen hepatitis B pintavasta-aine puhdistetaan absorboituneesta marsun seerumista sekoittamalla seerumi optimaalisissa suhteissa ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeeniä, inkuboimalla 37°C:ssa 1 tunti ja sitten yli yön 4°C:ssa. Näin muodostunut antigeeni-vasta-aine-saostuma pestään sitten kahdesti kylmässä fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa, jolloin suurin osa jäljelle jääneistä ei-spesifisistä proteiineista saadaan poistetuksi. Antigeeni-vasta-aine-saostuma liuotetaan sitten kylmään 0,2M etikkahappoon, joka sisältää 2 % sakkaroosia, pH 2,3, tai eri molaarisiin kaatrooppisia ioneja sisältäviin liuoksiin (esim. 2,0M natriumtiosyanaattiin, pH 6,6). Asiantuntijalle on selvää, että muitakin sopivia puskureita antigeeni-vasta-aine-kompleksien dissosioimiseksi voidaan käyttää. Nämä dissosioidut antigeenit ja vasta-aineet erotetaan linkoamalla kierrosluvulla 25 000 - 28 000 r/min 12-15 tunnin ajan tai kierrosnopeudella 30 000 3/min 4 tunnin ajan 4-40 %:n jatkuvalla sakkaroosigradientilla Beckman TI-15 vyöhykeroottorissa. Roottori tyhjennetään pumpaamalla sisään 50-%:ista sakkaroosia gradientin muuttamiseksi ja 20 ml:n jakeista määritetään U.V.-absorptio 1 cm:n kennossa 280 nm:ssä ja huippujakeet yhdistetään, jolloin saadaan puhdistettu, spesifinen vasta-ainefraktio ja puhdistettu antigeenifraktio. Kumpikin fraktio neutraloidaan sitten 0,1N NaOH:lla. Vasta-ainefraktio väkevöidään alkuperäiseen seerumitilavuuteen ja dialysoidaan yli yön glysiinillä puskuroitua suolaliuosta vastaan. Puhdistettu vasta-aine titrataan sitten ja standardoidaan.

Keksinnön kohteena on myös testipakkaus edellä kuvattua hepatitis B pinta-antigeenin toteamismenetelmää varten, joka koostuu muovilevyistä, joilla testit suoritetaan, sekä reagenssipulloista, jotka käsittävät:

(a) reagenssipullon, joka sisältää diagnostista koostumusta, jossa on vesipitoisessa suspensiossa 0,1 - 3 paino/tilavuus-% käytännöllisesti katsoen samanlaisia pallon muotoisia polystyreenihiukkasia, joiden halkaisija on 0,05-2,0 μm ja jotka on päällystetty puhdistetulla hepatitis B pinta-antigeenille spesifisellä vasta-aineella, jolloin vasta-aine on valmistettu sellaisen marsun seerumista, joka on immunoitu puhdistetulla ihmisverestä eristetyllä hepatitis B pinta-antigeenilla ja joka ei sisällä muita ihmisen seerumi-proteiineille spesifisiä vasta-aineita, jolloin vesipitoinen suspensio sisältää myös liuenneessa muodossa 2-5 tilavuus-% kokonaissuspension määrästä laskettuna normaalia marsun seerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta, ja jolloin polystyreenihiukkaset on päällystetty sellaisella määrällä mainittua vasta-ainetta, joka juuri riittää estämään hiukkasten aggregoitumisen itsestään,

(b) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen positiivista vertailuseerumia,

(c) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen negatiivista vertailuseerumia, ja

(d) reagenssipullon, joka sisältää fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta, jossa on 5 % naudan seerumialbumiiniproteiinia. Testipakkaukselle on tunnusomaista, että reagenssipullossa (a) käytetty vasta-aine, jolla polystyreenihiukkaset päällystetään, on puhdistettu tunnetulla tavalla saattamalla antigeeni/vasta-aine-kompleksin liuos, joka on valmistettu sekoittamalla vasta-ainetta sisältävää marsun seerumia ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeenille spesifisiä antigeenipitoisia vasta-aineita, kosketukseen tiheysgradientin sisältävän vesipitoisen väliaineen tiheämmän pään kanssa, minkä jälkeen vesipitoinen väliaine ultrasentrifugoidaan, kunnes seerumikomponenttien jakautuminen tiheysgradienttiin on saavuttanut tasapainotilan, ja sen jälkeen hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta sisältävät fraktiot erotetaan, ja jolloin reagenssipullot käsittävät lisäksi:

(e) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen hepatitukseen sidotun vasta-aineen vesiliuosta, ja

(f) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen gamma-globuliinilla päällystettyjen lateksipallojen vesisuspensiota.

