

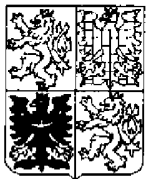
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 729

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.08.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.08.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/057192**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/17758**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/10742**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

G 01 N 33/545

(71) Přihlašovatel:

FERTILITY ACOUSTICS INC., Buffalo, NY, US;

(72) Původce:

McNeirney John C., Fairburn, GA, US;

Burns William H. Jr., Orchard Park, NY, US;

Gibbons William S. Jr., East Aurora, NY, US;

(74) Zástupce:

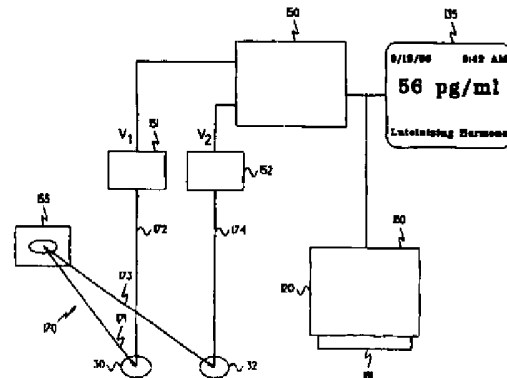
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob detekce látek v biologickém vzorku a
zařízení k provádění způsobu**

(57) Anotace:

Způsob se týká detekce fyziologických změn u lidí a jiných savců monitorováním a detekcí změn v koncentraci různých složek krve. Koncentrace analytu se konkrétně určuje imobilizací analytu v médiu s první protilátkou, která má specifickou afinitu k analytu, značením analytu detekovatelnou druhou protilátkou a použitím spektrofotometrických, kolorimetrických a fluorimetrických metod analýzy pro výpočet koncentrace. Zařízení sestává z reflektačního spektrofotometru s diodou (LED) (155) emitující světlo, časovače (136), fotodetektorů (151, 152), signálového procesoru (150) a prostředku pro přijímání testovacího proužku (110).



Způsob detekce látek v biologickém vzorku *a navázání k provádění způsobu*

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká obecně způsobu a zařízení pro detekci a kvantitativní stanovení analytů v biologických vzorcích.

5 Konkrétněji se vynález týká způsobu a zařízení pro stanovení hladin hormonů v krvi, včetně bez omezení luteinizačních hormonů (LH), estradiolu, hormonu stimulujícího folikuly (FSH), thyreostimulačního hormonu (TSH) a/nebo progesteronu. Navíc se vynález týká detekce a stanovení endokrinních dysfunkcí u lidí a jiných savců.

10

Dosavadní stav techniky

Fyziologické změny u lidí a jiných savců jsou často doprovázeny změnami v koncentraci různých krevních složek. Například ovulaci u žen a jiných savců předchází změny plazmatické koncentrace

15 luteinizačního hormonu (LH) v krvi. V současnosti jsou jediné komerčně dostupné testy používané pro detekci tohoto kolísání založeny na moči. Testy prováděné v moči mají několik nevýhod. Jsou nepohodlné a často nepříjemné a, co je ještě důležitější, nejsou tak přesné jako testy prováděné v krvi. Pro nahromadění detekovatelné

20 koncentrace luteinizačního hormonu v moči musí být hormon uvolněn podvěskem mozkovým, cirkulovat v krvi, být oddělen v ledvinách a nakonec vyloučen. Ukončení těchto procesů může trvat až 12 hodin od skutečné změny v plazmě až do nahromadění dostatečného množství LH v moči. Protože ovulace následuje po změně koncentrace

25 LH po 12 až 18 hodinách, v době, kdy uživatel „předpovídá“ její výskyt použitím močového testu, by již mohla probíhat. Toto zpoždění podstatně zmenšuje období plodnosti, které obvykle trvá pouze několik dní a eliminuje možnost použití těchto testů pro antikoncepční účely. Navíc tyto jednotky nezobrazují kvantitativní výsledky; spíše ukazují,

že koncentrace LH v plazmě je vysoká nebo nízká (normální), což je vlastnost, které tyto metody vylučují z použití u žen, jejichž maximální koncentrace LH není tak vysoká jako u průměrných žen, na kterých se močové testy kalibrují.

5 Nejpřesnější způsob detekce změn koncentrace LH je krevní test. Teoreticky může být známa koncentrace LH téměř okamžitě, což maximalizuje reprodukční období ženy. V současnosti jsou však výsledky klinických krevních testů k dispozici teprve po 12 až 24 hodinách a jejich použití vylučuje i vysoká cena (typicky 90 dolarů). Je
10 proto velmi žádoucí vyvinout metodu a zařízení, které budou detekovat plazmatické koncentrace luteinizačního hormonu a jiných hormonů účastnících se reprodukce u ženy, a které budou mít příznivější cenu a poskytovat včasnější výsledky.

Bazální hladiny estradiolu a FSH v plazmě používají lékaři
15 zabývající se plodností pro stanovení možnosti úspěchu oplodnění *in vitro* (*in vitro* fertilization IVF). Bazální koncentrace estradiolu se stanoví třetí den cyklu, kdy by jeho koncentrace měla být na nejnižší úrovni. Studie ukázaly, že jestliže byla koncentrace estradiolu třetí den vyšší než 75 pg/ml, nenastávala žádná úspěšná těhotenství IVF.
20 Jestliže byla koncentrace estradiolu vyšší než 45 pg/ml a koncentrace hormonu stimulujícího folikuly (FSH) vyšší než 17 IU/l, nenastala také žádná úspěšná těhotenství IVF. Jestliže jsou jak základní koncentrace estradiolu, tak i koncentrace FSH nízké (méně než 46 pg/ml, popřípadě 18 IU/l), potom může být IVF úspěšné z 33,8 % doby. Bylo
25 pozorováno, že bazální hladiny FSH a hladiny estradiolu získané současně třetí den menstruačního cyklu jsou nezbytné testy pro určení rezervy vajíček ve vaječniku u neplodných pacientů. Termín „rezerva vajíček ve vaječniku“ odráží budoucí schopnost vaječníků produkovat životaschopná vajíčka. Primární důvod zvýšení hladin FSH spočívá
30 v tom, že folikuly nedozrávají jako odpověď na hormonální stimulaci podvěskem mozgovým. Výsledkem je, že podvěsek vylučuje větší množství FSH. Nedostatečná odezva potom vede k nepřítomnosti

životaschopných vajíček ve vaječnicích, což sebou přináší špatnou prognózu pro další těhotenství.

