

(19) DANMARK



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166234 B

(21) Patentansøgning nr.: 2580/80

(51) Int.Cl.5 G 01 N 33/543

(22) Indleveringsdag: 17 jun 1980

(41) Alm. tilgængelig: 20 dec 1980

(44) Fremlagt: 22 mar 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 jun 1979 US 50269

(71) Ansøger: George R. \*Siber; 37 Corey Road; Brookline; Massachusetts 02146, US

(72) Opfinder: Samme

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Agglutineringsstest til påvisning af antigener

(56) Frømdragne publikationer

2580-80

(57) Sammen drag:

Diagnostisk reagens til brug ved afsløring af antigener i kliniske væsker, fremstilles ved at en mængde antigen indsprøjtes i et dyr af hesteslægten. Herefter udvindes og fortyndes det dannede antiserum med et fysiologisk fordrageligt buffersystem. Antiserumopløsningen blandes med en partikelsuspension, hvorefter der inkuberes og centrifugeres. Ikke adsorberet antiserum fradekanteres herefter, og bundfaldet opslættes i et fysiologisk fordrageligt buffersystem, hvorefter gencentrifugering og genopslætning i buffersystemet indeholdende ikke-immunt animalsk serum fra samme dyreart finder sted.

Agglutinationsprøven udføres ved, at reagenset blandes med en prøve klinisk væske og et buffersystem indeholdende en polyanion og et reduktionsmiddel. Agglutinationsgraden aflæses visuelt efter eventuel forudgående opvarmning af prøvesystemet.

Prøven har en følsomhed på så lidt som 0,2 nanogram antigen pr. ml klinisk væske.

DK 166234 B

Den foreliggende opfindelse angår en agglutinerings-  
test til afsløring af antigener i legemsvæsker som f.eks. se-  
rum, urin o.l. der er ejendommelig ved det i krav 1's  
kendetegnende del angivne. Ved den omhandlede test redu-  
5 ceres forekomsten af "falske" positive reaktioner ved ag-  
glutinationsprøverne væsentligt i forhold til de tidlig-  
ere kendte anvendte agglutinationsmetoder.

Afsløringen af mikrobielle antigener i legemsvæsker er af  
10 værdi til hurtig diagnose i et stadigt større tilfælde af  
infektioner. Imidlertid er hovedproblemet, at de tilgæn-  
gelige metoder for øjeblikket ikke er tilstrækkelig føl-  
somme (immunodiffusion, CIE), og de er derfor ikke i  
15 stand til at påvise tilstedeværelsen af antigener hos en  
stor del inficerede patienter, eller de er for langsomme  
til en hurtig diagnose (RIA, ELISA). I nogle tilfælde  
dannes antigen/antistofkomplekset langsomt, og/eller de  
dannede partikler er for små til med sikkerhed at kunne  
20 observeres. Aflæsningsnøjagtigheden er blevet forbedret  
ved at anvende agglutinationsprøver, hvor der anvendes  
partikler som bærestoffer på hvis overflade antigen-  
eller antistofmolekylet adsorberes eller bindes.

Disse agglutinationsprøver kan udføres ved den indirekte  
25 metode, ved hvilken den kliniske prøve blandes med anti-  
stof i en forud bestemt fortynding, hvorefter der efter  
en passende inkubationsperiode sættes et indikatorsystem  
bestående af et kompleks af antigenet bundet til et fin-  
delt bærestof til blandingen. Dersom antigen er til stede  
30 i den kliniske prøve, vil antistoffet ikke være i stand  
til at reagere med antigen/bærestofkomplekset, og der vil  
ikke ske nogen agglutination, hvorfor ingen agglutination  
er en positiv prøve for antigenet. Omvendt, hvis antige-  
net ikke er til stede i den kliniske prøve, vil antistof-  
35 fet reagere med antigen/bærestofkomplekset, hvorved der  
sker agglutination af indikatorprøven. Teorien for disse  
agglutinationsprøver er velkendt og er f.eks. omtalt i US

patenterne 3 171 783, 3 775 536, 3 873 683, 3 879 262,  
4 003 988 og 4 045 384.

5 Man har længe haft følelsen af, at den eneste metode af  
værdi til effektiv diagnose af infektionssygdomme er tid-  
lig, hurtig afsløring af antigener i forbindelse med det  
infektiøse agens, hvorved man vil være i stand til straks  
at udføre effektiv behandling.

10 Opfindelsen angår således en direkte agglutinationstest  
til afsløring af antigener omhandlet i krav 1's kendeteg-  
nende del.

15 Man har nu udviklet en særdeles følsom agglutinationsprø-  
ve til afsløring af antigener, som f.eks. proteiner og  
polysacchariderne fra forskellige mikroorganismer blandt  
andet fra bakterier, protozoer og svampe, der er til ste-  
de i lave koncentrationer i legemsvæskerne.