Natriumatsidia 0,1 %, voidaan lisätä säilöntäaineeksi diagnostiseen reagensiin. Vasta-aine laimennetaan optimaalisesti valmistamalla pieniä eriä diagnostista reagenssia eri vasta-aineen laimennuksin ja testaamalla näillä ihmisseerumeita, joiden tiedetään sisältävän hepatitis B pinta-antigeeniä. Laimennus, jolla saadaan paras tulos, valitaan diagnostisen reagenssin valmistukseen.

Sopivasti laimennettu vasta-aine sekoitetaan 0,2 μm :n läpimittaisten polystyreenilateksipallosten kanssa. 1-2 tunnin sekoittamisen jälkeen palloset pestään kolmasti glysiinillä puskuroidulla suolaliuoksella ja suspendoidaan uudelleen glysiinillä puskuroituun suolaliuokseen.

Vesipitoinen suspensio sisältää 0,1 - 3 paino/tilav.-%, edullisesti n. 0,5 paino/tilav.-% hartsihiukkasia. Diagnostisen reagenssin valmistusta varten suspensio sisältää edullisesti n. 0,05 paino/tilav.-% vasta-ainetta absorboituneena hartsihiukkasille, mutta tätä voidaan vaihdella hiukkasten pitoisuuden mukaan. Vasta-aineen määrän tulisi olla juuri riittävä estääkseen hartsihiukkasten itsestään kasautumisen. Pallomaisille polystyreenihiukkasille, joiden läpimitta on 0,23 mikronia, tämä määrä on n. yksi kymmenesosa hiukkasten painosta.

Suspensio sisältää edullisesti stabiloimisainetta, joka on lisätty vasta-aineen absorption jälkeen, esim. inerttiä proteiinia, kuten seerumialbumiinia väkevyydessä esimerkiksi 0,1 paino/tilav.-%.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan diagnostinen reagenssi sisältää myös normaaliseerumia (ts. seerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta tai antigeeniä itseään), joka on saatu samasta eläinlajista, kuin mistä vasta-aineen sisältävä seerumi saatiin. Tällaisen normaaliseerumin läsnäolo vähentää oleellisesti "väärin positiivisten" osuutta, kun tätä diagnostista reagenssia käytetään hepatitis B pinta-antigeenin havaitsemiseen verinäytteistä. Edullisesti lisätään n. 1 osa normaaliseerumia 20-50 tilavuusosaa kohti vasta-aineella päällystettyjen hartsihiukkasten vesipitoista suspensiota. Jos normaaliseerumia samasta eläinlajista, kuin mistä vasta-ainetta sisältävä seerumi saatiin, ei ole mukana diagnostisessa reagenssissa, n. 10 % ihmisseerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeeniä, aiheuttaa hartsiosasten aggregoitumisen. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että tällaisissa ihmisseerumeissa on mukana aineita, jotka reagoivat muiden aineiden kanssa, jotka ovat peräisin eläimen anti-seerumista, josta vasta-aine hepatitis B pinta-antigeeneille saatiin. Jos normaalia eläinseerumia on mukana,

kuitenkin jo n. 1-3 % ihmisen seerumeita aggregoi hartsihiukkaset hepatitis B pinta-antigeenin puuttuessa seerumeista. Tämä saattaa johtua normaalin eläinseerumin komponenteista, jotka pystyvät reagoimaan näiden aineiden kanssa ihmisseerumeissa ja siten estämään niitä aikaansaamasta hartsihiukkasten yhteenkasautumista.

Normaali ihmisen vertailuseerumi valmistetaan laimentamattomasta normaalista ihmisseerumista, jonka on osoitettu olevan negatiivinen hepatitis B pinta-antigeenille lateksireagenssilla ja radioimmunomäärityksellä.

Positiivinen vertailuseerumi valmistetaan tunnetuista hepatitis B pinta-antigeenille positiivisista ihmisseerumeista. Seerumia lämpökäsitellään 60°C:ssa ainakin 10 tuntia virustarttuvuuden hävittämiseksi ja laimennetaan sitten kaksinkertaiseksi sarjaksi normaalissa ihmisseerumissa. Laimennus, jota käytetään tuotetta varten, on se, joka antaa selvän l+reaktion lateksireagenssin kanssa.

Hepatitikseen sidottu vasta-aine (ihmisen) valmistetaan ihmisen verineesteestä, joka sisältää vasta-aineita hepatitis B pinta-antigeenille. Verineste saadaan eri plasmaforeesikeskuksista, titrataan geelidiffuusion avulla ja muutetaan seerumiksi lisäämällä kalsiumkloridia ja naudan trombiinia. Gammaglobuliinia valmistetaan sitten seerumista saostamalla 16-%:isella natriumsulfaattilla. Saostuma pestään 14-%:isessä natriumsulfaatissa, minkä jälkeen sitä dialysoidaan yli yön vähämolaarista fosfaattipuskuria vastaan, ja sitten se johdetaan DEAE-selluloosan läpi, joka on etukäteen tasapainotettu samalla puskurilla. Puhdistettu gammaglobuliini standardoidaan sitten väkevöimällä ja dialysoidaan fosfaatilla puskuroidua suolaliuosta vastaan.

