

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

176294

Nemzetközi osztályozás:

G 01 N 21/02,
33/16

Bejelentés napja: 1977. VIII. 16. (MI-622)

Japán-beli elsőbbsége: 1976. VIII. 16.
(97158-1976)

Közzététel napja: 1980. VII. 28.

Megjelent: 1981. VIII. 31.

Feltalálók:

Sawai Masanobu vegyész, Sudo Tadamitsu vegyész, Kanagawa, Enomoto
Shogo vegyész, Saitama, Japán

Szabadalmas:

Mitsubishi Chemical Industries
Limited, Tokió, Japán

Eljárás antigének és antitestek meghatározására

1

A találmány tárgya eljárás antigének és antitestek meghatározására. Közelebbről, a találmány tárgya eljárás antigének és antitestek kvantitatív mérése. A találmány szerint valamely antitestet vagy antigént kis részecskeátmérőjű, oldhatatlan hordozón rögzítünk az oldhatatlan hordozó részecskék érzékenyítése céljából, az érzékenyített hordozót megfelelő antigénnel, antitesttel vagy elegyükkal reagáltatjuk, a reakcióelegyet meghatározott hullámhosszúságú fénnel sugározzuk be és a reakcióelegy extinkcióját mérjük.

Egyre nagyobb szükség van rendkívül csekély koncentrációban jelenlevő, biológiailag aktív anyagok, például antigének, antitestek gyors, pontos, kvalitatív és kvantitatív meghatározására. Jelenleg számos helyen kívánatos a testfolyadékokban jelenlevő gyógyszerek meghatározása. Ezen túlmenően, az orvosi diagnózishoz gyakran igen fontos annak ismerete, hogy jelen vannak-e különféle olyan anyagok, amelyeket a beteg bevesz, vagy pedig a szervezet maga szintetizál.

Ismeretes, hogy az antitestek vagy antigének félkvantitatív kimutatása olyan módon hajtható végre, hogy antitestet vagy antigént hordozó latex-részecskéket megfelelő antigénnel vagy antitesttel reagáltatunk üveglemezen, és vizuális úton megfigyeljük az agglutinációt.

Az elmúlt évek során eljárást ismertettek antigének és antitestek kvantitatív meghatározására [Croatia Chemica Acta, 42, 457-466 (1970) és

2

European Journal of Biochemistry, 20(4), 558-560 (1971)].

Az ismert eljáráshoz valamely antitestet vagy antigént hordozó latex-részecskéket alkalmaznak, és a hordozón jelenlevő antitestet vagy antigént megfelelő antigénnel vagy antitesttel reagáltatják a latex-részecskék agglutinálása céljából, majd pedig látható fénysugár segítségével mérik a latex feletti folyadék zavarosságának csökkenési sebességét. Ilyen módon tehát a latex-reagens agglutinációját használják fel az antigén vagy az antitest meghatározására.

Mivel az ismert eljárásnál a zavarosság csökkenésének sebességét mérik, szükség van arra, hogy rendkívül kis koncentrációban, például 0,007-0,028% között alkalmazzák az antitesttel vagy antigénnel érzékenyített latexet, stacionárius állapotban végezzék el a latex és az antigén vagy antitest reakcióját, eltávolítsák azokat az esetleges szennyező anyagokat, amelyek befolyásolhatják a minta zavarosságát, stb. Mindezek következtében hátrányos a fenti ismert eljárás, amennyiben elkerülhetetlenül csökken az antigén-antitest reakció sebessége, továbbá, sem a pontosság, sem pedig a reprodukálhatóság nem kielégítő az antigének vagy antitestek meghatározásához, valamint, a szennyező anyagok eltávolítása egyes esetekben rendkívül bonyolult műveleteket igényel. Ezért az ismert eljárás nehezen alkalmazható olyan antigének meghatározására, mint a fibrinogén (Fg), humán chorion-gon-

adotropin (hcg) (hCG), stb., amelyeknél bonyolult műveletek szükségesek a reagens elkészítéséhez, és amelyeknél nehezen érhető el reprodukálható agglutinációs reakció, amikor az említett anyag a vérben vagy a vizeletben van jelen, mivel mind a vér, mind pedig a vizelet tartalmaz különféle, a reakciót esetleg hátrányosan befolyásoló más anyagokat is.

Egy további szakcikkből [Immunochimistry, 12, 349–351 (1975)] eljárást ismertettek antitestek vagy antigének kvantitatív meghatározására. Az ismert eljárás szerint a fentebb említett, agglutinált latex-részecskéket lézersugárral sugározzák be, és mérik a lézersugár szórt fénye színképvonalainak a szélességét. A mérésből meghatározzák a közepes diffúziós állandót (D), amely jelzi az agglutinált részecskék Brown-féle mozgását. Ez utóbbi viszont fordítva arányos az agglutinált részecskék méretével.

Ennél az ismert eljárásnál is – mivel az antigént vagy antitestet hordozó latexet rendkívül csekély koncentrációban, például akár 0,001% koncentrációban alkalmazzák – annyira lecsökken az antigén-antitest reakciósebessége, hogy sem a mérés pontossága, sem pedig a reprodukálhatósága nem kielégítő. Ezen túlmenően, hátrány még, hogy a színképanalízis módszerének alkalmazása bonyolult számolást von maga után, a szükséges műveletek szintén bonyolultak, és a mintában esetleg jelenlevő szennyező anyagokat a mérés előtt el kell távolítani. Mindezen hátrányok következtében ezt az ismert eljárást sem alkalmazzák a gyakorlatban.

A fentebb idézett Immunochimistry, 12, 349–351 (1975) szakcikk egyúttal utal a zavarosság mérésén alapuló ismert eljárásra, megjegyezve, hogy az rendkívül pontatlan eredményeket ad (2. ábra a 350. oldalon).

Ezért a találmány feladata olyan eljárás biztosítása, amelynek segítségével a vizsgálandó mintában jelenlevő antitest és/vagy antigén nagy pontossággal és jól reprodukálhatóan, gyorsan meghatározható.

A találmány további célja olyan eljárás kidolgozása, amelyek segítségével gyorsan kimutatható, hogy valamely antitest vagy antigén koncentrációja a mintában nagyobb vagy kisebb egy meghatározott értéknél, és a vizsgálat rendkívül csekély mintamennyiségből elvégezhető.

A találmány további célja eljárás biztosítása olyan rendkívül kis mennyiségű antigén és/vagy antitest meghatározásához, amely korábban gyakorlatilag csak a radioimmun-vizsgálat (RIA) segítségével volt meghatározható, a radioimmun-vizsgálatával megegyező pontossággal, azonban lényegesen gyorsabban és biztonságosabban.

A találmány még további célja olyan eljárás kidolgozása, amely antigének kvantitatív meghatározására szolgál, és nemcsak többértékű vagy polifunkciós antigének, hanem hiányos antigének, például a haptének meghatározására is alkalmas.

A találmány további feladata eljárás biztosítása antitestek és/vagy antigének meghatározására, amelynek során az antigének és/vagy antitestek agglutinációja mellett azok gátló hatásait is kihasználjuk.

Amint fentebb már említettük, a gyakorlatban egyáltalán alkalmazott ismert eljárás – amelynél az antitest vagy antigén segítségével érzékenyített latex-részecskéket antigént vagy antitestet tartalmazó mintával érintkeztetve agglutinációt hoznak létre, és annak mértékét a folyadék zavarosságának csökkenési sebességével mérik – különböző hátrányokkal rendelkezik. Ilyen hátrány a meghatározás nem kielégítő pontossága és reprodukálhatósága, mivel a reakciót rendkívül híg latex alkalmazásával, stacionárius állapotban kell kivitelezni. További hátrány, hogy először el kell távolítani minden olyan szennyező anyagot, amely a zavarosságot befolyásolhatja.

Nyilvánvaló tehát, hogy abban az esetben, ha a mintában jelenlevő antigént és/vagy antitestet nagy pontossággal és jó reprodukálhatósággal kívánjuk meghatározni, az antigénnel vagy antisszel érzékenyített oldhatatlan hordozót, például a latex-részecskéket lehetőleg nagy koncentrációban kell a meghatározni kívánt mintával érintkeztetnünk, amely olyan antigént és/vagy antitestet tartalmaz, amely reagálni képes a hordozón jelenlevő antisszel vagy antigénnel, hogy ezáltal meggyorsítsuk az antigén-antitest reakciót. Emellett a reakciót előnyösen a reakcióelegy mozgatása közben, nem pedig stacionárius állapotban kellene kivitelezni.

Azt találtuk, hogy az oldhatatlan hordozórészecskéken lehetőleg nagy koncentrációban jelenlevő antitest vagy antigén és a mintában jelenlevő megfelelő antigén vagy antisszel közötti reakció nem-stacionárius körülmények közötti kivitelezése során és a reakció lejátszódása mértékének egyidejű kvantitatív kimutatásakor különösen kedvező eredményeket kapunk, ha legfeljebb 1,6 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű, oldhatatlan hordozót alkalmazunk, az antigén-antitest reakciónál képződő elegyet 0,6–2,4 mikrométer hullámhosszú fényrel besugározzuk, ahol az alkalmazott fény hullámhossza 1,5–10-szerese a hordozórészecskék átlagos átmérőjének, és mérjük az elegyen áthaladt fény intenzitását.

A találmány alapját az a felismerés képezi, hogy az antigén-antitest reakció lejátszódásának mértéke, az érzékenyített, oldhatatlan hordozórészecskék jelenlétében, nagyon pontosan arányos az elegyen átbocsátott fény intenzitásával. Az antigén-antitest reakció lejátszódásának mértéke a mintában jelenlevő antisszel és/vagy antigén mennyiségével vagy koncentrációjával is arányos, feltéve, hogy a reakció meghatározott körülmények között megy végbe.