20 Ved undersøgelsesmetoden ifølge opfindelsen kan der ru-  
tinemæssigt afsløres så lidt som 0,2 ng pr. ml kapsulært  
polysaccharid fra patogene bakterier. Dette repræsenterer  
en følsom følsomhed, der er 25 til 250 gange større end  
de hidtil anvendte modstrømsimmunoelktrophoresemetoder  
25 (CIE), og en følsomhed, der er i det mindste lig med ra-  
dioimmunoprøven (RIA). Hertil kommer, at selv om CIE er  
hurtig, kræver metoden trænet laboratoriepersonale og  
forholdsvis kostbare reagenser og udstyr, og undersøgel-  
sesmetoden har en begrænset følsomhed på 10 til 50 ng pr.  
30 ml for de fleste bakteriepolysaccharider. Da lavere kon-  
centrationer af antigen ofte forekommer i legemsvæsker,  
ser man ofte falske negative CIE-prøver hos patienter,  
hvor man ved dyrkning kan konstatere bakteriel infektion.  
RIA er på den anden side 10 til 100 gange mere følsom end  
35 CIE, men den er betydelig mere tidsrøvende og kostbar.

Inden den foreliggende opfindelse forelå, har den udstrakte anvendelse af partikelagglutinationsprøver, skønt de er umådeligt simple og billige, været begrænset på grund af den lave følsomhed af disse test for små koncentrationer af antigen og dårlig specificitet, der viste sig som ikke-specifik agglutination, specielt i serumprøver. Ved at anvende testen ifølge opfindelsen opnår man en følsomhed af størrelsesordenen 0,2 ng/ml og hyppigheden af ikke-specifik agglutination med humant serum er reduceret til 2% eller mindre. Yderligere har en omhyggelig udvælgelse og fremstilling af antiserum frembragt en undersøgelsesmetode, der er karakteriseret ved ensartet følsomhed, god stabilitet og specificitet.

Specielt tilsigter opfindelsen at tilvejebringe en forbedret partikelagglutinationsundersøgelsesmetode til hurtig afsløring af polyribophosphat (PRP), det kapsulære polysaccharid fra *Haemophilus Influenzae* type b.

Den begrænsede følsomhed er som nævnt hovedproblemet ved de tidligere beskrevne metoder til afsløring af mikrobielle antigener. Som følge heraf kan bakterielt antigen ikke afsløres hos alle patienter med dokumenterede infektioner. F.eks. har undersøgelser afsløret, at 7-22% af patienterne med H.i.b. meningitis; 38% med H.i.b. epiglottitis; 20-39% med bakteremisk pneumococpneumoni og 50-90% med ikke-bakteremisk pneumococpneumoni ikke viste tilstedeværelsen af antigen i serum eller cerebrospinalvæsken, dersom man undersøgte med de almindeligt tilgængelige modstrømsimmunoelktrophorese- eller partikelagglutinations-undersøgelsesmetoder. Imidlertid vil en radioimmunundersøgelse, der er i stand til at afsløre 0,5 ng/ml eller mindre, være i stand til at diagnosticere bogstaveligt alle tilfælde af H.i.b. meningitis, når de første gang dukker op hos lægen. Forsøgsresultaterne angiver også, at koncentrationen af antigen i 37% af patienterne var mindre end 10 ng/ml, og den var derfor under

følsomheden ved de fleste almindeligt anvendte modstrøms-immunoelektrophoreseundersøgelsesmetoder.

5 Ifølge opfindelsen tilvejebringes en partikelagglutinationstest, der har en følsomhed, der er sammenlignelig med radioimmunoforsøgets. Den høje følsomhed opnås ved den omhandlede test ved modifikationer af tidligere kendte partikelagglutinationsforsøg, nemlig ved udvælgelsen af et specifikt H.i.b. antiserum, ved anvendelse af en 10 globulinfraktion af antiserummet, ved vaskning af den sensibilerede partikel og ved en forøgelse af inkubationsperioden for partikelagglutinationsundersøgelsesmetoden fra de sædvanlige 5 til ca. 45 minutter eller længere.

15

#### a. Følsomhed

Udvælgelsen af antiserum påvirker i høj grad undersøgelsesmetodens følsomhed. Seks antisera fremstillet i tre 20 dyrearter frembragte partikler med følsomhed, der lå fra 0,2 ng til mere end 1000 ng PRP pr. ml. Den funktionelle kvalitet af det specifikke antistof såvel som koncentrationen heraf var vigtig. Det antiserum, der frembringer de mest følsomme partikler, har ikke den højeste koncentration af antistof bestemt ved radioantigenbindingsforsøget. 25

Seks antisera over for hele Haemophilus Influenzae type b fremstilledes i fire kaniner, et æsel og en hest ved 30 hjælp af immuniseringsprogrammerne beskrevet af H.E. Alexander et al., Journal of Immunology 54: 207-211, 1946.