Podobně může být diagnostikována monitorováním různých hormonů příčina neplodnosti u konkrétních pacientů. Zvýšené hladiny bazálního FSH indikují vyčerpání vaječníků, což poskytuje špatnou prognózu. V jiných případech však není neplodnost spojená s fungováním samotného reprodukčního systému. Například porušení koncentrace thyreostimulačního hormonu (TSH) může způsobit dysfunkci jinak zdravého reprodukčního systému. V případě, že se zjistí, že problém způsobuje sekundární příčina jako je thyroidní dysfunkce, léčba může být vysoce úspěšná. Méně nákladná metoda pro screening pacientů na funkci štítné žlázy umožní lékařům provádět častější sledování většího počtu neplodných žen.

Další oblastí, kde může být s úspěchem použita ekonomičtější a účinnější metoda detekce a kvantifikace množství různých hormonů jsou defekty luteální fáze, které postihují 1 až 3 % neplodných párů a jednu třetinu žen se spontánním potratem. Luteální fáze období v normálním menstruačním cyklu potom, co ovum praskne, ale před menstruací. Nedostatečná produkce estradiolu, progesteronu, a/nebo LH během této doby zabrání správnému vývoji endometria a ova, což znemožní implantaci. Jestliže lékař zjistí, že vaječníky dostatečně dobře odpovídají (tj. že ještě obsahují životaschopná vajíčka), potom je možno podáváním odpovídajících léků ovlivňovat další endokrinní problémy, jako jsou defekty luteální fáze. Levnější metoda systematického sledování pacientů z hlediska endokrinních problémů tedy umožní zachovat větší počet těhotenství.

Při jakýchkoliv z výše popisovaných hormonálních stanovení vyžadují vysoké náklady a problematická metodologie, aby neplodné ženy nebo ženy s nižší frekvencí menstruace prodělaly mnoho hormonálních testů, často takových testů, kdy se vzorky odebírají po dobu několika následujících dnů. Proto existuje potřeba získat účinné

a laciné zařízení a způsob, které umožní uživateli získat rychlou a spolehlivou informaci o konkrétním hormonálním stavu uživatele.

Podstata vynálezu

5 Předmětem předkládaného vynálezu je tedy poskytnutí způsobu rychlé analýzy hladin hormonů v krvi, včetně bez omezení luteinizačního hormonu, estradiolu, hormonu stimulujícího folikuly, thyreostimulačního hormonu a/nebo progesteronu, aby bylo možno předpovídat některé fyziologické změny. Příklady těchto fyziologických
10 změn zahrnují bez omezení určení stavu ovaríí a správné funkce reprodukčního systému stejně jako detekci endokrinní příčiny neplodnosti u člověka a samic jiných savců.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí testovacího zařízení pro rychlou detekci analytů v biologickém vzorku.
15 Konkrétně slouží zařízení podle předkládaného vynálezu pro stanovení hladin různých hormonů v krvi, jako je například estradiol, hormon stimulující folikuly, thyreostimulační hormon a/nebo progesteron u pacienta a pro poskytnutí výsledků uživateli. Zařízení podle předkládaného vynálezu mohou obsluhovat i nezkušení uživatelé a pro
20 získání spolehlivých analytických výsledků je nutný minimální počet operací.

Médium jako je testovací proužek má část analytické matrice obsahující porézní matrici, na které je imobilizována první protilátka, která má specifickou afinitu k analytu. Po aplikaci biologického vzorku
25 na testovací proužek zachytí imobilizované molekuly první protilátky analyt. Po odstranění nenavázaných materiálů se na proužek nanesou molekuly detekovatelné druhé protilátky (tzv. indikátorová molekula, label nebo tag) se specifickou afinitou pro analyt. Po odstranění nenavázaných látek se detekuje množství indikátorové molekuly

navázané na proužku pomocí monitorovacího zařízení, kde toto množství ukazuje množství analytu přítomného ve vzorku.

V praxi obsahuje činidlo, kterým je testovací proužek impregnován, jednu nebo více částí testovací matrice, na které se nanáší vzorek, který se potom ponechá pronikat materiálem proužku a postupuje do nebo skrz materiál proužku a do nebo skrz detekční oblast v testovacím proužku. Vynález konkrétně obsahuje specifický test založený na monoklonálních protilátkách ELISA pro detekci hormonů, jako je luteinizační hormon, estradiol, hormon stimulující filikuly, thyreostimulační hormon a/nebo progesteron, buď jednotlivě nebo v kombinaci. Kapka nebo kapky úplné krve se nanesou na aktivní matrici buď přes filtr, nebo přímo. Analyt v krvi, jako je například konkrétní hormon, reaguje a váže se na primární protilátku obsaženou v porézní matrici. Analyt se potom promyje druhou protilátkou navázanou na indikátor, jako je například chromofor, znovu se opláchne a míra výsledného vyvinutí barvy, která je mírou množství hormonu ve vzorku, se potom měří. Chromofor může být nahrazen různými fluorescenčními nebo luminiscenčními indikátory, pokud může být intenzita fluorescence nebo luminiscence měřena jako indikátor množství analytu ve vzorku krve. Testy většího počtu hormonů se provádějí stejnou metodologií, ale s použitím většího počtu aktivních míst na proužku, přičemž zbarvení vyvinuté v určitém místě ukazuje na přítomnost konkrétního hormonu. Alternativně slouží jediná aktivní matrice impregnovaná větším počtem primárních protilátek se specifickou afinitou vůči specifickým hormonům jako vazebné místo pro tyto hormony, přičemž pro detekci a kvantifikaci koncentrací hormonů ve vzorku krve se potom použijí chromoforové, fluorescenční nebo luminiscenční indikátory.