A találmány szerint ezért úgy végezzük az antigének és antitestek meghatározását, hogy valamely antitestet vagy antigént, célszerűen antifibrinogént, anti(humán chorion-gonadotropin)-t, humán chorion-gonadotropint, oxitocint, anti(humán immunoglobulin E)-t, anti(humán immunoglobulin G)-t, anti(humán immunoglobulin M)-t, anti(sértés inzulin)-t, anti(humán chorion-gonadotropin)-béta-alegységet, humán gamma-globulint vagy anti(humán alfa-feto-protein)-t, legfeljebb 1,6 mikrométer átlagos átmérőjű oldhatatlan hordozórészecskékhez rögzítünk, és ezáltal az oldhatatlan hordozórészecskéket érzékenyítjük, a hordozón jelenlevő antisszel és/vagy

antigént megfelelő antigénnel vagy antitesttel vagy elegyükkal cseppfolyós közegben reagáltatjuk, a reakcióelegyet 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fénnel besugározzuk, ahol az alkalmazott fény hullámhossza 1,5–10-szerese a hordozórészecskék átlagos átmérőjének, és mérjük a reakcióelegy extinkcióját.

A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi a mintában jelenlevő antitest és/vagy antigén rendkívül pontos és gyors meghatározását, olyan módszer alkalmazásával, amely eltér a zavarosodást vagy a közepes diffúziós állandót meghatározó ismert módszerektől.

A találmány szerinti eljáráshoz alkalmazott, 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fény a közeli infravörös tartományban vagy a látható tartomány azon részében helyezkedik el, amely a közeli infravörös mellett van. A találmány szerint előnyösen olyan fényt alkalmazunk, amely a közeli infravörös tartományban helyezkedik el, és hullámhosszúsága 0,8–1,8 mikrométer, célszerűen 1–1,4 mikrométer. A molekulaszervezet tanulmányozásánál vagy a molekulák tulajdonságainak vizsgálatánál ismertek azok a színeképelemző eljárások, amelyeknél legalább 2,5 mikrométer hullámhosszúságú infravörös vagy legfeljebb 0,4 mikrométer hullámhosszúságú ultraibolya fényt alkalmaznak. A közeli infravörös tartományba, vagy az ezzel szomszédos látható tartományba eső fényt, amelyet a találmány szerinti eljáráshoz alkalmazunk, és amelyet az egyszerűség kedvéért a továbbiakban „a közeli infravörös tartományba eső fény”-nek nevezünk, mindeddig csak korlátozott mértékben használták.

Azt találtuk, hogy a közeli infravörös tartományba eső fény alkalmazása különösen előnyös a találmány szerinti eljáráshoz, mivel igen jól áthatol vizes közegeken, így vízben, vizes oldatokon, stb., amelyek általában az antigéneket vagy antitesteket tartalmazó minták alapvető közegei (víz, szérumok, vizelet, sóoldatok, stb.), továbbá a fentebb említett latexek alapközegein. Különösen a 0,8–1,4 és az 1,53–1,88 mikrométer közötti hullámhosszúságú közeli infravörös tartományba tartozó fényt nyelik el igen csekély mértékben a vizes közegek.

Továbbá azt tapasztaltuk, hogy amikor a legfeljebb 1,6 mikrométer, előnyösen 0,1–1 mikrométer átlagos átmérőjű, az antitesttel vagy az antigénnel érzékenyített oldhatatlan hordozórészecskéket a mintában jelenlevő antigénnel és/vagy antitesttel reagáltatjuk, és a reakcióelegyet a hordozórészecskék átlagos átmérőjénél 1,5–10-szer, előnyösen 2–10-szer nagyobb hullámhosszúságú, a közeli infravörös tartományba eső fénnel a találmány szerint besugározzuk, a reakcióelegyen áthaladó fény intenzitásváltozása igen pontosan megfelel az antigén-antitest reakcióval bekövetkezett agglutináció mértékének. A találmány szerint alkalmazott fényenél tapasztalt átérésztés az A extinkciónak felel meg, amely spektrofotométerek, például az infravörös spektrometriában szokásosan alkalmazott készülékek segítségével meghatározható. Így az egyszerűség kedvéért a fényátersztést a következőkben az extinkcióval fejezzük ki

Az infravörös spektrométer segítségével meghatározott A extinkcióra a következő összefüggés érvényes:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

ahol I_0 a csak oldószert tartalmazó abszorpciós küvettán áthaladó fény intenzitása,

I egy meghatározott koncentrációjú oldatot tartalmazó küvettán áthaladó fény intenzitása.

Igy a fentebb említett fényátersztésen a következőkben az egyszerűség kedvéért az A extinkciót értjük.

A találmány szerint az A extinkciót olyan spektrométer segítségével határozhatjuk meg, amely hasonló a közeli infravörös tartományban használatos spektrofotométerekhez. Fényforrásként a fentebb említett közeli infravörös tartományba eső fényt alkalmazzuk, és a fenti képletet használjuk, ahol I_0 a küvettán átvezetett, közeli infravörös tartományba eső fény intenzitása, amikor a küvettát antitesttel vagy antigénnel érzékenyített oldhatatlan hordozórészecskékből álló elegyet vagy olyan szuszpenziót tartalmaz, amely a hordozórészecskékből és a minta alapközegeből áll, I pedig a küvettán átvezetett, közeli infravörös tartományban eső fény intenzitása, abban az esetben, amikor a küvettát antitesttel vagy antigénnel érzékenyített oldhatatlan hordozórészecskékből álló szuszpenzió és az antigént és/vagy antitestet tartalmazó minta reakciójával képződő elegyet tartalmazza.

Röviden, a fentebb említett A extinkció az I_0/I aránynak felel meg. Ha a minta alapközege átlátszó folyadék, I_0 értékét egyszerűen úgy határozhatjuk meg, hogy az antitesttel vagy az antigénnel érzékenyített oldhatatlan hordozórészecskék szuszpenzióját például vízzel megfelelő koncentrációra hígítjuk.

A találmány szerinti eljárás további részletei és előnyei a leírás további részéből és a példákban ismerhetők meg, ahol a mellékelt ábrákra is hivatkozunk.

Az 1. ábra a víz abszorpciós spektrumát mutatja be 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fény alkalmazásával. A felvételhez 1 mm vastagságú küvettát használtunk.

A 2. ábra azt szemlélteti, hogy az extinkció hogyan változik a polisztirol-latex részecskék átmérőjével.

A 3. ábra az extinkció változását mutatja egy antigén-antitest reakció reakcióidejének függvényében.

A 4. ábra a találmány szerinti meghatározás kivitelezésére szolgáló berendezés sematikus felépítését ábrázolja.

Az 5. ábra abszorpciós küvettá perspektivikus ábrázolása. A küvettá minták, ellenőrző minták vagy vakpróbák méréséhez egyformán alkalmas.

A 6. ábra a találmány szerint előnyösen alkalmazott keverő berendezés vázlatos rajza.

A 7. ábrán fibrinogénre vonatkozó kalibrációs görbe látható 1,2 mikrométer hullámhosszon. A kalibrációs görbe standard fibrinogén-oldat és

0,481 mikrométer átlagos átmérőjű antifibrinogén-polisztirol-latexrészecskék alkalmazásával lett felvéve.

A 8. ábra egy 1,2 mikrométer hullámhosszon felvett extinkciós görbét mutat be. A mérés 0,32 mikrométer átlagos átmérőjű antifibrinogén-szilikiumdioxidrészecskék és standard fibrinogén-oldatok sorozatának alkalmazásával történt.

A 9. ábra kalibrációs görbét szemléltet, s arra az időre vonatkozik, amely ahhoz szükséges, hogy 1,2 mikrométer hullámhosszúságon az extinkció 0,5 értéket érjen el. A méréshez antifibrinogénnel érzékenyített latexreagenst különböző koncentrációjú standard fibrinogén-oldatokkal reagáltattunk.

A 10. ábrán 1,2 mikrométer hullámhosszon felvett extinkciós kalibrációs görbe látható. A görbe meghatározásához oxitocin-antiszérumot reagáltattunk különböző koncentrációjú standard oxitocin-oldatokkal, majd a reakcióelegyhez latex-részecskéket adtunk, amelyeket az oxitocin érzékenyített.

A 11. ábrán 1,0 mikrométernél meghatározott extinkciós kalibrációs görbét tüntettünk fel, amelyet úgy kaptunk, hogy anti/humán chorion-gonadotropin-szérumot humán chorion-gonadotropin különböző koncentrációjú standard oldataival reagáltattunk, majd a kapott reakcióelegyhez humán chorion-gonadotropinnal érzékenyített latex-részecskéket adtunk.

A 12. ábra a kimutatás érzékenységének az antifibrinogénnel érzékenyített polisztirol-latex koncentrációjával való változását mutatja.

A 13. ábra a humán immunglobulin E extinkciós kalibrációs görbét szemlélteti, amely a 0,94 mikrométer hullámhosszúságú fény alkalmazásával mért extinkció változását adja meg a standard humán immunglobulin E-oldat mikrogramm/ml egységben kifejezett koncentrációja függvényében.

A 14. ábra az inzulin extinkciós kalibrációs görbét mutatja be.

A 15. ábrán a humán chorion-gonadotropin beta-alagysége extinkciós kalibrációs görbéje látható.

Például az 1. ábrán a fény hullámhosszát az abszcisszára, a fény százalékos átbocsátását pedig az ordinátára vittük fel, és a görbe 1 mm vastagságú vízréteg százalékos átbocsátási spektrumát szemlélteti a 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhossz-tartományban. Az 1. ábráról leolvasható, hogy a 0,6–1,4 mikrométer hullámhosszúságú fény gyakorlatilag számottevő abszorpció nélkül áthatol a vízen, amely egyébként a latexek és a minták számára a legkiterjedtebben alkalmazott alapközeg. Az 1,53–1,88 mikrométer közötti hullámhosszúságú fény szintén lényegében áthatol, úgy, hogy az ebbe a hullámhossz-tartományba eső fény alkalmazható a találmány szerinti eljárashoz.

Látható továbbá az 1. ábrán, hogy a 2,1–2,35 mikrométer hullámhosszúságú fénynek csupán mintegy 20%-át engedi át a víz, ezért az ilyen fény alkalmazásakor — ami egyébként nem előnyös — nagy érzékenységű fotométer használata szükséges.

A 2. ábra 1 súly% szilárdanyag-tartalmú polisztirol-latex extinkciója (ordináta) és a fény hullám-

hossza (abszcissza, mikrométerben) közötti összefüggést mutatja, 2 mm vastagságú abszorpciós kűvet alkalmazásakor. Az A görbe 0,481 mikrométer átlagos átmérőjű részecskékből álló polisztirol-latex extinkciójának változását, a B görbe pedig 0,804 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latex extinkciójának változását ábrázolja. Az extinkció meghatározásához előnyösen hígítjuk a latexet, s a leolvasott extinkció-érték és a hígítás szorzatát tekintjük a latex extinkciójának.