Udtrykket "partikler" anvendt i den foreliggende beskrivelse med krav betegner partikler, der er inerte og neutrale overfor andre komponenter, og som er i stand til at 35 adsorbere antisera på irreversibel måde. Disse partikler

kan være glaskugler, polybutadien, polystyren, polybutadien-styren, osv., der er i besiddelse af en gennemsnitspartikelstørrelse på fra ca. 0,15 til ca. 0,9 mikron. Fortrinsvis sensibiliseres polystyren latexpartikler med ensartet diameter på fra omtrent 0,81  $\mu$  som en 10%-vægt/rumfang suspension i destilleret vand med det overfor omtalte antiserum på følgende måde:

Æsel- og kanin-fuld-antiserum fortyndedes hver 1/500 og heste-fuld-antiserum 1/200 i standard glycinpufret saltvand (0,1 M glycin, 0,9% natriumchlorid, pH 8,2). Antistof adsorberedes på latexpartiklerne ved at sætte en del 10% latex-suspension til 80 dele fortyndet antiserum og inkuberer ved stuetemperatur i 1 time. Frit antiserum dekanteredes fra efter centrifugering i 10 minutter ved 12000 G. Latex bundfaldet opslemmedes i glycinpufret saltvand med en ringe mængde protein dvs. 0,1% humant serumalbumin eller 0,1% æsel, kanin eller hesteserum afhængig af, hvad man ønskede, for at fremstille en 0,125% latex-suspension, der atter centrifugeredes og atter opslemmedes i glycinpufret saltvand. Føtalt kalveserum, der havde vist sig ikke at indeholde noget anti-PRP-antistof ved radioimmunundersøgelser, anvendtes som fortyndingsmiddel til standardopløsningerne af PRP-antigen.

Agglutination udførtes ved at tilsætte 0,05 ml af antigenholdig væske til 0,01 ml sensibiliseret latex opløsning på en serologisk plade med keramikringe. Pladen roterede (180 omdr. pr. minut) inden i et fugtighedskammer ved stuetemperatur og undersøgte for agglutination efter 45 minutters forløb. Agglutinationen bedømtes som 4<sup>+</sup>, dersom agglutinationsblandingen kunne ses, 3<sup>+</sup> dersom blandingen forblev uklar, men man kunne observere grove klumper, 2<sup>+</sup> dersom blandingen forblev uklar, og man let kunne se små partikler, og 1<sup>+</sup> dersom blandingen forblev uklar, og man kun kunne se en minimal mængde små partikler. Agglutination på 2<sup>+</sup> eller mere betragtes som posi-

tiv. De sammenlignede følsomheder er angivet i tabel I.

Tabel I

5 Følsomhed af LPA-undersøgelsesmetoden med seks antisera over for Haemophilus Influenzae type b.

10 Serum	Anti-PRP antistof <sup>1</sup>		Følsomhed <sup>2</sup>
	i hel serum ( $\mu$ g Ab protein/ml)	absorberet på Latex- partikler ( $\mu$ g Ab protein/ml (LP))	af LPA (ng PRP/ml)
Æsel	11.200	3,40	0,2
Kanin 1	96.000	7,84	1,0
15 - 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

20 <sup>1</sup> Målt ved radioantigenbindingsforsøg

<sup>2</sup> Laveste koncentration af PRP-5 i føtalt kalveserum giver agglutination på 2<sup>+</sup> eller mere.

Tabel I viser klart, at kvaliteten af det antiserum, der er anvendt til at sensibilisere latexpartiklerne er kritisk for følsomheden af latexpartikelagglutinationsforsøget til afsløring af PRP antigen. Ved at undersøge resultaterne i tabel I ses det let, at følsomheden ikke kan forudsiges udelukkende på basis af koncentrationen af PRP i antiserummet, der er målt ved radioantigenbindingsforsøget. Et æselantiserum, der kun indeholder 12% så meget antistof som det bedste kaninantiserum frembragte et femfold mere følsomt latexpartikelpræparat. Denne forskel i følsomhed kan ikke forklares ved mere effektiv overtræk af latexpartiklerne med æselantistof, da latexpartikler overtrukket med kaninantiserum udviser 2,3 gange mere absorberet antistof. Agglutinationsaktiviteten af æsel- og

kaninantiserum overfor røde blodlegemer fra får overtrukket med PRP var af samme størrelse, på trods af den betydeligt større koncentration af PRP bindingsaktivitet i kaninantiserum.