Další provedení předkládaného vynálezu se skládá z testu v kapalně fázi s jednou nebo větším počtem cel, při kterém se odebere vzorek úplné krve a tento vzorek se aplikuje ručně nebo automaticky do jedné nebo více cel a provede se specifický test ELISA založený na

monoklonálních protilátkách pro luteinizační hormon, estradiol, hormon stimulující folikuly, thyreostimulační hormon a/nebo progesteron, buď jednotlivě nebo v kombinaci. V tomto provedení reagují hormony s primární protilátkou obsaženou v porézní matrici, 5 promyjí se sekundární protilátkou navázanou na chromofor, propláchnou se a míra výsledné vyvinuté barvy, která je úměrná množství hormonu ve vzorku se potom měří. I v tomto případě může být chromofor nahrazen fluorescenčními nebo luminiscenčními indikátory, přičemž se měří intenzita fluorescence nebo luminiscence.

10 V jediné cele nebo větším počtu cel mohou být prováděny testy většího počtu hormonů. Pokud se používá chromofor, vyvinuté zbarvení může být měřeno vizuálním srovnáním s barevnou tabulkou, ale s výhodou se měří spektrofotometricky, protože vizuální porovnání s barevnou tabulkou je méně přesné a poskytuje pouze hrubé ($\pm 15\%$) 15 přiblížení ke skutečné hladině LH. Intenzita fluorescence a luminiscence se s výhodou stanoví spektrofotometricky.

Další předměty a výhody předkládaného vynálezu budou odborníkům v oboru zřejmější z následujícího podrobného popisu, kde je ukázáno a popsáno výhodné provedení pomocí ilustrace způsobu, 20 o kterém autoři vynálezu předpokládají, že je pro provádění vynálezu nejvhodnější. Jak bude vidět, vynález může mít další rozdílná provedení a jeho některé detaily mohou podléhat modifikacím z několika zřejmých hledisek, aniž by přitom došlo k odchýlení od podstaty vynálezu. Výkresy a popis mají proto být považovány za 25 v podstatě ilustrační a nikoliv za omezující.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A je půdorys testovacího proužku podle podstaty předkládaného vynálezu.

30 Obr. 1B je průřez testovacím proužkem z boku.

Obr. 2 je pohled na testovací proužek testu ELISA v kapalně fázi podle podstaty předkládaného vynálezu z boku.

Obr. 3A je půdorys spektrofotometrického zařízení pro zpracování testovacích proužků z obrázků 1A - 1B a obr. 2, který pracuje na principu odrazivosti.

Obr. 3B je boční pohled na spektrofotometrické zařízení pracující na principu odrazivosti z obr. 3A.

Obr. 4 je blokové schéma zařízení pro zpracování testovacího proužku s pevnou fází z obr. 1A - 1B.

Obr. 5 je blokové schéma zařízení pro zpracování testovacího proužku s kapalnou fází podle obr. 2.

Příklady provedení vynálezu

Na obr. 1A je ukázán testovací proužek s pevnou fází 20, který obsahuje celkovou analytickou matici 25 obsahující dvě oblasti: první oblast 30, která má funkci „blanku“ a druhou oblast 32. Rozumí se, že termín „blank“ má význam běžně používaný v oblasti kolorimetrických a fotometrických analytických metod.

Druhá oblast 32 je oblast matrice reakčních činidel. Oblast 32 obsahuje první protilátku v porézní nereaktivní nosné matici 46. Takové matrice se běžně používají v oboru pro vázání nukleových kyselin a proteinů. Příklady materiálů pro vhodné nosné matrice jsou nitrocelulóza a nylon. Jestliže je nosnou maticí 46 nitrocelulóza, protilátky mohou být na nosnou matici přímo imobilizovány, aniž by bylo nutno používat chemických činidel. Pro jiné matrice se však může imobilizace provádět v oboru známými způsoby, jako je působení bromkyanem a karbonyldiimidazolem.

První protilátka se volí ze skupiny monoklonálních protilátek, polyklonálních protilátek a jejich fragmentů. Ve výhodném provedení je

molekulou první protilátky monoklonální protilátka. Konkrétní volba protilátky bude závislá na detekovaném analytu. Například pro detekci luteinizačního hormonu (LH) mohou být na nosnou matici 46 imobilizovány protilátky specifické vůči LH.

5 Pro účely odstranění nenavázaných látek z nosné matrice 46 se používá omývacího prostředku ve formě mokrého absorpčního stírátko (wipe). Toto stírátko je s výhodou vyrobeno z netkaného materiálu. Stírátko se namočí vhodným roztokem. Stírátko mohou být namočena předem nebo mohou být namočena v průběhu analýzy. Například pro
10 účely blokování mohou být stírátko namočena do některého pufru obsahujícího dobře známé blokovací prostředky. Mezi vhodné pufrů patří fosfát, tris, glycin apod., obecně s molaritou 0,1 až 3,0. Vhodnými blokovacími prostředky jsou bez omezení bovinní sérový albumin, zředěné sérum, odtučněné sušené mléko a kasein. Stírátko namočená
15 do omývacího roztoku se zde označují jako omývací stírátko a stírátko namočená do blokovacího roztoku se zde označují jako blokovací stírátko.

Druhá protilátka má také afinitu k analytu, s výhodou k rozdílnému epitopu než první protilátka. Druhá protilátka je zvolena ze
20 skupiny monoklonálních protilátek, polyklonálních protilátek a jejich fragmentů. Ve výhodném provedení je druhá protilátka monoklonální protilátka proti epitopu rozdílnému od epitopu pro první protilátku.

Druhá protilátka je značena detekovatelnou molekulou nebo komplexem. Vhodné detekovatelné indikátory jsou například
25 chromofory a fluorescenční molekuly a komplexy. Fluorescenčně značené protilátky proti specifickým analytům jsou komerčně dostupné nebo mohou být připraveny v oboru známými způsoby. Soupravy pro fluorescenční značení protilátek jsou komerčně dostupné (například molekulární sondy firmy Pierce).

30 Výhodné je skladovat druhou protilátku v oddíle chráněném před světlem. Roztok druhé protilátky může být dodán ve formě kapaliny

protilátku nebo pro počáteční antigen. Proužek 20 se potom opláchne pro odstranění nenavázané druhé protilátky. Intenzita zbarvení, fluorescence nebo luminiscence je pak ukazatelem množství chromoforu, fluorescenčního, luminiscenčního nebo jiného indikátoru

5 imobilizovaného na testovacím proužku 20 a měření této intenzity je tedy také ukazatelem množství hormonu obsaženého v kapičce (kapičkách) krve.

