



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU** 60449  
**UTLÄGGNINGSSKRIFT**

C (45) Patentti myönnetty 11 01 1932  
Patent meddelat

(51) Kv.lk.<sup>3</sup>/Int.Cl.<sup>3</sup> G·01 N 33/50

**SUOMI—FINLAND**

**(FI)**

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus — Patentansöknin	763646
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	20.12.76
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	20.12.76
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	23.06.77
(44) Nähtävääksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.09.81
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	22.12.75

Italia-Italien(IT) 9660 A/75

(71) Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano "SCLAVO" S.p.A.,  
Via Fiorentina 1, Siena, Italia-Italien(IT)

(72) Antonio Ricci, Siena, Italia-Italien(IT)

(74) Antti Impola

(54) Menetelmä antistreptolysiini-arvon mittaamiseksi ihmisverenäytteissä  
ja välineistö sitä varten - Förfarande för mätning av antistreptoly-  
cin-värdet i prov av människoblod och redskap för detsamma

O-streptolysiini (O-S) on proteiinityyppinen toksiini, jota erittää A-ryhmän tietyt streptokokit. Tämä toksiini tappaa koe-eläimiä, tuhoaa soluviljelmiä, liuottaa useiden eläinlajien veren punasoluja ja valkosoluja.

Eräät hapetusaineet estävät tämän toksiinin liuotuskyvyn. Toksiinin molekyyleissä on sulfhydryyli-ryhmiä -SH, jotka tällöin muuttuvat disulfidiryhmiksi -S-S-. Lisäämällä pelkistysainetta, kuten merkaptoetanolia, palautuvat -SH-ryhmät. Nämä kaksi reaktiota on esitetty kuviossa 1, jossa O-streptolysiiniä (O-S) on osoitettu geometrisellä kuviolla 1, jossa on pystyviivoitus.

Punaisten verisolujen hemolyysi inkuboituna toksiinin kanssa 37°C:ssa tapahtuu vain, jos O-S on pelkistyneessä muodossaan, s.o. siinä on SH-ryhmiä, koska hapetettu toksiini ei voi vaikuttaa ryhmillä -S-S- punasolujen solulimakalvoon. Kalvoreseptori on identifioitu kolesteroliksi. Kuviot 2 ja 3 osoittavat graafisesti tätä ilmiötä, jolloin viitenumero 3 osoittaa solulimakalvoa merkittynä ristiviivoituksella, kun taas viitenumero 5 osoittaa kalvo-reseptori-kolesterolia. Vain sellaiset O-S:n molekyylit, jotka ovat sitoutuneet kalvo-reseptoreihin (katso kuvioita 2), vaikuttavat toisiinsa kuten on osoitettu kuviossa 3 ja järjestäytyvät pyöreiden kanavien tai reikien muotoon; hemoglobiini 7, joka on merkitty pis-

teillä kuviossa 3, poistuu mainittujen reikien tai muiden alueiden kautta, joissa lipoidit järjestyvät uudelleen kolesterolihäviön johdosta.

Kun O-S:ää inkuboidaan punasolujen kanssa  $+4^{\circ}\text{C}$ :ssa todetaan tässä lämpötilassa O-S:n vaikuttavan punasolujen kolesterolia vastaan, mutta mitään liukenemista ei tapahdu, koska toksiini-molekyylien välinen vaikutus on lämpötilasta riippuvainen. Hemolyysiä esiintyy mikäli järjestelmä saatetaan  $37^{\circ}\text{C}$ :seen. Jos anti-O-S (antistreptolysiini)-vasta-aineita lisätään järjestelmään  $+4^{\circ}\text{C}$ :ssa ja sen jälkeen lämpötila nostetaan  $37^{\circ}\text{C}$ :seen ei todeta mitään hemolyysiä. Tämä johtuu seuraavasta:

O-S:n funktionaaliset ryhmät, joiden tehtävänä on vaikuttaa toisiinsa, on suojattu vasta-aineilla. Tämä ilmiö on graafisesti esitetty kuviossa 4, jossa anti-O-S-vasta-aineita on merkitty kuviolla 9.