5

Måling af associationsgraderne viser, at æselantistof forbinder sig betydeligt hurtigere med PRP-antigen end kaninantistof. Associationshalveringstiden er 20 minutter for æselantistof og mere end 60 minutter for kaninantistof. Forklaringen på denne forskel i associationshastigheden er ukendt.

10

Dissociationsgraden af antigen-antistofkomplekser i nærværelse af overskud af antigen er et mål for bindingstæthed eller affiniteten af antistoffet. Kanin-antistof dissocierer langsommere fra polyribose-phosphat end æselantistof, og det har derfor større affinitet over for antigen. Dette resultat fører til den hypotese, at kombinationshastigheden af antigen og antistof er af større betydning ved agglutinationsprocesser end styrken af den gensidige påvirkning af antigen-antistof.

15

20

Molekylarsichromatografi af forskellige dyre-antisera over for bakterielle polysaccharider afslører, at størstedelen af anti-polysaccharid antistoffet hos dyr af hesteslægten (æsler, heste) findes i den makroglobulin-klasse, der elueres i det frie rum i denne søjle. I modsætning hertil findes hoveddelen af kaninantistoffet i IgG-klassen, der eluerer senere. Som angivet i tabel 2 kan anvendelsen af makroglobulinfraktionen af æsel- eller hesteantiserum i en koncentration på 50  $\mu$ g protein/ml til sensibilisering af latexpartikler i betydelig grad forøge følsomheden af forholdsvis svage antisera fra hesteslægten. Følsomheden af de bedste antisera forbedres ikke yderligere ved denne modifikation, skønt agglutinationsreaktionens tydelighed sædvanligvis forbedres med fraktionen fra det frie rum. Anvendelsen af IgG-fraktionen

25

30

35



fra kaninserum giver ikke tilsvarende forbedringer i følsomheden eller agglutinationens klarhed.

Tabel 2

5

Sammenligning af følsomheden af latexpartikler overtrukket med fuldserum eller makroglubolinfraktionen af hesteslægts-antiserum over for bakterielle polysaccharider.

10

Dyr	Antiserum mod	Følsomhed* af LP overtrukket med fuldserum (1/500 fortynding)	Følsomhed af LP beklædt med makroglubolinfraktion (50 µg protein/ml)
15	Æsel-F H. influenzae type b	1 ng/ml	0,2 ng/ml
	Æsel-132 H. influenzae type b	0,2 ng/ml	0,2 ng/ml
20	Æsel-W.J. H. influenzae type b	2 ng/ml	0,5 ng/ml
	Æsel-Y Neisseria meningitis-gruppe Y	1 ng/ml	0,2 ng/ml
25	Hest-49 N-meningitis gruppe A	0,5 ng/ml	0,2 ng/ml
	Hest-46 N-meningitis gruppe B	> 10 000 ng/ml	2 ng/ml

30 \* Den laveste koncentration af antigen, der frembringer 2<sup>+</sup> agglutination eller større er angivet.

35 For at opnå yderligere forbedring i følsomheden af æsel-antiserum sammenlignedes antistofbeklædte latexpartikler, der var beklædt med forskellige fortyndinger af æsel-antiserum i glycin-pufret saltvand, uvasket og efter 1,2 og 3 vaske, med glycinpufret saltvand indeholdende 1/1000

dele føtalt kalveserum, og resultaterne er angivet i tabel 3.

Tabel 3

5

Virkning af fortynding af antiserum og vask af latexpartikler på sensibiliteten af latexpartikelagglutinationsprøven for polyribosephosphat.

10

Fortynding af æselantiserum anvendt til sensibilisering af latexpartikler	Minimumkoncentration af afsløret* PRP (ng/ml)				
	Uvasket	vasket x 1	vasket x 2	vasket x 3	
15	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
20	1/2000	0,2	0,2	0,2	0,5
	1/5000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

\* 2<sup>+</sup> agglutination eller større antoges som positivt resultat.

25 Det fremgår af resultaterne i tabel 3, at lave fortyndinger af antiserum er ikke-følsomme. Med fortyndinger på 1/500 og større opnås maksimal følsomhed, forudsat at latexpartiklerne er vasket. Uvaskede latexpartikler opnåede kun maksimal følsomhed med et snævert område af fortyndinger. To vaske gav maksimal følsomhed, medens tre vaske

30 kan resultere i formindsket følsomhed.

Sensibiliserede latexpartikler fra vaskeexperimentet lagredes ved 4 °C og afprøvedes efter 12 og 24 måneders forløb. Latexpartiklerne sensibiliseret med 1/500 og 1/1000 fortynding af æselantiserum og vasket to gange bibeholdt deres oprindelige følsomhed, mens uvaskede latexpartikler

35

var to til fire gange mindre følsomme efter 24 måneders forløb.