Reumafaktorin absorboiva reagenssi käsittää lateksipallosia, jotka on päällystetty normaalilla ihmisen gammaglobuliinilla. Sitä saadaan valmistamalla standardiliuos puhdistetusta gammaglobuliinista glysiinillä puskuroidussa suolaliuoksessa, lisäämällä suspensio, jossa on 0,2 µm:n läpimittaisia polystyreenipallosia, ja lämmittämällä 57°C:ssa 15 minuutin ajan. Suspensio laimennetaan sitten glysiinillä puskuroiduun suolaliuokseen.

Tarkistustestilaimennin valmistetaan laimentamalla liuos, jossa on 30 % naudan seerumialbumiinia, fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella 5 %:n proteiinipitoisuuteen.

Testimenetelmiä

A. Verinäytteen valmistus

Seerumi on verinäytteen edullinen muoto. Jos testinäyte on täysverta, täytyy sitä ensin käsitellä siinä olevien solujen hajoittamiseksi ja koaguloitumisen estämiseksi. Tätä tarkoitusta varten sitä voidaan käsitellä vesipitoisella laimentimella, joka sisältää polyoksietyloitu alkyylifenolityyppistä ei-ionista pinta-aktiivista ainetta, esim. iso-oktyylidenoksiipolyoksietylietanolia (Triton X-100, Rohm & Haas Co.) ja natriumsitraattia.

Jos testinäyte on veri-plasmaa, sen täytyy sisältää koaguloitumisen estoa ainetta, esim. natriumsitraattia. Sitä käsitellään edullisesti myös samalla ei-ionista pinta-aktiivista ainetta sisältävällä vesipitoisella laimentimella, kuin täysveren yhteydessä jäljelle jääneiden solujen hajoittamiseksi.

B. Reagenssit

1. Lateksireagenssi

a. Spesifisyys

1. Määritetty testaamalla reagenssia ryhmällä positiivisia ja negatiivisia seerumeita, joita toimittaa Bureau of Biologics, sekä myös ryhmällä, jossa on 100 negatiivista normaaleilta vapaaehtoisilta kerättyä negatiivista seerumia.

b. Reaktiivisuus

1. Reagenssi suspendoidaan uudelleen voimakkaasti sekoittaen.
2. Yhteen muovisen testilevyn testisyvennykseen lisätään 3 pisaraa positiivista vertailuseerumia. Viereiseen syvennykseen lisätään 3 pisaraa negatiivista vertailuseerumia.
3. Kuhunkin näytteeseen lisätään 1 pisara reagenssia.
4. Sekoitetaan perusteellisesti käyttäen eri sekoitinta kutakin syvennystä kohti.
5. Pyöritetään levyä mekaanisella sekoittajalla 10 minuuttia kierrosluvulla 150 r/min.
6. Seoksia tutkitaan epäsuorasti valaistussa katselulaitteessa.
7. Positiivisella vertailuseeruminäytteellä pitäisi havaita selvästi positiivinen, heikko (+)reaktio. Negatiivisella vertailuseeruminäytteellä ei reaktiota pitäisi havaita.

2. Positiivinen vertailuseerumi

a. Reaktiivisuus

1. Positiivinen vertailuseerumi testataan lateksireagenssilla 1+ reaktiivisuuden varmistamiseksi.

3. Negatiivinen vertailuseerumi

a. Reaktiivisuus

1. Negatiivinen vertailuseerumi testataan lateksireagenssilla negatiivisen reaktion varmistamiseksi.

4. Normaali ihmisen vertailuseerumi

a. Spesifisyys

1. Varmistustesti suoritetaan sen varmistamiseksi, että se ei reagoi lateksireagenssin kanssa ja että siinä ei ole hepatitis B pinta-antigeenille positiivista seerumia.

5. Hepatitukseen liittyvä vasta-aine (ihmisellä)

a. Reaktiivisuus

1. Geelidiffuusiotitraus suoritetaan käyttäen standardi hepatitis B pinta-antigeeniä.

b. Spesifisyys

1. Käyttötesti suoritetaan sen määrittämiseksi, inhiboiko seerumi spesifisesti hepatitis B pinta-antigeenille positiivisia näytteitä, kun sitä käytetään tarkistustestissä.

6. Absorptioreagenssi

a. Reaktiivisuus

1. Reagenssi testataan seerumilla, joka sisältää reumafaktorin sen varmistamiseksi, että se reagoi reumafaktorin kanssa ja osittain absorboi sen.