Jos hapetettua O-S:ää inkuboidaan punasolujen kanssa  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa ei esiinny mitään hemolyysiä. Itse asiassa hapetettu O-S ei voi tarttua kiinni kalvo-reseptoreihin 5 (katso kuviota 2). Lisättäessä anti-O-S-vasta-aineita 9 nämä sitoutuvat hapetettuun O-S:ään ja saadaan kuvion 5 mukaiset olosuhteet.

Lisättäessä järjestelmään pelkistysaineita sulfhydryyliryhmät -SH palautuvat takaisin, mutta mitään hemolyysiä ei tapahdu, koska O-S:n funktionaaliset ryhmät, joiden tehtävänä on vaikuttaa toisiinsa, on suojattu vasta-aineilla 9 (katso kuviota 4).

Edellä esitetty ilmenee seuraavista tieteellisistä kirjoituksista:

- 1) Howard, J.F., Wallace, M.R.: Brit. J. Exp.Path. 34, 181 (1953);
- 2) Rants, L.A., Randall, R.: Proc.Sec. Ecp.Biol.Med. (N.Y.) 59, 22, (1945);
- 3) Alan, J.E., Raymond, M.: Ann. Inst. Pasteur, 114, (1968).

Tunnetaan jo kauan sitten diagnostinen menetelmä läsnäolevien O-antistreptolysiini-vasta-aineiden pitoisuuden määrittämiseksi.

Erikoisesti on kaupallisesti saatavissa diagnostinen välineistö, jonka avulla voidaan mitata antistreptolysiini-vasta-aineet potilaiden veriherassa, joka välineistö käsittää seuraavat aineet reaktiota varten: Tutkittava verihera, kirkas ja inaktivoitu  $56^{\circ}\text{C}$ :ssa 30 minuuttia; fysiologinen liuos puskuroituna pH-arvoon 6,5; kaniinin punasolujen 5 %:nen suspensio; pelkistetty O-S, joka on tarkalleen titrattu lyofiilissä tilassa.

Tutkittavan veriheran progressiivisesti kasvavia laimennuksia

inkuboidaan 37 °C:ssa 15 minuuttia O-S:n muuttumattoman määrän kanssa. Mikäli vasta-aineita on läsnä niin vasta-aineiden vaikutus O-S:ää vastaan tapahtuu tässä vaiheessa, jolloin O-S:n hemolyyttinen aktiviteetti neutraloituu. Tämän käsittelyn päätyttyä lisätään 5 % punasoluja puskuroidussa liuoksessa, sekoitetaan ja inkuboidaan 37 °C:ssa 40 minuuttia, sen jälkeen sentrifugoidaan 2,000 kierrosta minuutissa ja pinnalla olevat nesteet luetaan. Veriheran vasta-aine-pitoisuudet ilmoitetaan sen korkeamman verihera-laimennuksen käänteisarvona, joka estää O-S:n hemolyyttisen aktiviteetin.

Tällä menetelmällä, joka olennaisesti käsittää järjestelmään lisättyjen punasolujen hemolyysin määrittämisen mahdollisella ylimäärällä O-streptolysiiniä, jonka on annettu ennakolta reagoida veriheran näytteen kanssa, josta on poistettu täydentävät alkuaineet ja joka on otettu potilaalta, on muunmuassa seuraavat haitat:

1) tarvitaan tuoretta veriheraa, josta on poistettu täydentävät alkuaineet, 56 °C:ssa 30 minuuttia (nämä vaatimukset edellyttävät potilaan veren ottamista, sen seisottamista huoneen lämpötilassa 2 tuntia, koagulaatin erottamista veriherasta ja sen sentrifugoimista, veriheran inaktivoimista 56 °C:ssa 30 minuutin ajan);

2) on välttämätöntä käyttää ihmisen punasoluja (O Rh + ryhmä) tai kaniinin soluja, pestä ja laimentaa 5 %:seksi (hankalia pesukäsittelyjä);

3) tekniikka on vaivalloinen (erikoisesti veriheran laimentaminen, O-streptolysiinin ja punasolujen lisääminen laimennettuun veriheraan );

4) titrausta varten tarvitaan tietty lukumäärä hyvin pestyjä pipettejä ja koeputkia.