5 Fig. 1 viser forholdet mellem testfølsomhed og inkuba-  
tionsperiode. Store koncentrationer af antigen agglutine-  
rede latexpartiklerne i løbet af 5 minutter. Følsomheden  
forøgedes hurtigt under de første 45-60 minutter, hvor-  
10 efter de langsomt nåede et maksimum på 0,05 ng/ml med de  
mest følsomme præparater på 10 timer. Det omhandlede se-  
rum fra hesteslægten var mere følsomt end kaninserum ved  
alle inkubationstiderne. Under sammenligningsforsøgene  
blandedes 50  $\mu$ l prøveopløsning og 10  $\mu$ l belagte latexpar-  
tikler, som beskrevet i det følgende, på en serologisk  
15 plade, og den roteredes ved 180 omdr./min, ved stuetempe-  
ratur. Pladen blev overdækket, og fugtigheden blev opret-  
holdt ved hjælp af en svamp, der var mættet med varmt  
vand. Man undersøgte pladerne til de angivne tider.

Forlænget inkubation fra 5 til 45 minutter eller længere  
20 gav en 10 til 20 fold forøgelse af følsomheden. Til prak-  
tiske kliniske formål valgtes en inkubationsperiode på 45  
minutter, idet man normalt aflæste med 5-15 minutters  
mellemrum, når der anvendtes latexpartikler belagt med et  
hesteslægts-antiserum. Disse latexpartikler havde en føl-  
25 somhed på 0,2 ng antigen pr. ml væske.

Man gik ud fra, at den forøgede følsomhed af partikelag-  
glutinationsforsøget også ville forøge tilfældene af  
ikke-specifik agglutination, og i serumprøver fra hospi-  
30 taliserede børn agglutinerede 69% af disse sera latexpar-  
tiklerne. Denne ulempe har tidligere begrænset en vid-  
strakt anvendelse af denne prøvemethode. Faktorer, der  
deltager i agglutinationen af latexpartikler belagt med  
gammaglobuliner, er varmelabile serumkomponenter (sand-  
35 synligvis komplement) og varmemestabile antiglobuliner,  
hvoraf der sædvanligvis i humane sera findes lave niveau-  
er specielt fra patienter med kroniske inflammatoriske

sygdomme.

5 Ikke-specifik agglutination sås ved agglutination af kontrollatexpartikler sensibiliseret med hel ikke-immun dyreserum. Dersom man anvendte makroglobulin-overtrukne latexpartikler, var kontrollatexpartiklerne overtrukne med makroglobulinfraktionen af ikke-immun serum.

10 Ved anvendelse af testen ifølge opfindelsen reduceredes hyppigheden af ikke-specifik agglutination med humant serum til 2% eller lavere ved 1) tilsætningen af ikke-immunt dyreserum til sensibiliserede latexpartikler; og 2) ved tilsætningen af en serumpuffer indeholdende en polyanion og/eller et reducerende middel direkte til inkubationsblandingen og/eller 3) ved varmeinaktivering af serummet.

20 Tilfældene af ikke-specifik agglutination bestemtes ved hjælp af sera opsamlet fra hospitalsindlagte børn- og voksne patienter, som ikke havde H.i.b. syge. Alle sera undersøgtes med latexpartikler sensibiliseret med æselantiserum (anti-PRP LP) og med latexpartikler sensibiliseret med ikke-immunt æselserum (kontrol LP).

25 Ved tidligere forsøg var sera indeholdende varrestabile agglutiner undersøgt ved tilsætning af 10  $\mu$ l af et reducerende middel som f.eks. 1,4-dithiothreitol (DTT) eller mercaptoethanol (ME) til inkubationsblandingen ved begyndelsen af inkubationen. Optimale koncentrationer var 30 0,018 M for DTT og 0,35 M for ME (slutkoncentrationerne i inkubationsblandingen var 0,0026 M for DTT og 0,05 M for ME).

35 Den efterfølgende tabel 4 opsummerer resultaterne opnået med 104 pædiatriske sera, der var lagret mindst 24 timer ved 4 °C, inden de undersøgtes.