A 2. ábráról kitűnik, hogy a latex extinkciója 0,6 mikrométer alatti hullámhosszon erősen növekszik, és ezért ilyen hullámhosszúságú fény használatkor nehezen határozható meg az antigén-antitest reakcióelegy fényátbocsátásának változásai. Ha viszont legalább 0,8 mikrométer, célszerűen legalább 1 mikrométer hullámhosszúságú fényrel dolgozunk, akkor a latexnek, az extinkciója viszonylag csekély. Ezért legalább 0,8 mikrométer, célszerűen pedig legalább 1 mikrométer hullámhosszúságú fényt alkalmazunk a találmány szerint a fényátbocsátás fentebb említett méréséhez.

A 2. ábra A és B görbéjének összehasonlításából megállapíthatjuk, hogy a latex extinkciója növekszik a polisztirol-latex-részecskék átlagos átmérőjének növekedésével. Ennek következtében a rendkívül nagy átlagos átmérőjű latex-részecskék nem alkalmasak a találmány szerinti eljárashoz. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a találmány szerinti eljárashoz alkalmas, oldhatatlan hordozórészecskék átlagos vagy közepes részecskeátmérője legfeljebb 1,6 mikrométer. Előnyösek a 0,1–1 mikrométer közötti átlagos átmérőjű latex-részecskék. Különösen előnyösek a 0,2–0,8 mikrométer közötti átmérőjű részecskék.

A 3. ábra összefüggést ad meg egy antigén-antitest reakcióelegynek az ordinátára felvitt extinkciója és az alkalmazott fény hullámhosszúsága között — ez utóbbit az abszcisszán tüntettük fel mikrométerben —, különböző reakcióidőkben. Az antigén-antitest reakciót pontosan az 1. példában ismertetésre kerülő módon végeztük, mindössze az azal az eltéréssel, hogy 0,234 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latexet alkalmaztunk. A 3. ábrán látható C, D és E görbe a reakcióelegy extinkcióját szemlélteti, 3, 10 illetve 20 perccel az antigén-antitest reakció kezdete után.

3. ábráról leolvasható, hogy abban az esetben, ha az antigén-antitest reakcióelegy extinkcióját 0,6 mikrométernél rövidebb hullámhosszúságú, körülbelül 0,4–0,6 mikrométer közötti hullámhosszúságú fényrel határozzuk meg, az extinkció változás nem alkalmas a reakció követésére, és körülbelül 0,4 mikrométernél nem nagyobb hullámhosszúságú fény alkalmazásakor az extinkció egyáltalában nem változik észrevehetően a reakció előrehaladásával. Másrészt, legalább körülbelül 0,75 mikrométer hullámhosszúságú fény alkalmazásakor igen jó összefüggés áll fenn a reakcióelegy extinkciója és a reakcióidő között. A 3. ábra C, D és E görbéjén szaggatottan megadott tartományokban az extinkció még nagyobb résszélesség alkalmazásakor sem határozható meg pontosan, mivel a víz fényabszorpciója igen nagy ezekben a tartományokban.

Amint a későbbiek során ismertetésre kerülő 4. példából kitűnik, 0,804 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latex alkalmazásakor jó összefüggést érünk el az antigén-antitest reakció-elegy extinkciója és az antigénkoncentráció között, abban az esetben, ha olyan hullámhosszúságú fényt alkalmazunk, amely legalább 1,5-szerese a részecskék átlagos átmérőjének, például körülbelül 1,2 mikrométer hullámhosszúságú fényenél, feltéve, hogy az antigén koncentrációja a mintában nem haladja meg a 0,6 mikrogramm/ml értéket. Ebben az esetben a találmány szerinti kvantitatív meghatározás 1,2 mikrométer vagy ennél nagyobb hullámhosszúságú fény alkalmazásával hajtható végre.

Viszonylag kis átlagos részecskeátmérőjű latex-részecskék használatakor előnyös – amint ez a 3. ábrán látható – a közeli infravörös tartományba eső 0,8–1,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fény alkalmazása. Különösen előnyösen 1–1,4 mikrométer közötti vagy ennél nagyobb hullámhosszúságú fényt használunk, amelynek a hullámhossza legalább kétszerese a hordozórészecskék átlagos átmérőjének.

A találmány szerint a meghatározott antitestet vagy meghatározott antigént tartalmazó hordozóanyagból és a vizsgálandó folyadékban jelenlevő meghatározott antigénből, antitestből vagy elegyből álló reakcióelegyet 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fényenél világítunk meg, és először meghatározzuk azt a hullámhosszúság-tartományt, amelyben kvantitatív összefüggés áll fenn a vizsgálandó folyadékban jelenlevő antigén, antitest vagy elegy (a reakcióterméket is beleértve) koncentrációjának változása és a reakcióelegy extinkciója között, majd pedig olyan fényt alkalmazunk az extinkció meghatározásához, amelynek hullámhossza e tartományon belül helyezkedik el, és a méréshez előnyös.

A találmány szerint így mód nyílik arra, hogy a mintában jelenlevő antigén és/vagy antitest mennyiségét vagy koncentrációját meghatározzuk, olyan módon, hogy legfeljebb 1,6 mikrométer, előnyösen 0,1–1,0 mikrométer, különösen előnyösen 0,2–0,8 mikrométer átlagos átmérőjű oldhatatlan hordozórészecskéket alkalmazunk, valamely antitestet vagy antigént a hordozóanyaghoz rögzítünk, és ilyen módon a hordozóanyagot az antitesttel vagy az antigénnel érzékenyítjük, az érzékenyített hordozóanyagot a mintában jelenlevő antigénnel és/vagy antitesttel reagáltatjuk, és megmérjük a reakcióelegy extinkcióját 0,6–2,4 mikrométer közötti, előnyösen 0,6–1,8 mikrométer közötti, különösen előnyösen 0,8–1,4 mikrométer közötti, célszerűen pedig 1–1,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fény alkalmazásával. Amint arra fentebb már utaltunk, olyan fény alkalmazása célszerű, amelynek hullámhossza legalább 1,5-szerese, előnyösen 2-szerese, különösen előnyösen pedig 2,5-szerese az oldhatatlan hordozórészecskék átlagos átmérőjének.

A találmány szerint oldhatatlan hordozórészecskéként célszerűen olyan szerves polimerek mikrorészecskéit alkalmazzuk, amelyek gyakorlatilag oldhatatlanok a találmány szerinti meghatározáshoz alkalmazott cseppfolyós közegben, és az átlagos

részecskeátmérőjük a fent megadott tartományon belül helyezkedik el. Így alkalmazhatunk emulziós polimerizációval előállított szerves polimer-latexeket, például polisztirolt és stírol-butadién kopolimereket. Ugyancsak a találmány szerint használhatunk diszpergált coccus-baktériumokat, például Staphylococcusokat és Streptococcusokat, Bacillus prodigiosust, Rickettsia-t, sejtmembrántörmeléket, stb., továbbá szerves oxidokat, például szilícium-dioxidot és/vagy alumíniumoxidot, valamint ásványi anyagokat, fémeket, stb. mikrorészecskék formájában.

A találmány szerint a hordozóanyag érzékenyítése céljából olyan antitestet vagy antigént rögzítünk az oldhatatlan hordozórészecskéken, például latex-részecskéken, amely reakcióba lép a mintában jelenlevő, meghatározandó antigénnel és/vagy antitesttel. Ehhez az antitestet vagy az antigént fizikai és/vagy kémiai adszorpcióval rögzíthetjük a hordozóhoz. Antitestek esetében fehérjékről van szó, míg az antigének különféle anyagokból, például fehérjékből, polipeptidekből, szteroidokból, poliszacharidokból, lipidokból, virágporból, stb. álló csoportokhoz tartoznak. Korábban már egy sor eljárást ismertettek az antitestek vagy antigének, különösen azonban az antitestek oldhatatlan hordozórészecskékhez történő rögzítésére. Valamely hiányos antigén, például egy haptén oldhatatlan hordozóhoz való rögzítése érdekében előnyös a hordozó anyagok kémiai úton történő módosítása, majd pedig az antigénnek a módosított hordozó anyaghoz való kémiai kötése.

Ellentétben az ismert eljárásokkal, amelyeknél a zavarosságot határozzák meg vagy pedig a közepes diffúziós állandót mérik lézersugár segítségével, a találmány szerinti eljárásnál olyan feltételeket biztosítunk, amelyeknél az antitesttel vagy antigénnel érzékenyített, oldhatatlan hordozórészecskék aktívan reakcióba lépnek a megfelelő antigénnel és/vagy antitesttel.

A találmány szerint az antitesttel vagy antigénnel érzékenyített, oldhatatlan hordozórészecskéket (amelyeket a következőkben „érzékenyített hordozórészecskék” elnevezéssel említünk) szuszpenzió alakjában alkalmazhatjuk, amelynek koncentrációja legalább 0,05 súly%, előnyösen 0,1–1 súly%, különösen előnyösen pedig 0,2–0,6 súly%. Abban az esetben, ha az érzékenyített hordozórészecskék koncentrációja túlságosan nagy, mint ez a 2. ábrán is látható, a szuszpenzió fényáteresztő képessége olyan mértékben lecsökken, hogy megnehezül a találmány szerinti extinkciómérés. Abban a koncentrációtartományban, amelyben lehetséges az extinkció mérése, előnyös, ha az érzékenyített hordozórészecskék nagyobb koncentrációban vannak jelen a szuszpenzióban, mivel ilyen módon növelhető az antigének és az antitestek kvantitatív meghatározásának az érzékenysége.

A találmány szerint és az ismert eljárásokkal ellentétben az érzékenyített hordozórészecskéket a stacionáriustól eltérő körülmények között, azaz nem állás közben visszük reakcióba az antigént és/vagy antitestet tartalmazó mintával. Előnyösen a reakciót a reakcióelegy mozgatása közben hajtjuk végre. Tekintettel arra, hogy a reakciót általában

keskeny küvettában végezzük, a reakcióelegy mozgását célszerűen például olyan módon biztosítjuk, hogy egy botot függőlegesen vagy keresztirányban a küvettában mozgattunk.