7. Tarkistustestilaimennin

a. Spesifisyys

1. Tarkistustesti suoritetaan käyttäen laimenninta sen varmistamiseksi, että se ei reagoi lateksireagenssin kanssa ja että se ei inhiboi hepatitis B pinta-antigeenille positiivista seerumia.

C. Seeruminäytteiden testaus (seulontatesti)

1. 120 μ l seerumia pannaan muovilevyn syvennykseen.

2. Lisätään yksi pisara lateksireagenssia.

3. Sekoitetaan perusteellisesti käyttäen erillistä kertakäyttösekoitinta kutakin näytettä varten.

4. Pyöritetään levyä mekaanisella sekoittajalla 10 minuuttia kierrosnopeudella 150 r/min.

5. Seokset tutkitaan epäsuorasti valaistulla katselulaitteella.

6. Reaktiot arvioidaan asteikolla 1+:sta 4+:aan vastaten lisääntyvää agglutinaatiovoimakkuutta.

D. Tarkistava neutraloimismenetelmä

1. Näytteet

a. Kaikki näytteet, jotka on havaittu positiivisiksi seulontatestissä.

b. Positiivinen vertailuseerumi, joka on otettu mukaan heikoksi positiiviseksi näytteeksi.

2. Menettelytapa

a. 10 x 75 mm:n kertakäyttökoeputki merkitään näytteen tunnusnumerolla ja "A":lla. Toinen putki merkitään näytteen tunnusnumerolla ja "B":llä.

b. Kaksi pisaraa (n. 80 μ l) hepatitukseen liittyvää vasta-ainetta (ihmisellä) lisätään "A":lla merkittyyn putkeen.

c. Lisätään kaksi pisaraa normaalia ihmisen negatiivista vertailuseerumia "B":llä merkittyyn putkeen.

d. Lisätään 240 μ l testinäytettä kuhunkin "A":lla ja "B":llä merkittyyn putkeen.

e. Putkien sisältöjä sekoitetaan ja inkuboidaan 30 minuuttia 37°C:ssa vesihauteella.

f. Testataan 120 μ l putkista "A" ja "B" käyttäen seulontareagensseja ja -menetelmiä. Useimmille suhteellisen heikosti positiivisille näytteille voidaan erottaminen spesifisten ja ei-spesifisten positiivisten välillä tehdä ilman lisätestausta, koska "A"-näyte ei reagoi, kun taas "B"-näyte pysyy positiivisena ja ihmisen vasta-aine estää sitä spesifisesti. Niitä näytteitä varten, jotka ovat spesifisiä, mutta voimakkaammin positiivisia, sekä myös niitä varten, jotka ovat ei-spesifisiä, vaaditaan lisätestausta, kuten seuraavassa yksityiskohtaisemmin esitetään.

g. Jokaista putkea varten, joka vaatii lisätestausta, merkitään kuusi lisäputkea laimennuksin 1:4 - 1:128 sekä näytteen tunnuksella, että myös "A":lla tai "B":llä.

h. Kuhunkin putkeen lisätään 200 μ l tarkistustestilaimenninta, mukaan luettuna putket, jotka sisältävät potilaan näytteen ja ihmisen antiseerumia tai normaalia ihmisseerumia, ts. alkuperäisiin "A"- ja "B"-putkiin laimentamalla ne suurinpiirtein suhteeseen 1:2.

i. Tehdään kaksinkertaiset laimennukset siirtämällä 200 μ l, käyttäen erillisiä mikropipettisuokappaleita kutakin putkea varten ja sekoittamalla hyvin ennen näytteiden poistamista.

j. Testataan 120 μ l kustakin putkesta käyttäen seulontareagensseja ja -menetelmiä.

k. Sarjassa "B" (näyte ja normaali ihmisseerumi) täytyy tiitterin olla neljä kertaa (2 putkea) suurempi kuin sarjassa "A" (näyte ja neutraloiva hepatitikseen liittyvä vasta-aine (ihmisen), jotta näytettä voitaisiin pitää spesifisenä hepatitis B pinta-antigeenille positiivisena). Tapauksissa, joissa sekä "A" että "B"-tiitteri on suurempi kuin 1:128, täytyy laimentamista jatkaa edelleen, kunnes pääpiste on määritetty.

Koska jotkut näytteet, jotka sisältävät reumafaktoria reagoivat lateksi-reagenssin kanssa, on välttämätöntä erottaa ne näytteet, jotka sisältävät sekä hepatitis B pinta-antigeeniä ja reumafaktorin.

Reumafaktorin läsnäolo voidaan määrittää testaamalla seerumi reumafaktorin absorboivalla reagenssilla (ihmisen gammaglobuliinilla päällystetty lateksi) sekoittamalla 120 μ l näytettä ja 1 pisara absorboivaa reagenssia muovisyvennyksessä ja sekoittamalla 5 minuuttia.