**Keksinnön mukaisessa uudessa menetelmässä käytetään hyväksi seuraavia tunnettuja periaatteita:**

hapetettu O-S ei kykene sitomaan itseään punasoluihin (kuvio 2) vaan on yhteydessä spesifisiin vasta-aineisiin (kuvio 5), ja hapetettu O-S pelkistämisen jälkeen saavuttaa uudelleen hemolyyttisen voimansa (kuvio 3).

Keksinnön mukaisesti reaktio suoritetaan käyttämällä potilaan käsittelemätöntä verta ja käyttämällä hyväksi siinä läsnäolevia punasoluja detektoreina. O-S:ää käytetään hapetettuna ja siten se ei kykene sitoutumaan punasoluihin. Kun hapetettu O-S saatetaan kosketukseen potilaan veren kanssa, niin mikäli anti-O-S-vasta-aineita on läsnä, tapahtuu O-S:n neutralisoitumisreaktio ilman vaikutusta kalvoon. Sen

jälkeen lisätään pelkistysainetta, joka juuri pelkistää toksiinin hapetetut sulfhydryylit (-S-S-) ja saattaa takaisin -SH-sulfhydryylit, jolloin viimeksi mainitut voivat kiinnittyä punasoluihin. Tässä vaiheessa voi esiintyä kaksi tapausta:

A) O-S ei sitoudu vasta-aineisiin johtuen siitä, ettei niitä ole läsnä: mikäli asianlaita on näin niin O-streptolysiini sen jälkeen kun se on pelkistetty voi kiinnittyä punasoluihin ja organisoida punasolujen kalvon uudelleen ja muodostaa molekyylin sisäisiä ketjuja, jolloin tapahtuu hemolyysi, joka on helposti todettavissa.

B) O-S sitoutuu tutkittavassa veressä (tai veriherassa) oleviin vasta-aineisiin. Tässä tapauksessa sitoutumisen jälkeen suoritettava pelkistäminen voi mahdollisesti saattaa O-S:n kiinnittymään punasolujen solukalvon vapaisiin sulfhydryyli-asemiin, mutta ei aikaansaa molekyylin sisäisten ketjujen muodostumista, eikä siten punasolu-kalvon uudelleen järjestäytymistä eikä aiheuta hemolyysiä.

Edellä esitetyn perusteella ja tarkemmin sanottuna keksinnön toisena kohteena on aikaansaada väline veren anti-streptolysiiniarvon määrittämiseksi, joka väline käsittää: hapetetun O-streptolysiinin muodostama perustuote ennakolta valikoiduissa väkevyyksissä, pelkistysaine O-streptolysiinin hemolyyttisen kyvyn uudelleen palauttamiseksi perustuen sulfhydryyli-ryhmiin -SH, ja laimennusaineen potilaan verta varten.

Erikoisesti väline käsittää: hapetetun O-streptolysiinin useita säiliöitä liuottimen kanssa ja/tai yhtäläisten verinäytteiden kanssa, laimennuksien pienetessä asteittain, laimennetun veren näytteitä varten, joilla on muuttumaton tilavuus.

Keksinnön ensimmäisenä kohteena on aikaansaada menetelmä anti-streptolysiini-arvon määrittämiseksi, jonka mukaan hapetettu ja pelkistettävissä oleva O-streptolysiini saatetaan kosketukseen verinäytteiden kanssa ja sen jälkeen käsitellään pelkistysaineella O-streptolysiinin hemolyyttisen kyvyn palauttamiseksi.

Erikoisesti keksinnön mukaisesti menetellään siten, että säiliöihin, jotka sisältävät hapetettua O-streptolysiiniä asteittaisina laimennuksina, lisätään tutkittavan veren yhdenmukaisia annosyksiköitä, jotka on tarkalleen siten laimennettu, että jokaiseen säiliöön lisätään pelkistysainetta O-streptolysiinin hemolyyttisen kyvyn palauttamiseksi ja hemolyysin aikaansaamiseksi ja että ilmiötä arvostellaan eri säiliöissä inkuboimisen jälkeen.