Tabel 4

Tilfælde af ikke-specifik agglutination med lagrede sera<sup>1</sup> fra hospitaliserede børn uden Haemophilus Influenzae type b syge

5	Agglutination med anti-PRP LP	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
10	Agglutination med kontrol LP	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ
	Ingen behandling af serum (n=104)	32 (31%)	65 (63%)	3 (3%)	4 (4%)
15	Varmeinaktivering af serum (n=104)	49 (47%)	47 (45%)	1 (1%)	7 (7%)
20	Tilsætning af normalt æselserum (2,5%) til LP (n=104)	72 (69%)	23 (22%)	7 (7%)	2 (2%)
25	Varmeinaktivering af serum og tilsætning af normalt æselserum (2,5%) til LP (n=104)	75 (72%)	23 (22%)	5 (5%)	1 (1%)
30	Tilsætning af normalt æselserum (2,5%) til LP og tilsætning af DTT <sup>2</sup> til serum (n=53) <sup>3</sup>	52 (98%)	1 (2%)	0	0

35 <sup>1</sup> Lagret mindst 24 timer ved 4 °C inden undersøgelsen

<sup>2</sup> Dithiothreitol, slutkoncentration på 0,0026 M i inkubationsblandingen

<sup>3</sup> Kun 53 af 104 prøver indeholdt tilstrækkeligt serum til denne undersøgelse.

69% af sera frembragte ikke-specifik agglutination med anti-PRP og alle bortset fra 4% identificeredes med kontrol LP.

5 Varmeinaktivering (60 °C i 15 minutter) reducerede kun i  
ringe grad ikke-specifik agglutination til 53%, og til-  
sætning af ikke-immun æselserum til både anti-PRP og kon-  
trol LP reducerede ikke-specifik agglutination til 31%;  
10 og tilsætning af 10 µl af et reducerende middel, dvs.  
dithiothreitol sænkede tilfældene af ikke-specifikke re-  
aktioner til 2%. De opnåede resultater med 52 lagrede  
voksne sera var tilsvarende. Kun ét serum gav ikke-speci-  
fik agglutination (positiv med anti-PRP LP og kontrol  
LP), når 2,5% normalt æselserum sættes til latexpartik-  
15 lerne, og DTT sættes til inkubationsblandingen.

For at bestemme om friske sera gav en højere grad af  
ikke-specifik agglutination, indsamlede man 100 sera fra  
20 voksne patienter, hvorefter man umiddelbart efter anbrag-  
te prøverne på is og undersøgte dem samme dag. Hvert se-  
rum undersøgtes med og uden reducerende middel (ME) og  
med og uden varmeinaktivering (60 °C i 5 minutter). Ag-  
glutination undersøgtes med anti-PRP LP og kontrol LP,  
der hver indeholdt 2,5% normalt æselserum, og der var  
25 overensstemmelse i alle tilfælde. Agglutinationsmønsteret  
er angivet i tabel 5.

30

35

Tabel 5

Ikke-specifik agglutination med friske sera fra 100 voksne patienter uden Haemophilus Influenzae type b syge<sup>1</sup>

5	Mønster	Ingen varme inaktivering <sub>2</sub>		Varme-aktivering <sub>2</sub>		Antal sera	Aflæsninger
		Ingen ME	ME <sup>2</sup>	Ingen ME	ME <sup>2</sup>		
	1.	(-)	(-)	(-)	(-)	43	Ingen antiglobuliner Ingen komplement
10	2.	(+)	(-)	(+)	(-)	28	Kun antiglobuliner
	3.	(+)	(+)	(-)	(-)	4	Kun komplement
	4.	(-)	(+)	(-)	(-)	14	Kun komplement ("reaktiveret" med ME)
15	5.	(+)	(+)	(+)	(-)	10	Antiglobuliner og komplement
	6.	(-)	(-)	(-)	(+)	1	
20	Antal sera, der frembringer ikke-specifik agglutination		42	38	38	1	

<sup>1</sup> Alle undersøgelser udførtes med anti-PRP og kontrol LP, der indeholdt 2,5% normal æselserum. Der var fuldstændig overensstemmelse af resultaterne mellem anti-PRP og kontrol LP.

<sup>2</sup> 2-Mercaptoethanol, slutkoncentration 0,05 M i inkubationsblandingen.

30

35

42% af de ubehandlede sera (ingen opvarmning og intet reducerende middel) frembragte ikke-specifik agglutination. Dersom et reducerende middel (ME) tilsættes, bliver 28 af sera'er negative (mønster 2), hvilket indikerer tilstedeværelsen af antiglobuliner. 14 sera, der oprindeligt havde været negative, blev positive (mønster 4), hvilket indicerede, at et varmelabilt agglutinin var reaktiveret med mercaptoethanol. Nettovirkningen af ME alene var at reducere ikke-specifik agglutination til 38%. En lignende størrelse af ikke-specifik agglutination opnås med varmeinaktivering alene. Imidlertid reducerer kombinationen af varmeinaktivering af sera og tilsætning af et reducerende middel til inkubationsblandingen tilfældene af ikke-specifik agglutination til en størrelse på 2% eller lavere.