Jos näyte sisältää reumafaktorin, se voidaan absorboida erilleen lisäämällä 720 μ l näytettä 10 x 75 mm:n koeputkeen ja lisäämällä 6 pisaraa absorboivaa reagenssia putkeen. Sekoitetaan hyvin ja inkuboidaan huoneen lämpötilassa 15 minuuttia. Lingotaan kierrosnopeudella 3000 r/min. 5 minuuttia. Tarkistava neutraloimisprosessi suoritetaan absorboidulla näytteellä kuten yksityiskohtaisemmin edellä esitettiin.

Puhdistetun vasta-aineen valmistus hepatitis B pinta-antigeenille

Marsuja immunoidaan hepatitis B pinta-antigeenillä, joka on puhdistettu US-patenttijulkaisussa 3 838 144 kuvatulla menetelmällä.

Alkuimmunointia antigeenillä Freund'in apuaineessa marsujen jalkojen polkukänsiin seuraa kaksi vatsaontelonsisäistä rokotusta antigeenillä ilman apuainetta. Immunoiduista eläimistä kerätyt seerumit kootaan yhteen, minkä jälkeen tarvittaessa poistetaan jäljellejäänyt ihmisseerumi-proteiineille spesifinen vasta-aine saattamalla anti-seerumi kosketukseen normaalin ihmisseerumin kanssa. Gammaglobuliini puhdistetaan sitten saostamalla 14 paino/tilav.-%:isella vesipitoisella natriumsulfaatilla, dialysoidaan vesipitoista, fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta vastaan ja lämmitetään edullisesti 56°C:ssa n. 30 minuuttia komplementin hävittämiseksi.

Puhdistettu seerumi sekoitetaan ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeeniä, inkuboidaan 37°C:ssa 1 tunti ja sitten yli yön 4°C:ssa. Näin muodostunut antigeeni-vasta-aine-saostuma pestään sitten kahdesti kyl-

mässä fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa, jotta suurin osa jäljelle jääneistä ei-spesifisistä proteiineista saadaan poistetuksi. Antigeeni-vasta-aine-saostuma liuotetaan sitten kylmään 0,2M etikkahappoon, jossa on 2 % sakkaroosia, pH 2,3 tai kaatrooppisia ioneja sisältävään liuokseen. Dissosioituneet antigeenit ja vasta-aineet erotetaan linkoamalla kierrosluvulla 25 000-28 000 r/min 12-15 tunnin ajan tai kierrosluvulla 30 000 r/min 4 tunnin ajan jatkuvalla 10-40 %:n sakkaroosigradientilla Beckman TI-15 vyöhykeroottorilla. Roottori tyhjennetään pumpaamalla sisään 50 % sakkaroosia gradientin muuttamiseksi ja 20 ml:n jakeista määritetään U.V.-absorptio 1 cm:n kennossa 280 nm:ssä ja huippujakeet kootaan, jolloin saadaan, spesifinen vasta-ainejae, joka sitten neutraloidaan 0,1 N NaOH:lla. Vasta-ainejae väkevöidään alkuperäiseen seerumitilavuuteen ja sitä dialysoidaan yli yön glysiinillä puskuroitua suolaliuosta vastaan. Puhdistettu vasta-aine titrataan sitten ja standardoidaan.

Vasta-aine laimennetaan optimaalisesti valmistamalla pieniä eriä diagnostista reagenssia, joilla on eri vasta-ainelaimennukset ja nämä testataan ihmisseerumeilla, joiden tiedetään sisältävän hepatitis B pinta-antigeenia. Laimennus, jolla saadaan paras tulos, valitaan diagnostisen reagenssin valmistusta varten.

Diagnostisten reagenssien valmistus

Esimerkki I

30 paino/tilav.-%:inen vesipitoinen suspensio, jossa on Dow Chemical'in valmistamia 0,23 μ m:n polystyreenipallosia, laimennetaan 8 paino/tilav.-%:iseksi glysiinillä puskuroidulla suolaliuoksella ja dialysoidaan glysiinillä puskuroitua suolaliuosta vastaan yli yön. Se lisätään sitten välittömästi 9-kertaiseen tilavuusmäärään puhdistettua marsun anti-seerumia, joka sisältää vasta-ainetta hepatitis B pinta-antigeenille (laimennettu 0,05 paino/tilav.-%:iseksi) ja sekoitetaan jatkuvasti 30 minuuttia. Yksi tilavuusosa naudan seerumi-albumiinia (1 % paino/tilav.) lisätään sitten ja lopuksi natriumatsidia, jolloin lopullisen tuotteen väkevyydeksi saadaan 0,1 paino/tilav-%.