Laajalti esitettynä esillä olevalla keksinnöllä on aikaansaatu menetelmä antistreptolysiini-arvon mittaamiseksi ihmisverinäytteestä, jolle menetelmälle on tunnusomaista seuraavat vaiheet:

- a) valmistetaan joukko liuoksia, jotka sisältävät hapetettua O-streptolysiiniä erilaisissa väkevyyksissä;
- b) valmistetaan pelkistysaineen liuos, jolloin pelkistysaineena on tioli, natriummetabisulfiitti tai natriumsulfiitti;
- c) laimennetaan verinäyte sopivalla ei-hemolyyttisellä liuoksella;
- d) lisätään laimennetun veren yhtä suuri tilavuus kuhunkin kohdan a) mukaan valmistettuun liuokseen;
- e) inkuboidaan kohdan d) mukaan saatuja liuoksia lämpötilassa, joka vaihtelee huoneenlämpötilasta ( $18-21^{\circ}\text{C}$ )  $50^{\circ}\text{C}$ :seen, noin 15 minuuttia;
- f) lisätään inkuboituun liuokseen e) mitattu tilavuus kohdan b) mukaan saatua liuosta;
- g) inkuboidaan liuosta f) lämpötilassa, joka vaihtelee huoneenlämpötilasta  $50^{\circ}\text{C}$ :seen, sellaisen ajan, joka tarvitaan punasolujen laskeuttamista varten; ja
- h) todetaan näyte-säiliöt, joissa ei ole tapahtunut mitään hemolyysiä.

Keksinnön mukaisen menetelmän edut verrattuna nykyisin käytettävään klassilliseen menetelmään ovat ilmeisiä ja pääedut ovat seuraavat:

- 1) Tekniikan yksinkertaistuminen, koska ei enää tarvitse erottaa veriherää verestä tai poistaa veriherästä sen täydentäviä aineita; käsittelyjen ja siten analyysyjä varten tarvittavan ajan olennainen väheneminen.
- 2) Vapautuminen punasolujen käytöstä, joiden valmistus rajoittaa huomattavasti menetelmää, johtuen vaikeudesta hankkia aine ja varastoida sitä ja vaikeudesta sen valmistamiseksi.
- 3) Sekä ajan että suorituskustannusten pieneneminen tuloksena käsittelyjen pienemmästä lukumäärästä ja mahdollisuudesta käyttää kouluttamatonta henkilökuntaa johtuen menetelmän suuresta yksinkertaisuudesta.
- 4) Mahdollisuutta käyttää koetta varten hyvin pieniä verinäytteitä, mikä seikka helpottaa näytteen ottoa sellaisissa tapauksissa, jotka muuten ovat vaikeita potilaiden spesifisten tilojen johdosta.

Lähtöaineet antistreptolysiini-arvon määrittämiseksi ovat seuraavat: potilaan veri sellaisenaan, laimennusliuos verta varten, hapetettu O-streptolysiini jaettuna säiliöihin (koeputket) erilaisina tunnettuina väkevyyksinä, pelkistysaineen, kuten orgaanisen pelkistysaineen, esim. tio-  
lien, kuten merkaptoetanolin, ditiotreitolin, systeinin, N-asetyyli-systeinin liuos, Epäorgaanisista pelkistysaineista mainittakoon esim. natriummetabisulfiitti.

Sen jälkeen kun potilaan verestä on valmistettu näytteitä (koska vain pieni määrä tarvitaan veri voidaan myös ottaa sormista tai korvalehdistä), suoritetaan laimennus käyttäen sopivaa laimennusliuosta, sen jälkeen pannaan pienet määrät (kuten 0,2 ml) kuhunkin säiliöön, jossa on jo läsnä lyofiilistä hapetettua O-streptolysiiniä las-  
kettu määrä.