Természetesen úgy is eljárhatunk, hogy az érzékenyített hordozórészecskéket és a meghatározandó mintát a küvettán kívül reagáltatjuk meghatározott ideig, pontosan meghatározott körülmények között, majd pedig a reakcióelegyet az extinkció mérése céljából a küvettába töltjük. Annak érdekében azonban, hogy valamennyi mérésnél a reakciókörülmények reprodukálhatók legyenek, és az elsősorban a reakcióidő szempontjából lényeges, az érzékenyített hordozórészecskéket speciális körülmények között közvetlenül egy olyan küvettában reagáltathatjuk, amelyet spektrofotométerben helyezünk el. Ilyen módon pontosabb meghatározásra nyílik mód, mivel az extinkciót közvetlenül egy előzetesen meghatározott reakcióidő letelte után meghatározhatjuk, vagy pedig azt az időt mérhetjük, amely ahhoz szükséges, hogy az extinkció egy előzetesen megállapított értéket érjen el, miközben a reakciót pontosan definiált körülmények között hajtjuk végre.

A találmány szerint tehát nemcsak a mintában jelenlevő antigén és/vagy antitest koncentrációja határozható meg – ez eddig csak vizuálisan, fél-quantitatív módon volt lehetséges –, hanem nyomokban jelenlevő antigén és/vagy antitest is meghatározható – ez eddig csak a radioimmun-vizsgálat segítségével volt megoldható –, olyan pontossággal, amely megfelel a radioimmun-vizsgálatnál elérhető értéknek.

Az ismeretlen mennyiségű antigént és/vagy antitestet tartalmazó minta antigén- és/vagy antitest-tartalmának találmány szerinti meghatározásához híg kalibrációs mintasorozatot készítünk olyan standard minta alkalmazásával, amely meghatározott mennyiségű megfelelő antigént és/vagy antitestet tartalmaz. A standard minta különböző mértékű hígításával állítjuk elő a kalibrációs oldatokat. Ezután minden egyes hígított kalibrációs mintát vagy hígítatlan standard mintát előre meghatározott körülmények között oldhatatlan hordozórészecskékkal reagáltatunk, amelyet meghatározott mennyiségű megfelelő antitesttel vagy antigénnel érzékenyítettünk. Minden egyes reakcióelegynek megmérjük az extinkcióját, és kalibrációs görbét állítunk fel a standard antigénből és/vagy antitestből, valamint az érzékenyített hordozórészecskékből álló kombinációra vonatkozólag. A kalibrációs görbe összefüggést ad az antigén vagy az antitest mennyisége (koncentrációja) és az extinkció között (a kalibrációs görbéknek ezt a típusát a következőkben az egyszerűség kedvéért „A” kalibrációs görbe elnevezéssel jelöljük). Ezután egy meghatározni kívánt ismeretlen mintát reagáltatunk ugyanolyan érzékenyített hordozórészecskékkal, amilyeneket a kalibrációs görbe felvételéhez használtunk, lényegében az ott alkalmazott körülményekkel megegyező körülmények között, és mérjük a reakcióelegy extinkcióját. Az ismeretlen mintában jelenlevő, meghatározni kívánt antitest és/vagy antigén mennyiségét (vagy koncentrációját) úgy kapjuk meg, hogy az

ilyen módon mért extinkció-értéket összehasonlítjuk az „A” kalibrációs görbével.

Úgy is eljárhatunk a kalibrációs görbe fenti módon történő felvételekor, hogy olyan kalibrációs görbét veszünk fel, amely az alkalmazott kalibrációs mintákban jelenlevő antigén vagy antitest mennyisége (vagy koncentrációja) és egy előre meghatározott extinkció-érték eléréséhez szükséges reakcióidő közötti összefüggést ábrázolja (a kalibrációs görbéknek ezt a típusát az egyszerűség kedvéért a következőkben „B” kalibrációs görbének nevezzük. Ebben az esetben is a mintában jelenlevő antigén és/vagy antitest meghatározását úgy végezhetjük, hogy az ismeretlen mintát ugyanolyan érzékenyített hordozórészecskékkal reagáltatjuk és lényegében azonos körülmények között, mint a kalibrációs görbe felvételénél alkalmazottak, és mérjük az előre megállapított extinkció-érték eléréséhez szükséges időt.

A találmány szerint tehát az ismeretlen mintában jelenlevő antigén és/vagy antitest mennyiségét vagy koncentrációját úgy határozhatjuk meg, hogy

A) mérjük az ismeretlen mintával készített reakcióelegy extinkcióját (és a kalibrációhoz az „A” kalibrációs görbét alkalmazzuk), vagy

B) meghatározzuk a reakciósebességet vagy egy előre megállapított extinkció-érték eléréséhez szükséges reakcióidőt (és a kalibrációhoz a „B” kalibrációs görbét használjuk).

Amint arra már utaltunk, a fenti A) módszer, mint igen nagy pontosságú meghatározás, nemcsak abban az esetben használható, ha az antitest és/vagy antigén koncentrációja viszonylag nagy az ismeretlen mintában, hanem akkor is, ha az olyan csekély, hogy az ismert eljárások közül csupán a radioimmun-vizsgálat segítségével volna meghatározható. Másrészt, a fenti B) módszer alkalmas arra, hogy alkalmazásával az ismeretlen mintában viszonylag nagy mennyiségben (vagy koncentrációban) jelenlevő antigént és/vagy antitestet határozzuk meg. Különleges előnyt jelent az, hogy a mérés meglehetősen egyszerű.

Amint arra már korábban utaltunk, az „A” kalibrációs görbe egyenes vonal helyett kissé S-alakú, ez azonban nem befolyásolja hátrányosan a meghatározás pontosságát. A kalibrációs görbe S-alakjának az oka valószínűleg az, hogy – amint ezt említettük – kisebb antigén- és/vagy antitest-koncentrációknál a reakciósebesség befolyásolja a görbe alakját, ugyanakkor nagyobb koncentrációknál a hordozó anyag aktív helyeinek telítődése következik be. Természetesen lehetőség van arra, hogy megnöveljük az S-alakú görbe lineáris szakaszát, a kalibrációs görbe felvételénél, alkalmazott körülmények gondos megválasztásával, és az ismeretlen minták meghatározása során gyakorlatilag ebben a tartományban dolgozunk.

Amint fentebb már kifejtettük, a találmány szerint úgy járunk el, hogy lehetőleg nagy koncentrációban alkalmazott érzékenyített hordozórészecskéket a mintával érintkezésbe hozzuk, és azzal reagáltatjuk. Ezért olyan szélességű küvettát alkalmazunk a reakcióelegy extinkciójának meghatáro-

zásához, amely keskenyebb a látható tartományban végzett színeképelemzéshez használatos küvettáknál. Így célszerűen 0,5–4 mm szélességű, előnyösen 1–2,5 mm szélességű küvettákat alkalmazunk.

Abban az esetben, ha valamely antigén vagy antitest nyomnyi mennyiségét kívánjuk meghatározni a lehető legnagyobb pontossággal – ami eddig csupán a radioimmun-vizsgálat alkalmazásával volt elérhető –, különösen előnyös az alábbi feltételek betartása:

a) lehetőleg nagy egyensúlyi állandójú antigént vagy antitestet alkalmazunk,

b) 0,3–0,6 mikrométer átlagos átmérőjű latex-részecskéket használunk, amelyek részecskeméret-eloszlása lehetőleg egy szűk tartományba esik,

c) az extinkciót 1,2–1,4 mikrométer hullámhosszúságú fény segítségével határozzuk meg,

d) viszonylag hosszú, például 1–3 óra közötti reakcióidőt alkalmazunk,

e) az érzékenyített latex-részecskék koncentrációját megnöveljük, feltéve, hogy az extinkció mérhető marad.

Ha viszont a reakciósebesség mérésével (a „B” kalibrációs görbét alkalmazva) viszonylag rövid idő alatt kívánunk egy ismeretlen mintát meghatározni, előnyös, ha

f) viszonylag nagy átlagos átmérőjű latex-részecskéket alkalmazunk,

g) a hordozórészecskék koncentrációját a latexben megnöveljük, feltéve, hogy az extinkció mérése elvégezhető, és

h) lehetőleg rövid reakcióidőt alkalmazunk, például 5 másodperc és 10 perc közötti időt, előnyösen pedig 10 másodperc és 3 perc közötti reakcióidőt.

Ha ebben az esetben az előre megállapított extinkció-érték eléréséhez szükséges időt az ordinátán, a koncentrációt pedig az abszcisszán ábrázoljuk, mégpedig logaritmusos léptékben, akkor a „B” kalibrációs görbét egyenes vonal alakjában kapjuk.

A találmányt a fentiek során a mintában jelenlevő valamely antigén és/vagy antitest meghatározásával kapcsolatban fejtettük ki, amely meghatározás azon alapul, hogy a minta antigénjét és/vagy antitestét érzékenyített hordozórészecskékkel agglutináljuk (azaz LA-rendszert alkalmazunk).

A találmány szerinti eljárás olyan minta meghatározására is alkalmas, amelynél a fentebb említett agglutinációval szembeni gátló hatás képezi a mérés alapját (azaz LI-rendszert alkalmazunk).

A hiányos antigéneket, például a hapténeket olyan módon határozhatjuk meg, hogy a találmány szerinti eljárást az LI-rendszerre alkalmazzuk. Ebben az esetben például az antigént a találmány szerint alkalmazott hordozórészecskékhez rögzítjük, és az így érzékenyített hordozórészecskéket kompetitív reakcióba visszük egy olyan antitest adott mennyiségével, amelyet előzetesen meghatározott koncentrációjú antigénnel (például egy standard antigén-oldattal) reagáltattunk, majd pedig mérjük a kapott reakcióelegy extinkcióját. A fenti eljárást a standard antigén-oldat különböző koncentrációival megismételjük, és így megkapjuk a „C” kalibrációs

görbét. Végül egy ismeretlen mintát is reakcióba viszunk meghatározott koncentrációjú ugyanilyen antitesttel, majd pedig a kapott reakcióelegyet az érzékenyített hordozó anyaggal reagáltatjuk. Ezeket a reakciókat gyakorlatilag ugyanolyan körülmények között kell végrehajtanunk, mint amilyen feltételeket a „C” kalibrációs görbe felállítása során alkalmaztunk. Ezután meghatározzuk az érzékenyített hordozórészecskékkel kapott reakcióelegy extinkcióját, és a „C” kalibrációs görbéről leolvassuk az ismeretlen mintában jelenlevő antitest mennyiségét (vagy koncentrációját).