Esimerkki II

30 paino/tilav.-% suspensio, jossa on polystyreenipallosia (0,05 - 2,0 μ) laimennetaan 8-%:iseksi glysiinillä puskuroidulla suolaliuoksella ja steriloidaan lisäämällä hypokloriittiliuosta. Sitä dialysoidaan sitten glysiinillä puskuroitua suolaliuosta vastaan hypokloriitin poistamiseksi. Se lisätään sitten 9-kertaiseen tilavuusmäärään sopivasti laimennettuja, puhdistettuja

hepatitis B pinta-antigeenille spesifisiä vasta-aineita. Polystyreenisuspensio lisätään hitaasti ja sekoittaen, jatkaen sekoittamista 1 tunnin ajan. Polystyreenipalloset lingotaan, pestään kahdestilingossa puskuroidulla suolaliuoksella ja suspendoidaan uudestaan alkuperäiseen tilavuuteen puskuroitua suolaliuosta. Naudan seerumialbumiinia lisätään sekoittaen 30 minuutin ajan. 0,1 tilavuusosaa immunoидуista marsuista eristettyä normaaliseerumia (laimennettu suhteeseen 1:3,5 glysiinillä puskuroidulla suolaliuoksella) lisätään ja seosta sekoitetaan jälleen 30 minuuttia. Lopuksi seosta ravistellaan voimakkaasti aggregaattien hajoittamiseksi. Kaikki käytetyt liuokset steriloidaan suodattamalla ja ne sisältävät 0,1 paino/tilav.-% natriumatsidia säilöntäaineena.

Esimerkki III

Valmistetaan positiivinen vertailuseerumi yhdistetyistä tunnetuista hepatitis B pinta-antigeenille positiivisista ihmisseerumeista. Seerumia lämpökäsitellään sitten 60°C:ssa n. 10 tunnin ajan virustarttuvuuden hävittämiseksi ja laimennetaan sitten kaksinkertaiseksi sarjaksi normaalissa ihmisseerumissa. Käytettävä laimennus on se, joka antaa selvän I+reaktion esimerkin I tai esimerkin II lateksireagenssin kanssa. Se steriloidaan suodattamalla ja pannaan sterileihin säiliöihin.

Esimerkki IV

Negatiivinen vertailuseerumi valmistetaan laimentamattomasta ihmisseerumista, joka on osoittautunut negatiiviseksi hepatitis B pinta-antigeenille esimerkin I tai esimerkin II lateksireagenssilla ja radioimmunomäärityksillä. Se steriloidaan suodattamalla ja pannaan steriileihin säiliöihin.

Esimerkki V

Ihmisen verinestettä, joka sisältää vasta-aineita hepatitis B pinta-antigeenille, titrataan geelidiffuusion avulla ja muutetaan seerumiksi lisäämällä kalsiumkloridia ja naudan trombiinia. Gammaglobuliinia valmistetaan sitten seerumista saostamalla 16 paino/tilav.-%:isella natriumsulfaatilla. Saostuma pestään 14 paino/tilav.-%:isessä natriumsulfaatissa, sitä dialysoidaan yli yön vähämolaarista fosfaattipuskuria vastaan, minkä jälkeen se johdetaan DEAE-selluloosan läpi, joka on etukäteen tasapainoitettu samalla puskurilla. Puhdistettu gammaglobuliini standardoidaan sitten väkevöimällä ja dialysoimalla fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta vastaan. Se steriloidaan sitten suodattamalla ja pannaan steriileihin säiliöihin.

Esimerkki VI

Puhdistetun ihmis-gammaglobuliinin standardiliuos glysiinillä puskuroidussa suolaliuoksessa lisätään suspensioon, jossa on 0,2 μm :n polystyreenilateksia ja kuumennetaan 57°C:ssa 15 minuuttia. Suspensio, jota käytetään absorboimaan reumafaktori testiseerumeissa, laimennetaan glysiinillä puskuroidussa suolaliuoksessa ja pannaan steriileihin säiliöihin.

Esimerkki VII

Tarkistustestilaimennin valmistetaan laimentamalla liuos, jossa on 30 paino/tilav.-% naudan seerumialbumiinia, fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella 5 paino/tilav.-%:n proteiiniväkevyyteen. Liuos steriloidaan sitten suodattamalla ja pannaan steriileihin säiliöihin.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä hepatitis B pinta-antigeenin toteamiseksi ihmisverestä, jolloin verinäyte, josta punaiset verisolut on poistettu, sekoitetaan diagnostiseen koostumukseen, joka muodostuu vesisuspensiosta, jossa on käytännöllisesti katsoen samanlaisia pallomaisia polystyreenihiukkasia, joiden halkaisija on 0,05-2,0 μm ja jotka on päällystetty puhdistetulla hepatitis B pinta-antigeenille spesifisellä vasta-aineella, jolloin tämä vasta-aine on eristetty sellaisten marsujen seerumista, jotka on immunisoitu puhdistetulla ihmisverestä eristetyllä hepatitis B pinta-antigeenilla ja jolloin tämä vasta-aine ei sisällä muita ihmisseerumiproteiineille spesifisiä vasta-aineita, ja jolloin vesisuspensio sisältää myös liuenneena normaalia marsun seerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta ja jolloin polystyreenihiukkaset on päällystetty sellaisella määrällä mainittua vasta-ainetta, joka juuri estää hiukkasten aggregoitumisen itsestään, ja verinäytteen ja suspension seoksesta tutkitaan, tapahtuuko siinä agglutinoitumista, t u n n e t t u s i i t ä, että