Lyhyen inkuboimisajan jälkeen, esim. 15 minuutin kuluttua lämpötilassa, joka vaihtelee huoneenlämpötilasta 50 °C:seen, lisätään määrätty tilavuus pelkistysainetta ja inkuboimisen annetaan jatkua lämpötilassa, joka on huoneenlämpötilaan ja 50 °C:een välillä, riittävän ajan punasolujen laskeuttamista varten (esim. 1-2 tunti).

Käsittelyn päätyttyä hemolysoidut ja ei-hemolysoidut pintanes-  
teet luetaan käyttäen hyväksi läpinäkyvyyttä: todetaan säiliöt, joissa ei ole tapahtunut mitään hemolyysiä. Tutkittavien näytteiden vasta-  
aine-arvo ilmoitetaan antistreptolysiini-yksikköinä ml kohti viimeisen säiliön perusteella, jossa ei ole tapahtunut punasolujen hemolyysiä.

Vertailua varten verrataan seuraavassa kahta menetelmää, klassillisen menetelmän haittoja ja uuden menetelmän etuja.

### 1. Klassillisen menetelmän haitat

1.1. Tarvitaan tuoretta veriheraa, josta on poistettu täydentävät aineet, 56 °C:ssa 30 minuuttia (verinäytteen otto potilaalta, sen seisottamisen huoneen lämpötilassa 2 tuntia, koagulaatin erottaminen verestä ja sentrifugoiminen, veriheran inaktivoiminen 56 °C:ssa 30 minuuttia).

1.2. On suoritettava joukko laimennuksia veriherasta, jotka laimennukset jaetaan säiliöihin lisäämällä samalla vakiomäärä O-streptolysiiniä.

1.3. Tarvitaan ihmisen punasoluja (O Rh +) tai kaniinin punaso-

luja, jotka pestään ja laimennetaan 5 %:seksi (tarvitaan hankalia pesuvaiheita).

1.4. Käsittelyn työläisyys (O-streptolysiinin ja punasolujen lisääminen laimennettuun veriheraan).

1.5. Klassillisen titrauksen suorittaminen, jolloin tarvitaan tietty lukumäärä hyvin pestyjä pipettejä ja koeputkia.

## 2. Uuden menetelmän edut.

2.1. Veriheraa ei tarvitse erottaa, koska reaktio voidaan suorittaa käyttämällä verta, joka voidaan ottaa myös korvalehdistä tai sormista, koska sitä tarvitaan vain pieni määrä.

2.2. Tehdään verinäytteestä yksinkertainen laimennus ja määrätty vakiotilavuus sitä jaetaan kuhunkin säiliöön (valmistajan toimittama ja helppo käyttää), joka sisältää sopivan määrän toksiinia, jonka valmistaja on tarkasti mitannut ja joka on erilainen kussakin säiliössä. Siten ei tarvita työteliäitä laimennuksia ja veriheran jakamista kuten on laita klassillisessa menetelmässä.

2.3. Ei tarvita ihmisen tai kaniinin punasolujen lisäämistä, josta syystä ei myöskään tarvita pesukäsittelyjä, koska reaktiossa voidaan käyttää hyväksi punasoluja sellaisenaan kuin ne ovat potilaan veressä.

2.4. Toimenpiteet anti-O-streptolysiini-arvon saamiseksi on piennetty minimiin.

2.5. Mitään hankalaa välineistöä ei tarvita, koska kaikki mikä tarvitaan reaktiota varten voi sisältyä - mitä tulee kustannuksiin ja tarvittavaan tilaan - valmistajan jo toimittamaan välinepakkaukseen.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä antistreptolysiini-arvon mittaamiseksi ihmisverinäytteissä, t u n n e t t u s i i t ä, että se käsittää vaiheet:

a) valmistetaan joukko liuoksia, jotka sisältävät hapetettua O-streptolysiiniä erilaisissa väkevyyksissä;

b) valmistetaan pelkistysaineen liuos, jolloin pelkistysaineena on tioli, natriummetabisulfiitti tai natriumsulfiitti;

c) laimennetaan verinäyte sopivalla ei-hemolyyttisellä liuoksella;

d) lisätään laimennetun veren yhtä suuri tilavuus kuhunkin kohdan a) mukaan valmistettuun liuokseen;