Testovací destička 10 pro test ELISA v kapalně fázi podle předkládaného vynálezu je ukázána na obr. 2. Testovací destička 10

10 obsahuje cely na kapalinu 12, z nichž jedna je označena jako referenční cela nebo blank 14 a jedna nebo více dalších cel je označeno jako testovací cely 16. Cely 12 jsou pokryty odstranitelným filtrem 41. V jednom provedení obsahuje každá cela 16 specifickou anti-humánní monoklonální protilátku, tedy první protilátku, navázanou

15 na stěny cely. Vzorek úplné krve od pacienta se získá napíchnutím prstu nebo jiným standardním způsobem. Kapička (kapičky) krve se do každé cely nanáší běžnými prostředky a buněčná hmota v krvi se odfiltruje odstranitelným filtrem 41. Sérum, které pronikne filtrem 41, se ponechá reagovat s první protilátkou navázanou na stěny cel 16

20 a ponechá se také ve styku s celou blanku 14 obsahující blokovaný substrát bez první protilátky. Filtr 40 se potom odstraní a cely se promyjí pro odstranění nezreagovaného materiálu. Do všech cel se nanese sekundární protilátka specifická pro konjugovanou první primární protilátku nebo pro počáteční analyt značená chromoforem,

25 fluorescenčním nebo luminiscenčním komplexem. Cely se potom opláchnou pro odstranění nezkombinovaného sekundárního komplexu a měří se intenzita zbarvení, fluorescence nebo luminiscence. Intenzita zbarvení, fluorescence nebo luminiscence je ukazatelem množství chromoforového, fluorescenčního nebo luminiscenčního

30 komplexu přítomných v testovacím proužku, které je zase ukazatelem množství analytu v kapičce (kapičkách) krve.

Intenzita zbarvení ve každém z provedení podle vynálezu může být měřena porovnáním s barevnou tabulkou pro zjištění koncentrace požadovaného analytu v krvi. Výhodným zařízením pro měření intenzity zbarvení a tím pro stanovení množství hormonu ve vzorku je však zařízení 100 ukázané na obr. 3A a 3B. Zařízení 100 je s výhodou přenosný ruční reflektanční spektrofotometr, který má přijmout a "odečíst" vyvolaný proužek (tj. stanovit množství hormonu reprezentované intenzitou vyvinuté barvy), zobrazit výsledky pro operátora a zaznamenat výsledky do paměťového zařízení.

Ve výhodném provedení ukázaném na obr. 3A - 3B a 4 zahrnuje zařízení 100 reflektanční spektrofotometr, který obsahuje diodu emitující světlo (LED) 155 (znázorněná na obr. 4), která vyzařuje světelný paprsek 170 (zobrazený na obr. 4), přičemž světelný paprsek 170 obsahuje první paprsek 171 a druhý paprsek 173. Zařízení 100 může také obsahovat časovač 136 a vypínač pro zapínání a vypínání diody LED 155. Ve výhodném provedení vynálezu je světelný paprsek 170 monochromatický paprsek. Když se testovací proužek vloží do prostředku pro přijímání testovacího proužku 110 zařízení 100, světelné paprsky 171 a 173 dopadají na oblasti 30 a 32 testovacího proužku. První oblast 30 odráží první světelný paprsek 171 jako odražený paprsek 172, druhá oblast 32 odráží druhý světelný paprsek 173 jako odražený paprsek 174. Odražené světelné paprsky 172 a 174 jsou přijímány fotodetektory 151, popřípadě 152, jak je ukázáno na obr. 4. Protože první oblast 30 je oblast blanku bez navázaného chromoforu, nedojde po dopadu prvního světelného paprsku 171 na první oblast 30 k žádné detekovatelné změně intenzity a intenzita odraženého paprsku 172 detekovaného fotodetektorem 151 nebude detekovatelně odlišná od intenzity prvního paprsku 171. Chromofor obsažený ve druhé oblasti 32 bude absorbovat alespoň určité množství světla ze světelného paprsku 173 a proto se bude intenzita odraženého paprsku 174 detekovaného fotodetektorem 152 lišit od intenzity odraženého paprsku 172. Napětí V_1 a V_2 , výstupní napětí

fotodetektorů 151 a 152, se přivádějí do signálového procesoru 150. Signálový procesor 150 využívá rozdíl mezi napětími V_1 a V_2 pro výpočet koncentrace analytu ve vzorku. Ve výhodném provedení odečítá signálový procesor 150 napětí V_1 odpovídající oblasti blanku
 5 od napětí V_2 odpovídajícího signálu reakční oblasti a potom porovná rozdíl se standardní napěťovou křivkou představující hladiny hormonu. Signálový procesor 150 může obsahovat prostředky pro uchovávání informací a dat, jak je v oboru běžně známo. Koncentrace analytu se zobrazuje v okénku displeje 135, kterým je ve výhodném provedení
 10 displej z tekutých krystalů (LCD).

Dalším provedením předkládaného vynálezu, ve kterém sekundární protilátka obsahuje fluorescenční/luminiscenční komplex (indikátor) je provedení ukázané na obr. 5. Světelný zdroj 255 vytváří světelný paprsek 270, který může být buď monochromatický nebo
 15 může jít o širokopásmové záření. Ve výhodném provedení je záření širokopásmové, které je filtrováno filtračním prostředkem 257 pro specifickou vlnovou délku světla - excitační vlnovou délku pro daný fluorescenční indikátor. Světelný paprsek 270 obsahuje první světelný paprsek 271 dopadající na první oblast 30 testovacího proužku
 20 a druhý paprsek 273 dopadající na druhou oblast 32 růžku. Fluorescenční indikátor obsažený ve druhé oblasti 32 fluoreskuje jako odpověď na excitaci způsobenou druhým paprskem 273, přičemž vyzařuje světelný paprsek 274 s rozdílnou (delší) vlnovou délkou. Vlnová délka světelného paprsku 272 odraženého první oblastí 30
 25 není ovlivňována přítomností fluorescenčního indikátoru, protože první oblast 32 je oblast blanku, ve které není fluorescenční materiál přítomen. Fotodetektory 151 a 152 detekují světelné paprsky 272 a 273, které jsou filtrovány na požadovanou vlnovou délku fluorescence filtračním prostředkem 256. Filtry 256 a 257 jsou zvoleny tak, aby
 30 odpovídaly konkrétním požadovaným vlnovým délkám. Pro každý vzorek testovaný zařízením podle předkládaného vynálezu se zvolí příslušné filtry 256 a 257, které se použijí v zařízení.