Fordi varmeinaktiveringen er tidsrøvende, er der udviklet en alternativ metode til at fjerne ikke-specifik agglutination af varmelabile serumfaktorer. En hel række polyanioner, herunder natriumpolyanetolsulfonat (SPS), dextran-sulfat, carrageenin og heparin, forhindrer ikke-specifik agglutination af globulin-overtrukne latexpartikler med varmelabile serumfaktorer.

100 friske sera fra voksne undersøgte med en serumpuffer indeholdende både ME (som ovenfor) og SPS ved en koncentration på 0,05%. Kun én af de 100 sera frembragte ikke-specifik agglutination med anti-PRP og kontrol LP. Ikke-specifik agglutination med dette serum fjernedes ved opvarmning.

Fortrinsvis tilsættes en serumpuffer indeholdende både reducerende middel og en polyanion til inkubationsblandingen af en stabiliseret, sensibiliseret latexpartikel og en serumprøve.

Denne serumpuffer fremstilles på følgende måde:



Man fortynder 14 molær 2-mercaptoethanol (standard fuld-  
styrke opløsning) 1/40 i glycinpufret saltvand (GBS) (0,1  
M glycin, 0,9% natriumchlorid, pH 8,2). Man fortynder 5%  
vandig opløsning af polyanetholsulfonat 1/100 i samme  
5 GBS.

Serumpufferen kan indeholde andre reducerende midler, som  
f.eks. dithiothreitol, glutathion, cystein og lignende i  
stedet for 2-mercaptoethanol. Herudover kan andre polyan-  
10 ioner, som f.eks. dextransulfat, heparin og carrageenin  
og lignende anvendes, sålænge de ikke griber ind i anti-  
gen-antistofreaktionen.

Tabel 6 nedenfor viser den optimale koncentration af rea-  
15 genser i serumpufferen. Højere koncentrationer af reduce-  
rende midler eller polyanioner formindsker følsomheden af  
forsøget, og lavere koncentrationer er ikke i stand til  
at fjerne ikke-specifik agglutination i alle sera.

20

25

30

35



Ikke-specifik agglutination i andre legemsvæsker

De fleste urinprøver frembringer ikke-specifik agglutination med anti-PRP og kontrol LP. Dette kan forhindres enten ved opvarmning (100 °C i 5 minutter) eller ved filtrering af urinen. I en foretrukken udførelsesform anvendes et 0,45 mikron filter.

Cerebrospinalvæskeprøver producerer meget sjældent ikke-specifik agglutination, der fjernes ved opvarmning (100 °C i 5 minutter). PRP-antigenet er stabilt over for den ovennævnte opvarmning og overfor filtrering.

Følgende specifikke eksempler demonstrerer opfindelsen i en foretrukken udførelsesform.

a. Overtrækning af latexpartikler

For at fremstille anti-PRP latexpartikler fortyndes hel æselantiserum over for H. Influenzae type b 1/500 i glycinpufret saltvand (GBS), og der opvarmes til 56 °C i 30 minutter. En del latexsuspension (en 10% suspension af 0,81  $\mu$  diameter partikler i destilleret vand) sættes til 80 dele fortyndet antiserum, hvorved man opnår en slutlatexpartikelkoncentration på 0,125%. Blandingen inkuberes 1 time ved stuetemperatur, der centrifugeres ved 12000 G i 10 minutter, og den supernatante væske bortkastes. Centrifugebundfaldet genopslemmes i samme rumfang GBS indeholdende 0,1% ikke-immunt æselserum, centrifugeres atter som ovenfor, hvorefter man genopslemmer i samme rumfang GBS indeholdende 2,5% ikke-immun æselserum. Kontrollatexpartiklerne fremstilles som beskrevet ovenfor bortset fra ikke-immunt æselserum fortyndet 1/500 i GBS anvendes til først at overtrække latexpartiklerne. Det ikke-immune æselserum, der anvendes under hele proceduren, skal være serum udtaget inden immunisering fra samme dyr, der er blevet immuniseret.

Når den makroglobuline fraktion skal anvendes, chromatograferes hele den præ-immune og immune æselserum på en "Sephacryl" G-200 gel filtreringssøjle, og de fraktioner, der eluerer i det tomme rumfang af søjlen, slås sammen. De sammenslåede tomme rumfang fortyndes til en protein-

5 koncentration på 50 µg protein pr. ml i GBS, og erstatter herefter fortyndet hel serum i den ovenfor beskrevne metode.

10 **b. Fremstilling af serumpuffer**

Man fortynder 14 molær 2-mercaptoethanol (standard fuldstyrke opløsning) 1/40 i GBS. Man tilsætter natriumpolyanetholsulfonat til en slutkoncentration på 0,05%.