e) inkuboidaan kohdan d) mukaan saatuja liuoksia lämpötilassa, joka vaihtelee huoneenlämpötilasta ( $18-21^{\circ}\text{C}$ )  $50^{\circ}\text{C}$ :een, noin 15 minuuttia;

f) lisätään inkuboituun liuokseen e) mitattu tilavuus kohdan b) mukaan saatua liuosta;

g) inkuboidaan liuosta f) lämpötilassa, joka vaihtelee huoneenlämpötilasta  $50^{\circ}\text{C}$ :een sellaisen ajan, joka tarvitaan punasolujen laskeuttamista varten; ja

h) todetaan näytesäiliöt, joissa ei ole tapahtunut mitään hemolyysiä.

2. Välineistö veren anti-streptolysiini-arvon määrittämiseksi, t u n n e t t u s i i t ä, että se käsittää: hapetetusta O-streptolysiinistä muodostetun perustuotteen ennakolta valikoiduissa väkevyyksissä, pelkistysaineen O-streptolysiinin hemolyyttisen kyvyn palauttamiseksi perustuen sulfhydryyliryhmiin -SH ja laimennusaineen potilaan verta varten.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen välineistö, t u n n e t t u s i i t ä, että se käsittää useita hapetetun O-streptolysiinin säiliöitä, jolloin annokset on mitattu siten, että liuottimen ja/tai yhtäläisten verinäytteiden avulla saadaan aikaan laimennusten progressiivisia sarjoja vakiotilavuuden omaavia verinäytteitä varten.

4. Patenttivaatimusten 2 ja 3 mukainen välineistö, t u n n e t t u s i i t ä, että pelkistysaineena on merkaptoetanoli, ditiotreitoli, kysteiini, N-asetyyli-kysteiini, natriummetabisulfiitti tai natriumsulfiitti.



PATENTKRAV

1. Förfarande för mätning av antistreptolysin-värdet i prov av människoblod, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v, att det omfattar:

a) framställning av ett antal lösningar vilka innehåller oxiderad O-streptolysin i olika koncentrationer;

b) framställning av en reduceringsämneslösning, varvid reduceringsämnet är tiol, natriummetabisulfit eller natriumsulfit;

c) utspädning av blodprovet med tillhjälp av en lämplig icke-hemolytisk lösning;

d) tillföring av lika stora volymer av utspätt blod i varje enligt punkt a) framställd lösning;

e) inkubation av lösningar resulterande från punkt d) vid en temperatur växlande mellan rumstemperatur ( $18^{\circ}$  -  $21^{\circ}$ C) och  $50^{\circ}$ C, ungefär 15 minuter;

f) tillsättning av en mätad volym av lösningen b) i den inkuberade lösningen e);

g) inkubation av lösningen f) vid en temperatur växlande mellan rumstemperatur och  $50^{\circ}$ C, så länge som krävs för sedimentation av röda blodceller; och

h) notering av provbehållarna i vilka ingen hemolys har ägt rum.

2. Redskap för mätning av blodets antistreptolysin-värde k ä n n e t e c k n a t d ä r a v, att det omfattar: en grundprodukt som är formad av oxiderad O-streptolysin i på förhand bestämda koncentrationer, ett reduceringsämne för återställning av O-streptolysinens hemolytiska förmåga grundande sig på sulfhydrylgrupperna -SH och ett utspädningsmedel för patientens blod.

3. Redskap enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v, att det omfattar flere behållare av oxiderad O-streptolysin, varvid doserna är mätade för att med tillhjälp av ett lösningsmedel och/eller likadana blodprov åstadkomma utspädningar i progressiva serier för blodprov med konstant volym.