(a) polystyreenihiukkasten päällystykseen käytetty vasta-aine on puhdistettu tunnetulla tavalla saattamalla antigeeni/vasta-ainekompleksin liuos, joka on valmistettu sekoittamalla vasta-ainetta sisältävää marsun seerumia ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeenille spesifisiä antigeenipitoisia vasta-aineita, kosketukseen tiheysgradientin sisältävän nestemäisen väliaineen tiheämmän pään kanssa, minkä jälkeen nestemäinen väliaine ultrasentrifugoidaan, kunnes seerumikomponenttien jakautuminen tiheysgradienttiin on saavuttanut tasapainotilan, ja sen jälkeen hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta sisältävät fraktiot erotetaan,

(b) kaikki verinäytteet, joissa havaitaan agglutinoitumista, neutraloidaan sekoittamalla niihin ihmisen hepatitukseen sidottua vasta-ainetta,

(c) vaiheesta (b) saaduista näytteistä erotetaan reumafaktori sekoittamalla näytteet lateksipallojen kanssa, jotka on päällystetty ihmisen gamma-globuliinilla, ja pallot yhdessä niihin absorboituneen reumafaktorin kanssa erotetaan, ja

(d) mainitut näytteet, joissa agglutinoitumista on havaittu, sekoitetaan uudestaan mainittuun diagnostiseen koostumukseen.

2. Testipakkaus patenttiyaatimuksen 1 mukaista hepatitis B pinta-antigeenin toteamismenetelmää varten, joka koostuu muovilevyistä, joilla testit suoritetaan, sekä reagenssipulloista, jotka käsittävät:

(a) reagenssipullon, joka sisältää diagnostista koostumusta, jossa on vesipitoisessa suspensiossa 0,1-3 paino/tilavuus-% käytännöllisesti katsoen samanlaisia pallon muotoisia polystyreenihiukkasia, joiden halkaisija on 0,05-2,0 μm ja jotka on päällystetty puhdistetulla hepatitis B pinta-antigeenille spesifisellä vasta-aineella, jolloin vasta-aine on valmistettu sellaisen marsun seerumista, joka on immunoitu puhdistetulla ihmisverestä eristetyllä hepatitis B pinta-antigeenilla ja joka ei sisällä muita ihmisen seerumiproteiineille spesifisiä vasta-aineita, jolloin vesipitoinen suspensio sisältää myös liuenneessa muodossa 2-5 tilavuus-% kokonaissuspension määrästä laskettuna normaalia marsun seerumia, joka ei sisällä hepatitis B pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta, ja jolloin polystyreenihiukkaset on päällystetty sellaisella määrällä mainittua vasta-ainetta, joka juuri riittää estämään hiukkasten aggregoitumisen itsestään,

(b) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen positiivista vertailuseerumia,

(c) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen negatiivista vertailuseerumia ja

(d) reagenssipullon, joka sisältää fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta, jossa on 5 % naudan seerumialbumiiniproteiinia, t u n n e t t u siittä, että reagenssipullossa (a) käytetty vasta-aine, jolla polystyreenihiukkaset päällystetään, on puhdistettu tunnetulla tavalla saattamalla antigeeni/vasta-aine-kompleksin liuos, joka on valmistettu sekoittamalla vasta-ainetta sisältävää marsun seerumia ihmisseerumiin, joka sisältää hepatitis B pinta-antigeenille spesifisiä antigeenipitoisia vasta-aineita, kosketukseen tiheysgradientin sisältävän vesipitoisen väliaineen tiheimmän pään kanssa, minkä jälkeen vesipitoinen väliaine ultrasentrifugoidaan, kunnes seerumikomponenttien jakautuminen tiheysgradienttiin on saavuttanut tasapainotilan, ja sen jälkeen hepatitis B-pinta-antigeenille spesifistä vasta-ainetta sisältävät fraktiot erotetaan, ja jolloin reagenssipullot käsittävät lisäksi:

(e) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen hepatitukseen sidotun vasta-aineen vesiliuosta, ja

(f) reagenssipullon, joka sisältää ihmisen gamma-globuliinilla päällystettyjen lateksipallojen vesisuspensiota.