A fentebb említett LI-rendszer alkalmazásával az ismeretlen mintában jelenlevő antitestet úgy is meghatározhatjuk, hogy egy bizonyos antitestet rögzítünk az oldhatatlan hordozórészecskékhez. Kívánt esetben úgy is eljárástunk, hogy eltérő típusú antigént és antitestet rögzítünk egyidejűleg az oldhatatlan hordozórészecskékhez, majd pedig meghatározzuk az ismeretlen mintában jelenlevő antigént és antitestet.

Így a találmány szerinti eljárás alkalmazásával igen nagyszámú antigén és/vagy antitest kvantitatív meghatározását végezhetjük el. Ilyen anyagok például a következők:

1. Betegek vagy véradók vérvizsgálatakor meghatározhatjuk például a vércsoport-anyagokat, az Au- vagy HB-antigént vagy a vér más szennyező anyagain, vagy a fibrin/fibrinogén bomlástermékeket. Ez az utóbbi időben hasznosnak bizonyult olyan betegek gyógyulásának ellenőrzése során, akiknél veséátültetést hajtottak végre, vagy veséjük felmondta a szolgálatot.

2. A humán chorion-gonadotropin (hCG), amelynek meghatározása fontos szerepet játszik a terhesség megállapításánál vagy a chorionepitelioma gyógyulásának megállapításánál.

3. A humán chorion-gonadotropin vagy az ösztriol-glukuronid, amely a tüszőhormon anyagcsere-terméke, s a vizeletben történő meghatározásuk a terhesség fenntartása szempontjából jelentős.

4. A vérben levő oxitocin, amely a jelenlegi feltevések szerint méhösszehúzódasokat okoz.

5. Mellékvesekéreg-hormonok, így a kortikoidok és az aldosteron vagy az adrenokortikotrop hormonok (ACTH).

6. Inszulin, amelynek a meghatározása diabetes-nél jelentős, vagy a tüszőhormont serkentő hormonok, ösztrogének, sárgatest, hormon, stb.

7. Gasztrin vagy szekretin, amelyek gyomor-bél hormonok.

8. Allergiában, szifiliszben, hemolitikus sztreptokokcidiózisban, rubeolában, autoimmun-betegségekben, például kollagenózisban és más fertőzőes betegségekben szenvedő betegek testfolyadékaiban jelenlevő antitestek.

A találmány szerinti eljárás természetesen ezeknek az antigéneknek és/vagy antitesteknek a kvalitatív vagy félkvantitatív meghatározására is felhasználható.

A találmány szerinti eljárás kivitelezéséhez például a 4. ábrán látható berendezést alkalmazhatjuk, amely tulajdonképpen egy 1 fényforrásból és 2

monokromátorból álló megvilágító egységet és az antigén-antitest reakció méréséhez használt mintát befogadó 3 mintaküvetét tartalmaz.

Az 1 fényforrás például egy szokásosan alkalmazott volframlámpa lehet, amelynek a fényét a 2 monokromátor, így fényszűrő vagy prizma segítségével monokromatikusá tesszük és ilyen módon 0,6–2,4 mikrométer, előnyösen 0,8–1,4 mikrométer, különösen előnyösen 1,0–1,4 mikrométer közötti tartományban elhelyezkedő, meghatározott hullámhosszúságú fényt állítunk elő, és azt átvezetjük a 3 mintaküvetén, valamint a 4 összehasonlító küvetén. A monokromátor minden olyan megoldás lehet, amely alkalmas arra, hogy a fenti hullámhossz-tartományba eső, monokromatikus fényt adjon. Használhatunk például interferencia-szűrőt, amely 1200 ± 50 nm hullámhosszúságú fényt szolgáltat, vagy kvarc- illetve üvegprizmát is alkalmazhatunk.

Az ilyen módon monokromatikusá tett fénysugarat rés vagy lencse segítségével fókuszáljuk a 3 és 4 küvetén történő átvezetés előtt. A 3 mintaküvetta és a 4 összehasonlító küvetta átlátszó üvegből vagy átlátszó szintetikus gyantából, például akrilgyantából készülhet, és dobozszerű felépítésű lehet, négyzet- vagy téglalap alakú keresztmetszettel (amint az 5. ábrán látható). A küvetta szélessége, azaz az a és b falak (amelyeken a fénysugár áthalad) közötti távolság, illetve a fény felé eső és az azzal szemközti fal közötti távolság általában 0,5–4 mm, előnyösen pedig 1–2,5 mm. A fényáteresztő falak fénytárcsátásának mértéke előnyösen legalább 30%, célszerűen pedig 80% feletti a 0,6–2,4 mikrométer közötti hullámhosszúságú fénysugár esetén.

A 3 mintaküvetába töltjük a reakcióelegyet, amelyet úgy kapunk, hogy valamely antigént és/vagy antitestet vagy elegyüket az oldhatatlan hordozórészecskékhez rögzített megfelelő antitesttel vagy antigénnel, célszerűen antifibrinogénnel, anti(humán chorion-gonadotropin)-nal, humán chorion-gonadotropinnal, oxitocinnal, anti(humán immunoglobulin E)-vel, anti(humán immunoglobulin G)-vel, anti(humán immunoglobulin M)-mel, anti(sértés inzulin)-nal, anti(humán chorion-gonadotropin)-beta-al-egységgel, humán gamma-globulinnal vagy anti(humán alfa-fetoprotein)-nel, cseppfolyós közegben a fentebb leírt találmány szerinti eljárással reagáltatunk. A 4 összehasonlító küvetében olyan összehasonlító mintát öntünk, amely csupán az oldhatatlan hordozórészecskék rögzített antitestnek vagy antigénnek a cseppfolyós közeggel készített diszperziója.

A 3 illetve 4 küvetén áthaladó fénysugár az 5 illetve 6 fotocellához jut, ahol elektromos jellel alakul. A képződött elektromos jelek erőssége arányos a megfelelő fotocella által felfogott fényintenzitásával. Bármilyen 5 és 6 fotocellát alkalmazhatunk, azzal a feltétellel, hogy alkalmas a felfogott fény olyan elektromos jellel alakítására, amelynek az erőssége arányos a fényintenzitással. Például előnyösen használhatunk ólomszulfidelemeket. Az ilyen módon az 5 és 6 fotocellák által képezett elektromos jeleket a 7 erősítő segítségével önmagában ismert módon felerősítjük, és a 8 jelző-

egységről leolvassuk vagy íróberendezés alkalmazása esetén regisztráljuk.

Ha a 8 jelző- vagy íróegységet órászerkezettel építjük össze, akkor lehetőség nyílik arra, hogy az extinkciót egy előre meghatározott idő elteltével mérjük, vagy pedig azt az időt határozzuk meg, amely ahhoz szükséges, hogy az extinkció egy előre meghatározott értéket érjen el.

A találmány szerinti eljárásához alkalmazott berendezés előnyös kiviteli alakjánál a 3 mintaküvetta keverő- illetve mozgatóberendezéssel van ellátva, például egy, a küvetában elhelyezkedő, mozgatható keverőbottal.

A 6. ábra szemlélteti a találmány szerinti berendezés 3 mintaküvetájában elhelyezett, a mintából és az érzékenyített hordozórészecskékből (például érzékenyített latexből) álló 9 elegy mozgását biztosító keverőmechanizmus előnyös kiviteli alakját.

Amint a 6. ábrán látható, a 3 küvetában levő 9 elegy mozgásához az L-alakú 11 keverőbotot felfelé és lefelé mozgathatjuk, miközben a T-alakú 14 összekötőrudat felfelé és lefelé elmozdítjuk, ahol a 14 összekötőrud a felső sima 14' lapja felett a 12 forgatható tárcsával van kapcsolatban. A 12 forgatható tárcsát a 13 excentertengely hajtja meg. A 14 összekötőrud a 15 csőben halad át a 17 fényátnyelő fedelén. A 15 cső a 17 fedélhez van egyébként erősítve. A 14 összekötőrud a 12 excentertárcsa forgása hatására lefelé nyomódik, majd pedig a 17 fedél és a 14' felső sima lap között a 14 összekötőrud körül elhelyezkedő 16 rugó feszítőereje hatására ismét felfelé mozdul el.

Abban az esetben, ha a 4. ábrán felvázolt berendezés 3 mintaküvetája például a 6. ábrán bemutatott kialakítású, a 3 mintaküvetát a napfénytől leárnyékolva kezelhetjük, és a meghatározandó mintából, valamint az érzékenyített hordozórészecskékből (érzékenyített latexből) álló 9 elegyet olyan módon keverhetjük az L-alakú 11 keverőbot segítségével, hogy közben a küvetákat a közeli infravörös tartományba eső kiválasztott hullámhosszúságú fénysugár megszakítása nélkül keverhetjük. Ezáltal meggyorsíthatjuk a minta és az érzékenyített hordozórészecskék közötti antigén-antitest reakciót, és arra is lehetőség van, hogy a reakciót közvetlenül egy előre megállapított reakcióidő eltelte után megszakítsuk, és pontosan meghatározzuk azt a reakcióidőt, amely után az extinkció egy előre meghatározott értéket ér el.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példák segítségével részletesen ismertetjük.

1. példa

(1) Antifibrinogén-antitesttel érzékenyített latex-reagens készítése

Glicinpufferrel készített, 2 mg/ml koncentrációjú 10 ml anti-humánfibrinogén-antitest-oldathoz (pH = 9,6) 1 ml polisztirol-latexet adunk, amelynek az átlagos részecskeátmérője 0,481 mikrométer (a szilárdanyag-tartalma 10 súly%, és a Dow Chemical Co. cégtől szerezhető be). Az elegyet 30 percig

keverjük szobahőmérsékleten, majd 40 °C-ra melegítjük, és további 30 percig keverjük ezen a hőmérsékleten, végül pedig 2–4 °C-ra hűtés közben centrifugáljuk 50 percig 12000/perc fordulatszámmal. A csapadékot dekantálással elválasztjuk, és az antifibrinogén-antitesttel érzékenyített latex-részecskéket 0,2 súly% koncentrációjú marhaszérum-albumin-oldatban szuszpendáljuk. Ilyen módon antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagenst kapunk, amely 1 súly% koncentrációban tartalmazza az érzékenyített latex-részecskéket.