4. Redskap enligt patentkraven 2 och 3, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v, att reduceringsämnet är merkaptoetanol, ditiotreititol, cystein, N-acetyl-cystein, natriummetabisulfit eller natriumsulfit.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

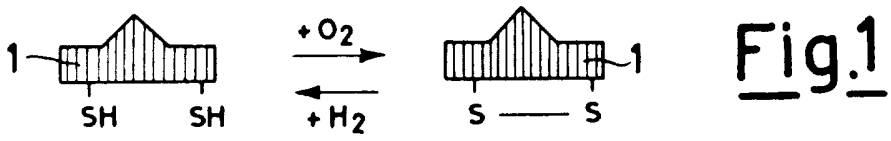


Fig.1

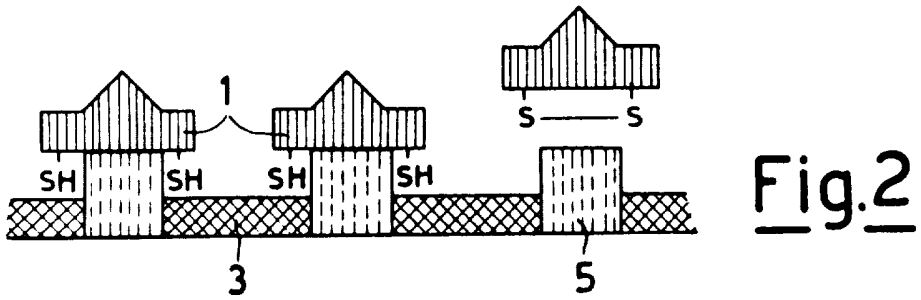


Fig.2

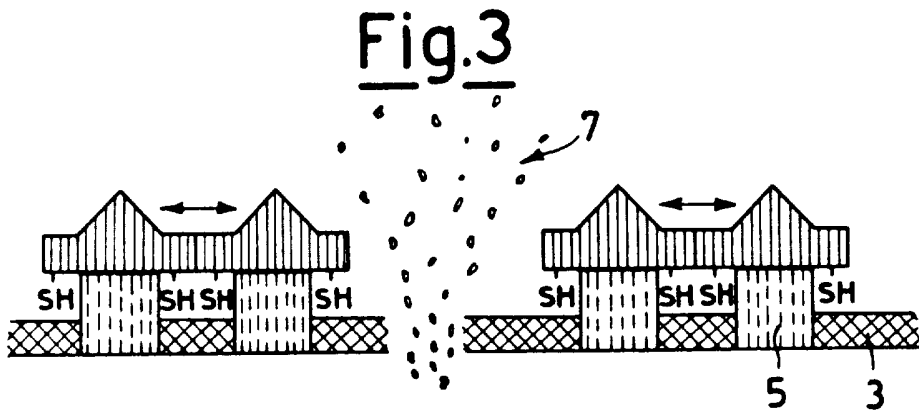


Fig.3

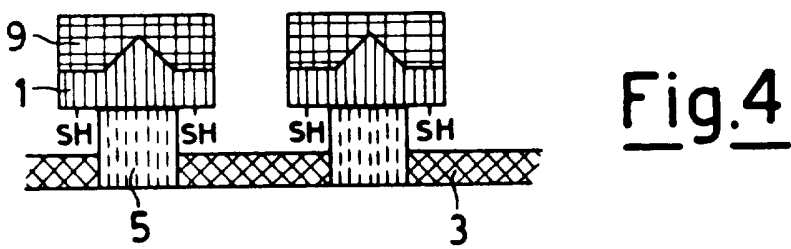


Fig.4

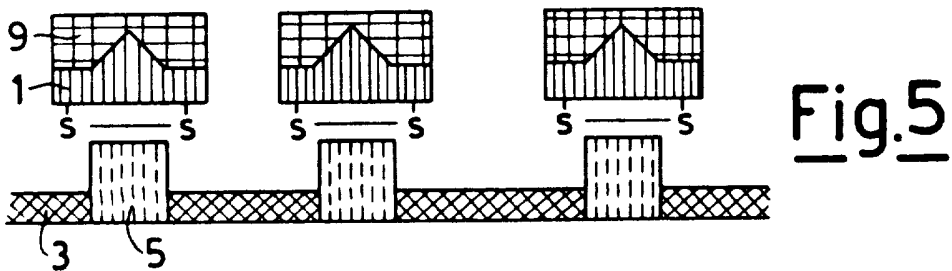


Fig.5