Patentkrav:

1. Förfarande för påvisande av hepatitis B ytantigen i människoblod, varvid ett blodprov, från vilket de röda blodkropparna har avlägsnats, blandas med en diagnostisk sammansättning, vilken består av en vattensuspension som innehåller praktiskt taget likadana kulformiga polystyrenpartiklar med en diameter av 0,05-2,0 μm och belagda med en renad antikropp specifik mot hepatitis B ytantigen, varvid denna antikropp har isolerats ur serum av marsvin, vilka har immuniserats med renat hepatitis B ytantigen isolerat ur människoblod och varvid denna antikropp inte innehåller andra antikroppar specifika mot människoserumsproteiner, och varvid vattensuspensionen även innehåller i löst form normalt marsvinserum, vilket inte innehåller en antikropp specifik mot hepatitis B ytantigen och varvid polystyrenpartiklarna har belagts med en sådan mängd av nämnda antikropp, som just är tillräcklig för att förhindra autoaggregation av partiklarna, och blandningen av blodprovet och suspensionen undersöks, huruvida däri förekommer agglutination, k ä n n e - t e c k n a t därav, att

(a) antikroppen, som har använts som beläggningsmedel av polystyrenpartiklarna, har renats på ett känt sätt genom att bringa en lösning av antigen/antikropp-komplexet, som har framställts genom att blanda marsvinserum innehållande antikroppen med människoserum, vilket innehåller antigenhaltiga antikroppar specifika mot hepatitis B ytantigen, i kontakt med ändan med den större tätheten av ett flytande medium innehållande en täthetsgradient, varefter det flytande mediet ultracentrifugeras, tills distributionen av serumkomponenterna i täthetsgradienten har nått jämviktstillstånd, och därefter separeras fraktionerna, vilka innehåller antikroppen specifik mot hepatitis B ytantigen.

(b) alla blodprov, vari agglutination observeras, neutraliseras genom att blanda dem med en till människans hepatitis bunden antikropp,

(c) från proven erhållna i steget (b) separeras reumafaktorn genom att blanda proven med latexkulor, vilka har belagts med människans gammaglobulin, och kulorna tillsammans med reumafaktorn absorberad däri separeras, och

(d) de nämnda proven vari agglutination observerats, återblandas med den nämnda diagnostiska sammansättningen.

2. Testförpackning för förfarandet för påvisande av hepatitis B ytantigen enligt patentkravet 1, vilken består av plastskivor, på vilka testerna utförs, samt reagensflaskor, vilka omfattar:

(a) en reagensflaska, vilken innehåller en diagnostisk sammansättning, vilken består av en vattensuspension som innehåller 0,1-3 vikt-volym-% praktiskt taget likadana kulformiga polystyrenpartiklar med en diameter av 0,05-2,0 μm och belagda med en renad antikropp specifik mot hepatitis B ytantigen, varvid antikroppen har isolerats ur serum av marsvin, vilka har immuniserats med renat hepatitis B ytantigen, som har isolerats ur människoblod och som inte innehåller andra antikroppar specifika mot människoserumsproteiner, och varvid vattensuspensionen även innehåller i löst form 2-5 volym-% av normalt marsvinserum, beräknat på totalsuspensionen, vilket inte innehåller en antikropp specifik mot hepatitis B ytantigen, och varvid polystyrenpartiklarna har belagts med en sådan mängd av nämnda antikropp som är just tillräcklig för att förhindra autoaggregation av partiklarna,

(b) en reagensflaska, vilken innehåller positivt människokontrollserum,

(c) en reagensflaska, vilken innehåller negativt människokontrollserum,

och

(d) en reagensflaska, vilken innehåller fosfatbuffrad saltlösning med 5 % nötserumalbuminprotein, k ä n n e t e c k n a d därav, att antikroppen, vilken har använts i reagensflaskan (a) och med vilken polystyrenpartiklarna har belagts, har renats, på ett känt sätt genom att bringa en lösning av antigen/antikropp-komplexet, som har framställts genom att blanda marsvinserum innehållande antikroppen, med människoserum, vilket innehåller antigenhaltiga antikroppar specifika mot hepatitis B ytantigen, i kontakt med ändan med den större tätheten av ett flytande medium innehållande en täthetsgradient, varefter det vattenhaltiga mediet ultracentrifugeras, tills distributionen av serumkomponenterna i täthetsgradienten har nått jämviktstillståndet, och därefter separeras fraktionerna, vilka innehåller antikroppen specifik mot hepatitis B ytantigen,

och varvid reagensflaskorna vidare omfattar:

(e) en reagensflaska, vilken innehåller en vattenlösning av en till människans hepatitis bunden antikropp, och

(f) en reagensflaska, vilken innehåller en vattensuspension av latexkuler belagda med människans gammaglobulin.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: Suomi-Finland(FI) 55 408 (G 01 N 33/16).
USA(US) 3 838 144 (A 61 k 23/02).