(2) Kalibrációs görbe felvétele

7 mm belső átmérőjű és 70 mm hosszúságú műanyag kémcsőbe 0,1 ml antifibrinogén-latex-reagenst (amelyet az (1) pontban leírtak szerint készítünk) és 0,3 ml standard fibrinogén-oldatot (amely fiziológias nátriumklorid-oldattal készült és 0,2 súly% marhaszérum-albumint tartalmaz) rétegezzük, amely az I. táblázatban megadott koncentrációban tartalmazza a fibrinogént. Az elegyet 20 percig rázatjuk rázógépen, percenként 200 rázatás alkalmazásával, hogy az antigén-antitest reakció végbemenjen. Közvetlenül ezután a kémcsőben jelenlevő reakcióelegyet 2 mm szélességű fényabszorpciós üvegtábla töltjük át, és 1,2 mikrométer hullámhosszúságú fény alkalmazásával meghatározzuk az extinkcióját automatikus spektrofotográf segítségével (Hitachi Ltd., Modell EPS-3). Összehasonlító oldatként egy olyan szuszpenziót alkalmazunk, amelyet 0,1 ml antifibrinogén-latex-reagens 0,3 ml fiziológias nátriumklorid-oldattal történő hígításával kapunk, és amely 0,2 súly% marhaszérum-albumint tartalmaz. A mérést az I. táblázatban megadott minden egyes standard fibrinogén-oldattal kétszer végezzük el. A kapott eredményeket az I. táblázat tartalmazza.

I. Táblázat

A standard fibrinogén-oldat koncentrációja mikrogramm/ml	Extinkció 1,2 mikrométeren		
	1. mérés	2. mérés	középérték
0,1	0,336	0,363	0,350
0,2	0,836	0,778	0,807
0,3	1,083	1,167	1,125
0,4	1,330	1,333	1,332
0,5	1,403	1,430	1,417

Ha az I. táblázatban feltüntetett értékeket grafikusán ábrázoljuk, mégpedig a standard fibrinogén-oldat koncentrációját az abszcisszán, az 1,2 mikrométer hullámhosszúságú fénnel kapott extinkciót (középérték) pedig az ordinátán, akkor a 7. ábrán látható kalibrációs görbéhez jutunk.

(3) Fibrinogén kvantitatív meghatározása ismeretlen mintákban

Vérmintát, vizeletmintát vagy a mellkasban (mellhártyatérben) levő folyadékból mintát veszünk a betegtől, és vérminta esetén a szérumot vagy plazmát elválasztjuk. A minta vagy a hígított minta 0,3 ml alikvot részéhez 0,1 ml antifibrinogén-latex-reagenst adunk (amelyet az (1) pontban leírtak szerint készítünk el), majd pedig a (2) pontban megadott eljárás alkalmazásával meghatározzuk az extinkciót. A (2) pontban ismertetett módszer segítségével felállított kalibrációs görbéről leolvassuk a mért extinkció-értéknek megfelelő fibrinogén-koncentrációt. Az ilyen módon kapott eredményeket a II. táblázat tartalmazza.

Összehasonlítási célokra a II. táblázatban azokat az értékeket is feltüntettük, amelyeket az ismert radioimmun-vizsgálati módszer [S.M. Ratkey és munkatársai, Brit. J. Haematol., 30, 145–149 (1975)], valamint az ismert tárgylemezes módszer [Fujimaki, Tamura és Takahashi, Rinsho Kagaku (Clinical Science), 12, 507 (1976) és Fujimaki, Ike-matsu, Takeuchi és Kato, Rinsho Byori (Japanese Journal of Clinical Pathology), 21, 973 (1973)] szolgáltatott.

A II. táblázatban megadott eredményekből látható, hogy a találmány szerinti eljárás segítségével kapott fibrinogén-koncentrációértékek gyakorlatilag jól egyeznek az ismert meghatározási módszerek közül a legpontosabbnak tekintett radioimmun vizsgálati módszerrel kapott eredményekkel. A korrelációs együttható a találmány szerinti eljárás és a radioimmun-vizsgálati módszer között 0,999.

2. példa

Az 1. példa (1) pontjában leírt módon 1 súly% latex-részecskéket tartalmazó antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagenst készítünk, azzal az eltéréssel, hogy 0,234 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latexet használunk (amely a Dow Chemical Co. cégtől szerezhető be, és a szilárdanyag-tartalma 10 súly%).

A kapott, antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagensből 0,1 ml alikvot részt 0,3 ml standard fibrinogén-oldattal elegyítünk (amely literenként 0,5 mikrogramm fibrinogént tartalmaz), és az elegyet 5 percig rázatjuk szobahőmérsékleten rázógépen, 250 rázás/perc sebességgel, hogy végbemenjen az antigén-antitest reakció. Végül meghatározzuk a reakcióelegy extinkcióját 1,2 mikrométer hullámhosszúságú fény alkalmazásával, az 1. példa (2) pontjában megadott módon. A mérés reprodukálhatósága vizsgálatára még háromszor megismételjük a vizsgálatot. A kapott eredményeket a III. táblázat tartalmazza.

A fenti meghatározásokat újból megismételjük, azzal az eltéréssel, hogy a standard fibrinogén-oldatok helyett betegektől vett vérmintákból elkülönített szérumokat használunk. Ugyanezt a meghatározási módszert négyszer alkalmazzuk, különböző napokon, hogy megállapíthassuk a testfolyadék mérésének reprodukálhatóságát. A kapott eredményeket szintén feltüntetjük a III. táblázatban.

II. Táblázat

Beteg száma	Ismeretlen minta anyag	hígítási faktor	Mért extinkció-érték	Fibrinogén-koncentráció az ismeretlen mintában (mikrogramm/ml)		
				találmány szerinti módszer	radio-immun módszer	tárgy-lemezes, módszer
1.	Vizelet	X 2	0,764	0,402	0,359	0,5
2.	Vizelet	X 16	1,162	5,178	5,117	8,0
3.	Vizelet	X 1	1,233	0,347	0,368	0,5
4.	Vizelet	X 1	0,090	0,021	0,024	< 0,5
5.	Vizelet	X 1	0,011	0,003	0,006	< 0,5
6.	Vizelet	X 1	0,175	0,042	0,037	< 0,5
7.	Vizelet	X 1	0,066	0,016	0,011	< 0,5
8.	Vizelet	X 1	0,171	0,041	0,008	< 0,5
9.	Vizelet	X 1	0,020	0,005	0,007	< 0,5
10.	Vizelet	X 1	0,199	0,048	0,072	< 0,5
11.	Szérum	X 10	0,310	0,760	0,800	1,0
12.	Szérum	X 10	0,330	0,812	0,863	0,9
13.	Szérum	X 10	0,520	1,317	1,335	1,25
14.	Szérum	X 10	0,348	0,858	0,892	1,0
15.	Fibrogén-mentes plazma	X 10	0,550	1,400	1,520	2,0
16.	Rákös mell-hártyatéri folyadék	X 640	1,210	217,12	197,4	320

III. Táblázat

Mérés száma	Extinkció	
	standard fibrinogén-oldat	szérum
1.	0,582	0,294
2.	0,565	0,280
3.	0,562	0,306
4.	0,545	0,287
Átlagérték	0,564 ± 0,010	0,292 ± 0,010
szórási együttható	1,8%	3,4%

Amint a III. táblázatban megadott értékekből kitűnik, a találmány szerinti eljárás reprodukálhatósága, mind a standard fibrinogén-minták meghatározásánál, mind pedig tényleges testfolyadék-minták (szérum) meghatározásánál kiváló.

55
3. példa

5 ml glicinpuffer-oldathoz 100 mg szilíciumdioxidot adunk mikrorészecskék alakjában (amelyeket a 120497/75 számú közrebocsátott japán szabadalmi bejelentés 1. példájában leírt módon állítjuk elő, a részecskék átlagos átmérője 0,32 mikrométer, jól-lehet 15%-uk 0,5 mikrométer vagy még nagyobb átmérőjű). Az elegyet 1 órán át kezeljük 28 kHz frekvenciájú ultrahanggal a szilíciumdioxid mikro-

részecskék szuszpendálása céljából. Ezután az 1. példa (1) pontjában leírt módon reagenst készítünk, amely antifibrinogén-antitestekkel érzékenyített szilíciumdioxid szuszpenziójából áll. Az 1. példa (1) pontja szerint alkalmazott 0,481 mikrométer részecskeméretű polisztirol-latex helyett az ilyen módon előállított szilícium-dioxid-suszpenziót használjuk, és másféle koncentrációjú (0,05 súly%) marhaszérum-albumin-oldatot alkalmazunk. Ezután meghatározzuk az antifibrinogén-nel érzékenyített szilícium-dioxid reagens alkalmazásával a standard fibrinogén-oldatok extinkcióját az 1. példa (2) pontjában ismertetett módon. A kapott eredményeket a IV. táblázatban mutatjuk be.

5

10

15

IV. Táblázat

Standard fibrinogén-oldat koncentrációja, (mikrogramm/ml)	Extinkció 1,2 mikrométernél
0,2	0,028
0,4	0,126
0,6	0,287
0,8	0,460
1,0	0,631

V. Táblázat

Beteg száma	Ismeretlen minta anyag	hígítási faktor	Mért extink- ció-érték	Fibrinogén-koncentráció ismeretlen mintában (mikrogramm/ml)	
				találmány szerinti módszer	radioimmun módszer
1.	Vizelet	X 1	0,125	0,400	0,359
2.	Vizelet	X 10	0,210	5,000	5,117
3.	Vizelet	X 1	0,110	0,380	0,368
4.	Szérum	X 1	0,440	0,770	0,800
5.	Szérum	X 1	0,490	0,830	0,892
6.	Rákos mellhártyatéri folyadék	X 400	0,211	200	197,4

Az 1. példa (2) pontjában leírtak szerint eljárva, a IV. táblázatban szereplő értékek grafikus ábrázolásával kalibrációs görbét állítunk fel, amely a 8. ábrán látható. A 8. ábráról leolvasható, hogy a fibrinogén-koncentráció és az extinkció között lineáris összefüggés áll fenn, ha a standard fibrinogén-oldat koncentrációja 0,4 mikrogramm/ml vagy ennél nagyobb.