Filtrace vlnových délek excitačního a fluorescenčního emisního zařízení se provádí filtračním prostředkem dobře známým odborníkům v oboru. Alternativně může být detekováno fotodetektory 151 a 153 nefiltrované emitované světlo a vlnová délka a údaje o amplitudě
 5 mohou být určeny procesorem 150 pomocí standardních prostředků pro zpracování signálů známých odborníkům v oboru.

Vícenásobné testy je možno provádět buď pro provedení zobrazené na obrázcích 1A - 1B nebo provedení znázorněné na obr. 2 alespoň dvěma způsoby: (i) použitím testovacího proužku s pouze
 10 jednou aktivní oblastí, kde na jednu aktivní oblast je možno testovat pouze jeden hormon, nebo (ii) použitím jedné nebo více aktivních oblastí na proužek, přičemž v některé nebo ve všech aktivních oblastech se testuje větší počet hormonů. Pro násobné proužky, které mají stejnou excitační a emisní vlnovou délku mohou být nezbytné
 15 vícenásobné zdroje 255 nebo fotodetektory 152. Pohyblivost zdroje 255, fotodetektoru 152 nebo testovacího proužku 20 mohou tyto požadavky na vícenásobnost odstranit. Pro testování většího počtu hormonů v dané aktivní matici je možno použít většího počtu excitačních filtrů 257 a/nebo větší počet emisních filtrů 156 pro
 20 postupné testování hormonů s různými fluorescenčními indikátory. Alternativně může používat procesor 150 prostředky pro zpracování signálu pro zjištění frekvence a spektrálního složení světla detekovaného fotodetektorem. Prostředky pro zpracování signálu budou odborníkům v oboru dobře známy.

Zařízení 100 může obsahovat zapisovač na magnetické karty (zobrazený na obr. 4 a 5 jako 160) pro uchovávání výstupu signálového procesoru 150 spolu s informací o datu a čase nebo vyjímatelnou magnetickou kartu (zobrazeno na obr. 4 a 5 jako 161). Vyjímatelná magnetická karta 161 se vkládá do prostředku pro
 25 přijímání magnetické karty 120, aby bylo možno provést operace čtení a zápisu. Pro stejný účel může být u zařízení 100 použit pružný disk.

Zařízení 100 může obsahovat vypínač ON/OFF 130, prostředek 132 pro inicializaci vyvolání a zobrazení údajů uložených na magnetické kartě nebo v paměti signálového procesoru, prostředek 133 pro vysouvání magnetické karty a prostředek displeje 135 pro
5 zobrazení analytických výsledků a informací o datu a čase.

Předpokládá se, že výše uvedené informace o výhodných provedeních struktury podle předkládaného vynálezu a o popisu její činnosti představují pouze jedno nebo dvě nejlepší provedení pro uskutečnění vynálezu. Odborníkům v oboru budou pravděpodobně po
10 přečtení popisu výhodných provedení a přiložených nároků a výkresů zřejmé další úpravy a variace vynálezu. Tyto modifikace a obměny spadají rovněž do rozsahu předkládaného vynálezu.

15

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Zařízení pro detekci přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje:
- zdroj vytvářející světelný paprsek s jednou nebo více předem určenými vlastnostmi, přičemž světelný paprsek dopadá v určitém úhlu na biologický vzorek;
- 10 detektor odpovědný za přijímání světelného paprsku šířícího se v určitém úhlu z biologického vzorku do detektoru, kde přijatý světelný paprsek má jednu nebo více intenzitních vlastností rozdílných od jedné nebo více předem určených vlastností dopadajícího světelného paprsku, kde rozdíl mezi vlastnostmi
- 15 dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku je způsoben přítomností biologického vzorku; a
- procesor využívající rozdílů mezi vlastnostmi dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku pro detekci přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém
- 20 vzorku.
- 25 2. Zařízení podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje displej komunikující s procesorem a zobrazující přítomnost analytu v biologickém vzorku.
3. Zařízení podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále obsahuje paměťové zařízení komunikující s procesorem a uchovávající informace o přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku.

4. Zařízení podle nároku 3, vyznačující se tím, že paměťovým zařízením je vyjímatelná magnetická karta nebo disk.
- 5
5. Zařízení podle nároku 1, vyznačující se tím, že dále obsahuje první filtr umístěný mezi zdrojem a biologickým vzorkem, kde první filtr slouží pro poskytnutí dopadajícího světelného paprsku s jednou nebo více předem určenými vlastnostmi, a druhý filtr umístěný mezi biologickým vzorkem a detektorem, kde druhý filtr slouží pro poskytnutí změněného světelného paprsku přijímaného detektorem.
- 10
6. Zařízení podle nároku 5, vyznačující se tím, že biologický vzorek obsahuje fluorescenční látku.
- 15
7. Zařízení podle nároku 6, vyznačující se tím, že předem určenou vlastností je vlnová délka dopadajícího světelného paprsku.
- 20
8. Zařízení podle nároku 6, vyznačující se tím, že přijímaný světelný paprsek má odlišnou vlnovou délku od vlnové délky dopadajícího světelného paprsku.
- 25
9. Zařízení podle nároku 1, vyznačující se tím, že biologický vzorek obsahuje chromofor.