15

**c. Testmetode**

Den omhandlede test udføres på følgende måde:

20 50 µl positiv kontrolserum, negativ kontrolserum og hvert serum, cerebrospinalvæske og urinprøve, der skal undersøges, sættes til hver af to brønde på en ren, tør serologisk plade efter nedenstående diagram. Den positive kontrolserum indeholder 2 ng PRP antigen/ml. Den negative

25 kontrolserum indeholder antiglobuliner, der agglutinerer både anti-PRP LP og kontrol LP, medmindre SB er tilsat, hvilket giver en kontrol for aktiviteten af SB. Urinprøverne er forfiltreret på et 0,45 mikron filter.

30

35

	Positiv kontrol serum	Negativ kontrol serum	Test serum	Test CSF	Test urin	
5	Række A: Anti-PRP LP	⊙ SB	⊙ SB	⊙ SB	○	○
	Række B: Kontrol LP	⊙ SB	⊙ SB	⊙ SB	○	○

SB = tilsæt serumpuffer.

10

Man tilsætter 10  $\mu$ l serumpuffer til hver brønd indeholdende positiv kontrolserum, negativ kontrolserum eller en serumprøve.

15

Latexsuspensionerne blandes forsigtigt uden skumning og 10  $\mu$ l anti-PRP latexpartikler sættes til den ene brønd af hvert par (række A), og reagenserne blandes grundigt.

20

10  $\mu$ l kontrollatexpartikler sættes til den anden brønd af hvert par, og reagenserne blandes grundigt.

25

Pladen anbringes på et serologisk rysteapparat og bearbejdes ca. 45 minutter. Kammeret bør være befugt med en svamp neddyppet i varmt vand med synlig kondensation under hele forsøget. Pladen fjernes fra kammeret, tørres fri for kondensat, og agglutinationen aflæses, idet man vipper frem og tilbage i skråt indfaldende lys over sort baggrund:

30

4+ store klumper - klar baggrund  
 3+ store klumper - mælket baggrund  
 2+ små klumper  
 1+ fint granulært  
 0 mælket

35

3+ og 4+ reaktionerne er let skelnelige fra kontrollerne, når man ser på pladen i en arms afstand. 2+ reaktionerne kræver nærmere inspektion.

Bedømmelse af resultaterne

	Hemophilus LP	Kontrol LP	Bedømmelse
5	(+)	(-)	Positiv for H. influenzae type b antigen
	(-)	(-)	Negativ for H. influenzae type b antigen
10	(+)	(+)	Ikke-specifik agglutination. H. influenzae type b antigen kan eller kan ikke være til stede.
15	Positiv agglutination på 2+ bør angives som "svagt positiv".		

20 I beskrivelsen med krav er tiden og de anvendte temperaturer under varmebehandlingen og inkubationen optimale, hvilket skal forstås på den måde, at samme resultater kan opnås ved højere temperaturer gennem kortere tid eller omvendt ved lavere temperaturer i længere tid. Yderligere er de omtalte reagenser, medier og teknikker, der er anvendt ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, sådan, at

25 det let for fagmanden vil være muligt at foretage variationer i metoderne, tiderne, rumfangene og typerne af materialer, substrater og udstyr.

30

35

## P a t e n t k r a v :

-----

1. Direkte agglutineringsstest til påvisning af antigener  
5 i legemsvæsker, der antages at indeholde sådanne antige-  
ner, k e n d e t e g n e t ved, at man kombinerer en  
prøve af en legemsvæske, der er serum eller plasma, med  
et flydende reagens, der agglutineres ved kontakt med  
10 væsker der indeholder antigener, hvilket reagens omfatter  
en bærer belagt med animalsk antiserum mod nævnte antige-  
ner opslemmet i et fysiologisk passende puffersystem og  
ikke-immunt animalsk serum fra samme dyreart, der dannede  
antiserumet, hvilket antiserum er et fuld-hesteslægtsan-  
tiserum, specielt makroglobulinfraktionen heraf, med et  
15 puffersystem indeholdende en polyanion, der kan formind-  
ske virkningen på prøvens varmelabile bestanddele, hvil-  
ken polyanion er natriumpolyanetolsulfonat, dextransulfo-  
nat, carragen, heparin eller tilsvarende, og et reduk-  
tionsmiddel for prøvens antiglobulinantidele, der består  
20 af 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, glutation, cystein  
eller lignende, blandingen inkuberes og herefter bestem-  
mes agglutineringsgraden visuelt.

2. Agglutineringsstest ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
25 n e t ved, at legemsvæsken opvarmes.

3. Agglutineringsstest ifølge krav 2, k e n d e t e g -  
n e t ved, at den til inkuberingen anvendte tid er  
mindst 45 minutter.

30

35

△—△ : Overtrukket med kanin 144 antiserum  
○—○ : Overtrukket med æsel 132 antiserum