45

50

Ezután elvégezzük betegektől nyert ismeretlen minták (vizelet, szérum és mellhártyatéri folyadék) vizsgálatát az 1. példa (3) pontja szerinti módszer alkalmazásával az ismeretlen minták fibrinogén-tartalmának meghatározása céljából. A kapott eredményeket az V. táblázatban foglaljuk össze.

55

4. példa

Az 1. példa (1) és (2) pontjában leírtak szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy a 0,481 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latex helyett 0,804 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latexet (gyártó Dow Chemical Co., szilárdanyag-tartalma 0,1 súly%) és 0,1 súly% marha-

65

szérum-albumin koncentrációt használunk, továbbá az extinkció mérését 1,2 és 1,7 mikrométer hullámhosszú fénnel végezzük. A kapott eredményeket a VI. táblázat tartalmazza.

VI. Táblázat

Standard fibrinogén- oldat koncent- rációja, mikrogramm/ml	Extinkció	
	1,2 mikro- méternél	1,7 mikro- méternél
0,2	0,127	0,083
0,4	0,258	0,198
0,6	0,418	0,452
0,8	0,388	0,592
1,0	0,258	0,622

A VI. táblázatban megadott számértékekből kitűnik, hogy nyilvánvaló összefüggés áll fenn a fibrinogén-koncentráció és az extinkció között, abban az esetben, ha az alkalmazott fény hullámhossza legalább kétszerese a szilárd hordozórészecskének (polisztirol-latex-részecskék) átlagos átmérőjének.

5. példa

Az 1. példa (1) pontja szerint eljárva állítunk elő anti-(humán chorion-gonadotropin)-nal érzékenyített latex-reagenst, azzal az eltéréssel, hogy az anti-(humán fibrinogén)-antitest helyett anti-(humán chorion-gonadotropin)-antitestet (anti-hCG) alkalmazunk, és a 0,481 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol-latex helyett 0,234 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol-latexet (gyártó Dow Chemical Co.) használunk.

Az ilyen módon kapott, anti-(humán chorion-gonadotropin)-nal érzékenyített latex-reagens segítségével meghatározzuk az extinkciót az 1. példa (2) pontjában ismertetett módon, 1,2 mikrométer hullámhosszú fény alkalmazásával, csak a standard fibrinogén-oldat helyett standard humán chorion-gonadotropin-oldatot alkalmazunk. A kapott eredményeket a VII. táblázatban mutatjuk be.

VII. Táblázat

A standard humán chorion-gonadotropin-oldat koncentrációja NE/ml	Extinkció 1,2 mikrométernél
0,1	0,048
0,2	0,130
0,3	0,168
0,4	0,261
0,5	0,360
0,7	0,630
1,0	0,972

A kapott számértékek felhasználásával kalibrációs görbét állítunk fel a fentebb ismertetett módon. Másrészt, különböző betegektől vizeletmintákat veszünk, amelyeket a vizeletben jelenlevő humán chorion-gonadotropin meghatározásához használunk fel, az 1. példa (3) bekezdésében megadott módon eljárva. A kapott eredményeket a VIII. táblázatban foglaljuk össze.

VIII. Táblázat

Beteg száma	Ismeretlen minta típusa	Ismeretlen minta hígítása	Mért extinkció	Humán chorion-gonadotropin-koncentráció az ismeretlen mintában, NE/ml találmány szerinti eljárás	radioimmun-vizsgálati módszer
1.	Vizelet	X 1	0,400	0,564	0,482
2.	Vizelet	X 1	1,122	0,966	1,120
3.	Vizelet	X 1	0,955	0,944	0,857
4.	Vizelet	X 1	0,990	0,952	0,925

6. példa

L-alakú keverőbottal felszerelt, 2 mm széles, üvegből készült abszorpciós küvettába bemérünk 0,1 ml, 2. példa szerint előállított, antifibrinogénnal érzékenyített latex-reagenst, valamint 0,3 ml standard fibrinogén-oldatot, amelynek a koncentrációja a IX. táblázatban van feltüntetve, és folyamatosan figyeljük a reakcióelegy extinkcióját 1,2 mikrométer hullámhosszú fény alkalmazásával az 1. példa (2) pontjában megadott módon. Megfigyeljük azt az időt, amely ahhoz szükséges, hogy az extinkció értéke 0,5 legyen. A meghatározás során a keverőbotot percenként 200-szor függőlegesen felfelé és lefelé mozgatjuk. A különböző koncentrációjú standard fibrinogén-oldatokkal kapott eredményeket a IX. táblázat tartalmazza.

IX. Táblázat

A standard fibrinogén-oldat koncentrációja, µg/ml	0,5-ös extinkció-érték eléréséhez szükséges idő, sec
2	26,9
4	11,3
6	6,4
8	4,7
10	2,9

A IX. táblázatban összefoglalt értékeket kettős logaritmikus beosztással ellátott papíron ábrázoljuk. A standard fibrinogén-oldat koncentrációját az abszcisszára, a 0,5-es extinkció-érték eléréséhez szükséges időt pedig az ordinátára visszük fel. Az így kapott kalibrációs görbe, amint az a 9. ábrán látható, egyenes vonal.

Ezután egy L-alakú keverőbottal felszerelt, 2 mm széles, üvegből készült abszorpciós küvetába bemérünk 0,3 ml mennyiséget valamilyen, különböző betegektől nyert ismeretlen mintából (vizelet,

szérum vagy mellhártyatéri folyadék), hozzáadunk 0,1 ml mennyiséget a fentebb említett, antifibrinogénnal érzékenyített latex reagensből, és a reakcióelegyet a fentebb leírt módon keverjük, miközben 1,2 mikrométer hullámhosszú fényrel világítjuk meg. Mérjük azt az időt, amely ahhoz szükséges, hogy az extinkció értéke 0,5 legyen. A fentiek szerint felállított kalibrációs görbéről leolvassuk az ehhez az időértékhez tartozó fibrinogén-koncentrációt. A kapott eredményeket a X. táblázatban tüntetjük fel.

X. Táblázat

Beteg száma	Ismeretlen minta típusa	Ismeretlen minta hígítása	0,5-es extinkció-érték eléréséhez szükséges idő, sec	Fibrinogén-koncentráció az ismeretlen mintában mikrogramm/ml	
				találmány szerinti eljárás	radioimmun-vizsgálati módszer
1.	Vizelet	X 1	9,2	4,5	5,117
2.	Rákos mellhártyatéri folyadék	X 50	11	195	197,4
3.	Szérum	X 1	25	2,1	2,210
4.	Szérum	X 1	20	2,5	2,302
5.	Szérum	X 1	3,8	8,6	9,020
6.	Szérum	X 1	12	3,7	3,723

7. példa

(1) Oxitocinnal érzékenyített latex-reagens előállítása

200 rázatással 12 percig keverjük, majd pedig meghatározzuk az extinkcióját 1,2 mikrométer hullámhosszú fény alkalmazásával az 1. példa (2) pontjában ismertetett módon. A kapott eredményeket a XI. táblázatban mutatjuk be.

0,1 N vizes ecetsav-oldattal készült, 220 NE/ml koncentrációjú oxitocin-oldat 1 ml mennyiségét 0,5 ml polisztirol-latexszel (átlagos részecskemérete 0,481 mikrométer, szilárdanyag-tartalma 10 súly%, gyártó Dow Chemical Co.) elegyítjük. Az elegyet 2 órán át keverjük szobahőmérsékleten, majd pedig 20 percig centrifugáljuk 2–4 °C-on 12000/perc fordulatszámra. A csapadékot dekantálással leválasztjuk, és a kapott, oxitocinnal érzékenyített latex-részecskéket 0,2 súly% marhaszérum-albumint tartalmazó 4 ml etilén-diamin-tetraecetsav/glicin pufferoldatban diszpergáljuk. Oxitocinnal érzékenyített latex-reagenst kapunk, amely 1 súly% latexet tartalmaz.

(2) Az oxitocin-antiszérum optimális koncentrációjának meghatározása

A fenti (1) pont szerint készített, oxitocinnal érzékenyített latex-reagens 0,1 ml alikvot részét 0,1 ml fiziológiás nátriumklorid-oldattal és 0,2 ml oxitocin-antiszérummal elegyítjük, amelyet a XI. táblázatban megadott mértékben hígítottunk fiziológiás nátriumklorid-oldattal. Az elegyet percenként

XI. Táblázat

Az oxitocin-antiszérum hígítása	Extinkció 1,2 mikrométernél
X 20	1,175
X 30	0,618
X 40	0,393
X 50	0,327
X 80	0,220
X 100	0,162

A XI. táblázatban feltüntetett számértékekből kitűnik, hogy az oxitocin-antiszérum optimális koncentrációja körülbelül 30-szoros hígításnál van.

(3) Kalibrációs görbe felvétele

Műanyag kémcsőbe bemérünk 0,2 ml olyan oldatot, amelyet a (2) pontban alkalmazott oxitocin-antiszérum 30-szoros hígításával kaptunk. Hozzáadunk 0,1 ml standard oxitocin-oldatot, amely 0,1 N vizes ecetsavval készült, és koncentrációja a XII. táblázatban látható. Az elegyet jól összekeverjük, majd 30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Hozzáadunk 0,1 ml, oxitocinnal érzékenyített és az (1) pont szerint készített latex-reagenst, s a kapott elegyet 12 percig rázatjuk percenként 200 rázatást végző rázógépen. Az ilyen módon kapott folyadékot 2 mm szélességű üveg fényabszorpciós

XII. Táblázat

A standard oxitocin-oldat koncentrációja, $\mu\text{NE/ml}$	Extinkció 1,2 μm -nél	ΔD^*
2 000	0,395	0,183
1 500	0,450	0,128
1 000	0,483	0,095
500	0,525	0,053
300	0,550	0,028
0	0,578	—

* ΔD = a zérus koncentrációjú standard oxitocin-oldat extinkciójának és a megadott koncentrációjú standard oxitocin-oldat extinkciójának különbsége.