10. Zařízení podle nároku 9, vyznačující se tím, že předem určenými vlastnostmi jsou intenzita a vlnová délka dopadajícího světelného paprsku.
- 5 11. Zařízení podle nároku 9, vyznačující se tím, že přijímaný světelný paprsek má rozdílnou intenzitu od dopadajícího světelného paprsku.
- 10 12. Zařízení podle nároku 1, vyznačující se tím, že analyt je zvolen ze skupiny luteinizační hormon, estradiol, FSH, TSH, progesteron a jejich kombinace.
- 15 13. Souprava pro detekci přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku, vyznačující se tím, že obsahuje:
- médium obsahující analytickou matici s reakční oblastí, na kterou se nanáší biologický vzorek, přičemž reakční oblast obsahuje imobilizovanou první protilátku se specifickou afinitou k analytu;
- 20 detekovatelnou druhou protilátku s detekovatelným indikátorem, kde druhá protilátka má specifickou afinitu k analytu; a
- zařízení pro detekci přítomnosti analytu v biologickém vzorku, kde toto zařízení obsahuje:
- 25 zdroj vytvářející světelný paprsek s jednou nebo více předem určenými vlastnostmi, přičemž světelný paprsek dopadá v určitém úhlu na biologický vzorek;
- detektor odpovědný za přijímání světelného paprsku šířícího se v určitém úhlu z biologického vzorku do

5 detektoru, kde přijatý světelný paprsek má jednu nebo více vlastností intenzity rozdílných od jedné nebo více předem určených vlastností dopadajícího světelného paprsku, kde rozdíl mezi vlastnostmi dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku je způsoben přítomností biologického vzorku; a

10 procesor využívající rozdílů mezi vlastnostmi dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku pro detekci přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku.

14. Souprava podle nároku 13, vyznačující se tím, že první protilátka je zvolena ze skupiny monoklonální protilátka, polyklonální protilátka a jejich fragmenty.
- 15
15. Souprava podle nároku 13, vyznačující se tím, že druhá protilátka je zvolena ze skupiny monoklonální protilátka, polyklonální protilátka a jejich fragmenty.
- 20
16. Souprava podle nároku 13, vyznačující se tím, že první protilátka a druhá protilátka jsou monoklonální protilátky a první protilátka a druhá protilátka se vážou na různé epitopy analytu.
- 25
17. Souprava podle nároku 13, vyznačující se tím, že detekovatelný indikátor druhé protilátky je fluorescenční komplex nebo molekula.

18. Souprava podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e detekovatelný indikátor druhé protilátky je chromofor.
19. Souprava podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
5 ž e fluorescenční komplex nebo molekula je zvolena ze skupiny fluorescein, rhodamin, barvivo texas red a jejich kombinací.
20. Souprava podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
10 ž e analyt je zvolen ze skupiny luteinizační hormon, estradiol, FSH, TSH, progesteron a jejich kombinací.
21. Souprava podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
15 ž e médium je proužek.
22. Způsob detekce přítomnosti alespoň jednoho analytu
v biologickém vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e zahrnuje:
- 20 poskytnutí světelného paprsku dopadajícího v určitém úhlu na biologický vzorek, přičemž světelný paprsek má alespoň jednu předem určenou vlastnost;
- vystavení biologického vzorku působení dopadajícího světelného paprsku takovým způsobem, že se dopadající světelný paprsek převádí na přijímaný světelný paprsek postupující mezi biologickým vzorkem a detektorem, přičemž
25 přijímaný světelný paprsek má alespoň jednu intenzitní vlastnost rozdílnou od dopadajícího světelného paprsku;
- detekci přijímaného světelného paprsku detektorem; a

využití rozdílu alespoň jedné vlastnosti dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku pro poskytnutí údaje o přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku.

5

23. Způsob detekce přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku, vyznačující se tím, že zahrnuje:

10

poskytnutí média obsahujícího analytickou matici s reakční oblastí, přičemž reakční oblast obsahuje imobilizovanou první protilátku se specifickou afinitou k analytu;

nanesení biologického vzorku do reakční oblasti;

15

nanesení detekovatelné druhé protilátky s detekovatelným indikátorem do reakční oblasti, kde druhá protilátka má specifickou afinitu k analytu;

osvětlení reakční oblasti dopadajícím světelným paprskem v určitém úhlu, přičemž tento paprsek má alespoň jednu předem určenou vlastnost;

20

detekci přijímaného světelného paprsku, který je výsledkem změny alespoň jedné intenzitní vlastnosti dopadajícího světelného paprsku způsobené detekovatelným indikátorem; a

25

využití rozdílu mezi alespoň jednou vlastností dopadajícího světelného paprsku a přijímaného světelného paprsku pro detekci přítomnosti alespoň jednoho analytu v biologickém vzorku.

24. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že první protilátka je zvolena ze skupiny monoklonální protilátka, polyklonální protilátka a jejich fragmenty.

25. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že druhá protilátka je zvolena ze skupiny monoklonální protilátka, polyklonální protilátka a jejich fragmenty.
- 5 26. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že první protilátka a druhá protilátka jsou monoklonální protilátky a první protilátka a druhá protilátka se vážou na různé epitopy analytu.
- 10 27. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že detekovatelný indikátor druhé protilátky je fluorescenční komplex nebo molekula.
- 15 28. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že detekovatelný indikátor druhé protilátky je chromofor.
- 20 29. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že fluorescenční komplex nebo molekula je zvolena ze skupiny fluorescein, rhodamin, barvivo texas red a jejich kombinací.
30. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že analyt je zvolen ze skupiny luteinizační hormon, estradiol, FSH, TSH, progesteron a jejich kombinací.
- 25 31. Způsob podle nároku 23, vyznačující se tím, že médium je proužek.

Zastupuje:

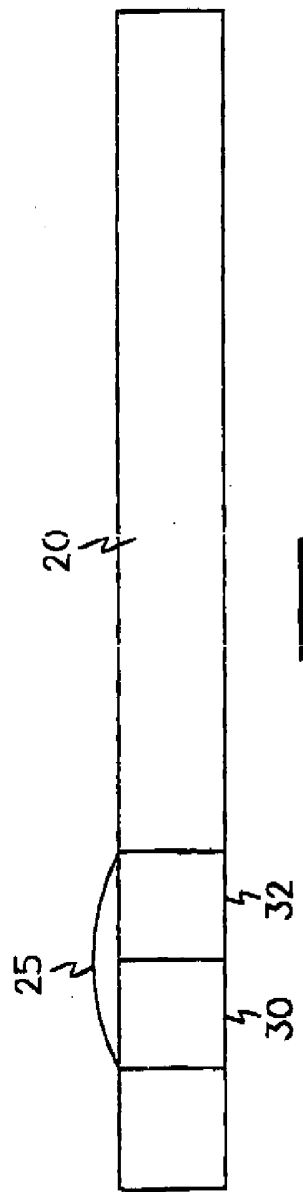


FIG. 1A

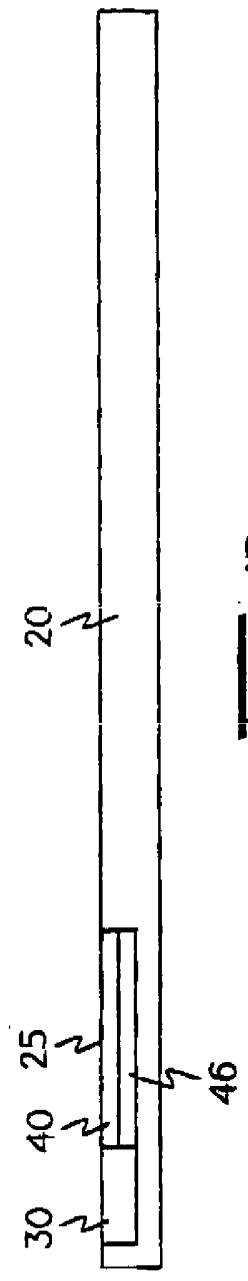


FIG. 1B

Fig-2



3/5

135

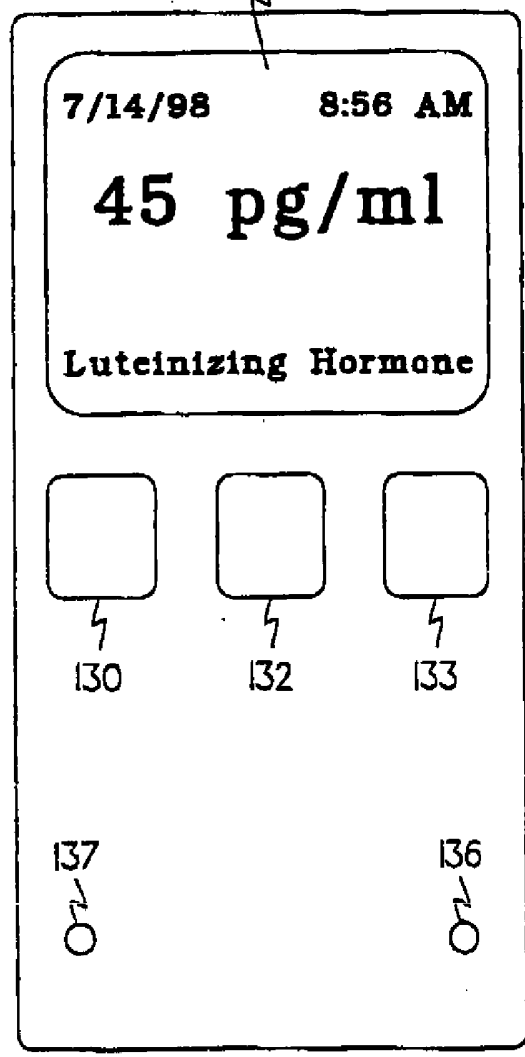


Fig-3A

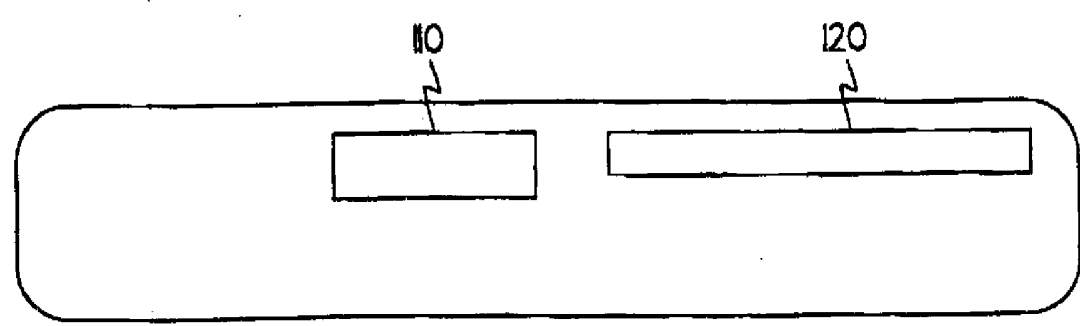


Fig-3B

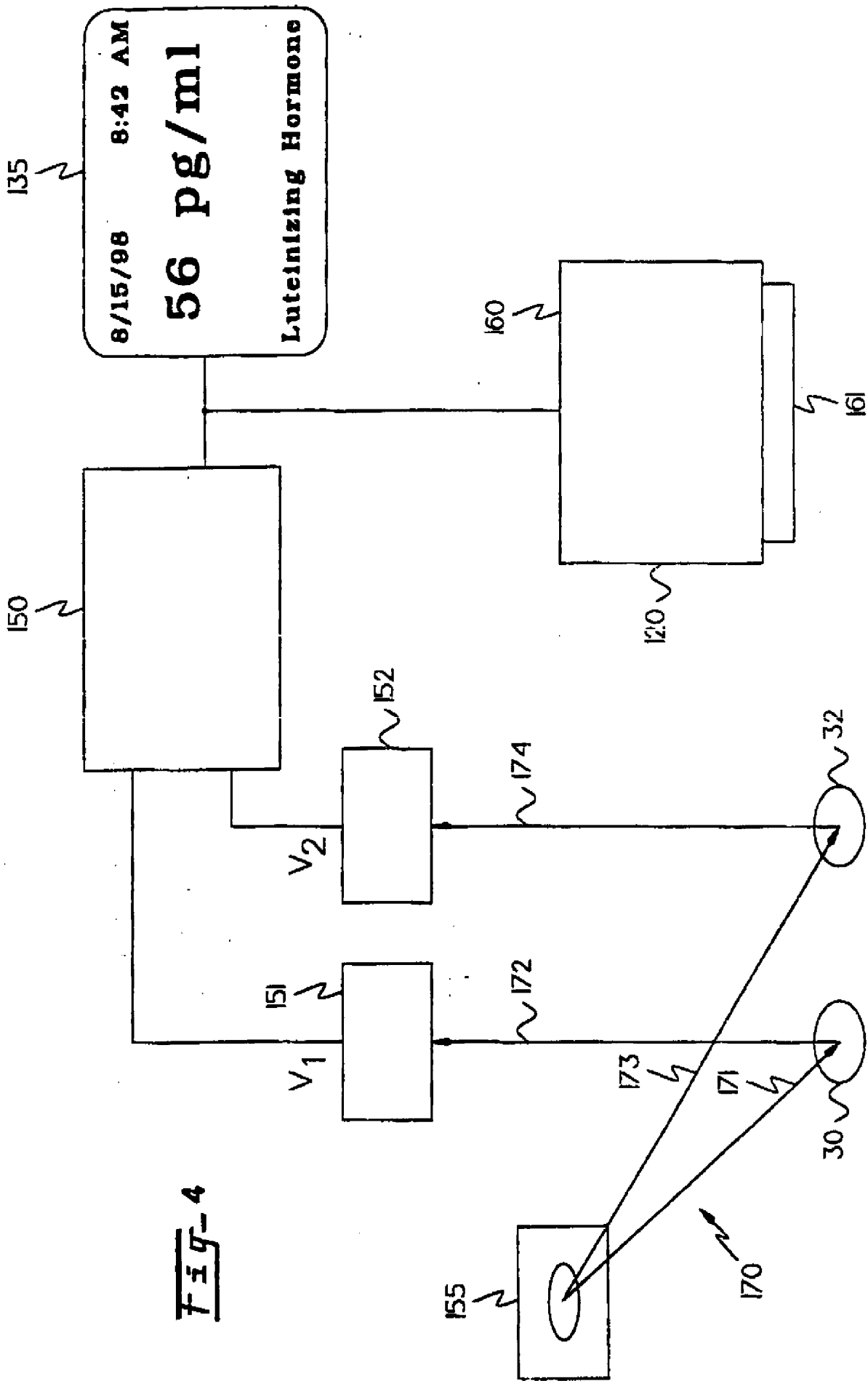


Fig-4

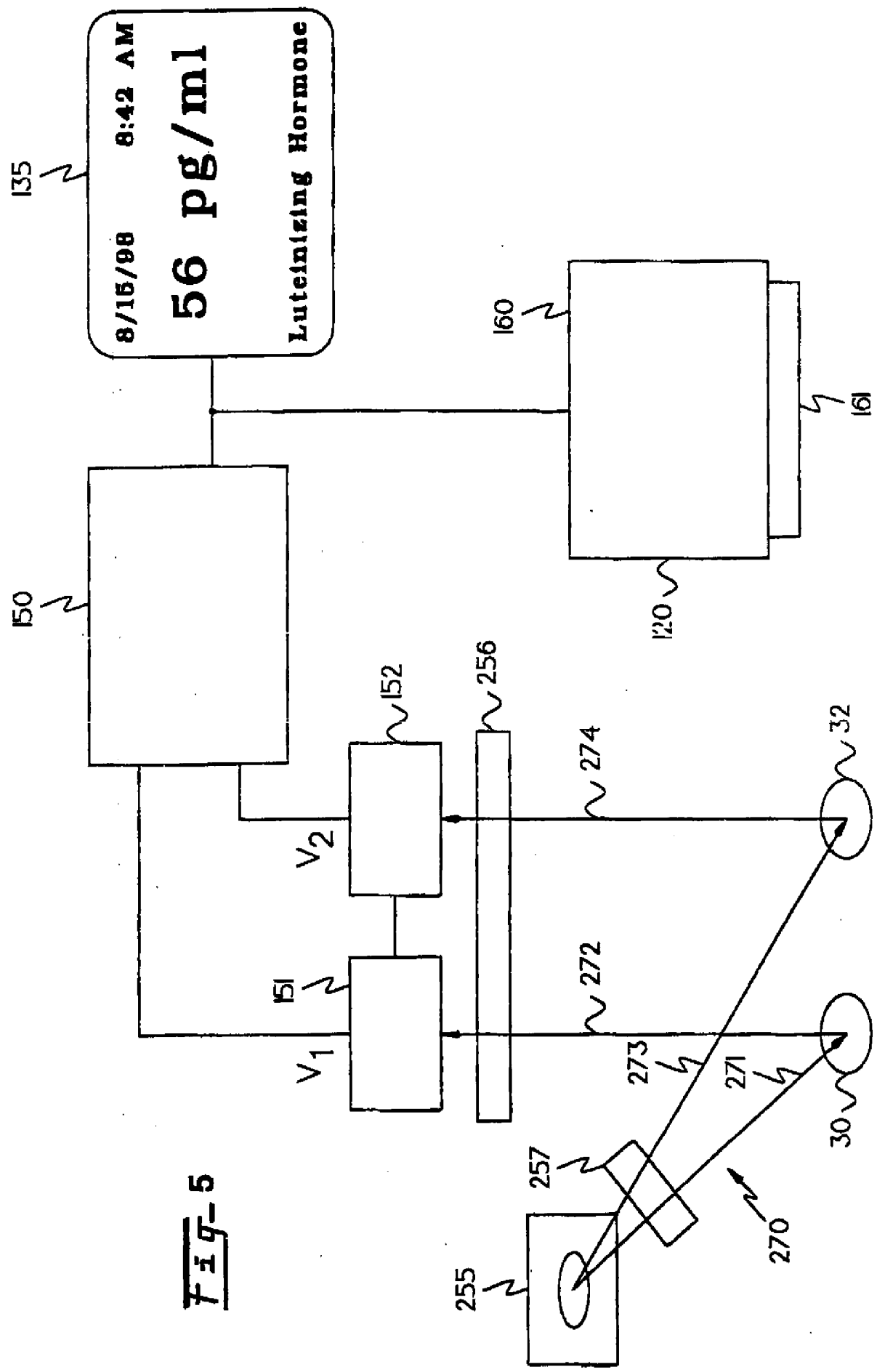


Fig-5