Ha a XII. táblázatban szereplő adatokat grafikusán ábrázoljuk, és a standard oxitocin-oldat koncentrációját az abszcisszára, a ΔD -értéket pedig az ordinátára visszük fel, lineáris összefüggéshez jutunk, mint az a 10. ábrán látható. Az ilyen módon kapott kalibrációs görbe alkalmazásával meghatározhatjuk terhes nők vérszérumában az oxi-

8. példa

(1) Humán chorion-gonadotropinnal érzékenyített latex-reagens előállítása

5 ml 0,05 N sósavban feloldunk 7900 NE/ml humán chorion-gonadotropint, és az anyagot 1 órán át hidrolizáljuk 80 °C-on. Ezután az oldatot diali-

záljuk, szívatással szűrjük, és a kapott, hidrolizált humán chorion-gonadotropint 2 ml 0,05 M 8,7 pH-értékű borát-pufferoldatban oldjuk, és 10 ml térfogatra hígítjuk. Részletekben, keverés közben hozzáadunk 5 ml 2%-os polisztirol-latex-oldatot (szilárdanyag-tartalma 10 súly%, gyártó Dow Chemical Co.), amelyben a részecskék átlagos átmérője 0,481 mikrométer. A kapott, humán chorion-gonadotropinnal érzékenyített latex-részecskéket 20 percig centrifugáljuk 13 000/perc fordulatszámra, az érzékenyített latex-részecskéket elkülönítjük, és 0,2% marhaszérum-albumint tartalmazó 10 ml borát-pufferoldatban szuszpendáljuk. A szuszpenziót centrifugáljuk, a csapadékot a borát-pufferoldattal történő centrifugálással mossuk, és végül 10 ml puffer-oldatban szuszpendáljuk. Ilyen módon 1 súly% latex-részecskéket tartalmazó, humán chorion-gonadotropinnal érzékenyített latex-reagenst kapunk.

(2) Kalibrációs görbe felvétele

Az anti-(humán chorion-gonadotropin)-szérum optimális koncentrációját a 7. példa (2) pontjában leírt módon határozzuk meg (ebben az esetben az 300-szoros hígításnak felel meg). Ezután műanyag kémcsőben bemérünk 0,2 ml anti-(humán chorion-gonadotropin)-szérum-oldatot, amelyet a szérum fiziológias nátriumklorid-oldattal történő 300-szoros hígításával kapunk, hozzáadunk 0,1 ml standard humán chorion-gonadotropin-oldatot, amelynek a koncentrációja a XIII. táblázatban látható, és az elegyet 10 percig rázatjuk. Ezután hozzáadunk 0,1 ml, humán chorion-gonadotropinnal érzékenyített latex-reagenst (amelyet a fenti (1) pont szerint állítunk elő), és az elegyet 10 percig rázatjuk percenként 200 rázatással. A kapott folyadékot 2 mm szélességű üveg abszorpciós kuvettába öntjük, és meghatározzuk az extinkcióját az 1. példa (2) pontjában megadott módon 1,0 mikrométer hullámhosszúságú fény alkalmazásával. A kapott eredményeket a XIII. táblázatban foglaljuk össze.

XIII. Táblázat

A standard humán chorion-gonadotropin-oldat koncentrációja, NE/ml	Extinkció 1,0 μm -nél
10	0,140
1	0,208
0,1	0,271

Ha a táblázatban szereplő számértékeket grafikusán ábrázoljuk, mégpedig a standard humán chorion-gonadotropin-oldat koncentrációjának logaritmusát az abszcisszán, az extinkciót pedig az ordinátán, a 11. ábrán bemutatott kalibrációs görbét kapjuk. Ez a kalibrációs görbe lineáris lefutású azokban a koncentráció-tartományokban, amelyekben a mérés ténylegesen történik.

A kapott kalibrációs görbe alkalmazásával meghatározhatjuk terhes nők véréserumában a humán chorion-gonadotropint.

9. példa

Műanyag kémcsőbe bemérünk 0,1 ml, az 1. példa (1) pontja szerinti módon készített, antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagenst (ahol a polisztirol-latex-részecskék átlagos átmérője 0,481 mikrométer, és az érzékenyített latex-részecskék koncentrációja 1 súly%). Hozzáadunk 0,3 ml standard fibrinogén-oldatot, amely fiziológiás nátriumklorid-oldatban 0,5 súly% marhaszérum-albumint tartalmaz, és koncentrációja a XIV. táblázatban van megadva. Az elegyet 3 órán át rázatjuk percnként 200 rázatással. Ezután meghatározzuk az extinkciót 1,2 mikrométer hullámhosszú fény alkalmazásával az 1. példa (2) pontjában megadott módon. A kapott eredményeket a XIV. táblázatban mutatjuk be.

XIV. Táblázat

A standard fibrinogén-oldat koncentrációja, ng/ml	Extinkció 1,2 μ m-nél
10	0,048
20	0,125
40	0,324
60	0,540
80	0,718
100	0,802

Ha a fenti számértékek alapján kalibrációs görbét állítunk fel, akkor egyértelmű összefüggést tapasztalunk a standard fibrinogén-oldat koncentrációja és az extinkció között. Így a találmány szerint lehetőség nyílik rendkívül csekély, nanogram/ml fibrinogénmennyiségek meghatározására, olyan érzékenységgel, amely összehasonlítható a radioimmun-vizsgálati módszer érzékenységeivel.

10. példa

Antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagenst állítunk elő az 1. példa (1) pontjában ismertetett módon, azzal az eltéréssel, hogy 0,35 mikrométer átlagos részecskeátmérőjű polisztirol-latexet alkalmazunk. A kapott, antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagenst 0,75, 1,0 illetve 2,0 súly% koncentrációjuk. Minden egyes, ilyen módon készített, antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagensre kalibrációs görbét állítunk fel az 1. példa (2) pontjában leírt módon, (1,2 mikrométer hullámhosszú fény és 10 perces ráztatás alkalmazásával). A kapott ka-

librációs görbéket a 12. ábra mutatja be. Amint az ábráról látható, a fibrinogén kimutatásának érzékenysége növekszik az antifibrinogénnel érzékenyített latex-reagensben jelenlevő érzékenyített latex-részecskék koncentrációjával.

11. példa

(1) anti(humán immunglobulin E)-antitesttel érzékenyített latex-reagens készítése

Glicinpufferrel készített, 2 mg/ml koncentrációjú anti(humán immunglobulin E)-antitest-oldathoz hozzáadjuk 0,109 mikron és 0,220 mikron átlagos átmérőjű polisztirol-latex 1:1 térfogatarányú elegyének 1 ml-ét, amely 10 súly% szilárd anyagot tartalmaz. Az elegyet 30 percig keverjük szobahőmérsékleten, majd 40 °C-ra melegítjük, és további 30 percig keverjük ezen a hőmérsékleten. Végül 2–4 °C-ra hűtés közben centrifugáljuk 50 percig 12 000/perc fordulatszámmal.

A csapadékot dekantálással elválasztjuk, és az elkülönített anti(humán immunglobulin E)-antitesttel érzékenyített latex-részecskéket 0,2 súly% koncentrációjú marhaszérum-albumin-oldatba szuszpendáljuk. A kapott reagens 0,33 súly% koncentrációban tartalmazza az érzékenyített latex-részecskéket.

(2) Kalibrációs görbe felvétele

Műanyag kémcsőbe bemérünk 0,1 ml anti(humán immunglobulin E)-latex reagenst (amelyet az (1) pontban leírtak szerint készítünk), és hozzáadunk 0,2 ml standard humán immunglobulin E oldatot (amely izotóniás nátriumklorid-oldattal készült, és 0,2 súly% marhaszérum-albumint tartalmaz), amely a XV. táblázatban megadott koncentrációban tartalmazza a humán immunglobulin E-t. Az antigén-antitest reakció elősegítésére az elegyet keverjük. Közvetlenül ezután a kémcsőben levő reakcióelegyet 4 mm szélességű fényabszorpciós üvegtüveztábla töltjük, és 0,94 mikrométer hullámhosszú fény alkalmazásával, 140 másodperc elteltével meghatározzuk az extinkcióját automatikusan regisztráló spektrofotométer (Hitachi Ltd., Modell EPS-3) segítségével. Összehasonlításként egy olyan szuszpenziót alkalmazunk, amelyet 0,1 ml anti(humán immunglobulin E)-latex reagens 0,2 ml fiziológiás nátriumklorid-oldattal történő hígításával kapunk, és amely 0,2 súly% marhaszérum-albumint tartalmaz. A kapott eredmények a XV. táblázatban láthatók.

Ha a XV. táblázatban feltüntetett értékeket grafikusán ábrázoljuk, mégpedig a standard humán immunglobulin E oldat koncentrációját az abszcisszán, a 0,94 mikrométer hullámhosszú fényre kapott extinkciót pedig az ordinátán, akkor a 13. ábrán látható kalibrációs görbéhez jutunk.

A kapott kalibrációs görbe felhasználásával meghatározhatjuk a betegektől vett szérumokban jelenlevő humán immunglobulin E-t.

XV. Táblázat

A standard humán immun-globulin E oldat koncentrációja, mikrogramm/ml	Extinkció 0,94 mikrométernél 140 másodperc elteltével
0,37	0,0080
1,11	0,0474
3,33	0,1314
10,0	0,1670

12. példa

A 11. példa (1) pontjában ismertetett módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett anti(humán immunglobulin G)-antitestet, használunk, és 0,220 mikron átlagos részecskeméretű polisztirol latexet alkalmazunk (gyártó Dow Chemical Co.). Ilyen módon anti(humán immunglobulin G)-vel érzékenyített reagenst kapunk, amelynek alkalmazásával a 11. példa (2) pontjában megadottak szerint határozzuk meg az extinkciót 0,95 mikrométer hullámhosszúságú fényvel. Az eltérés mindössze az, hogy standard humán immunglobulin G oldatot használunk a standard humán immunglobulin E oldat helyett, s 2 mm szélességű küvetát a 4 mm-es küvetta helyett. Az eredményeket a XVI. táblázatban mutatjuk be.

XVI. Táblázat

A standard humán immun-globulin G oldat koncentrációja, mikrogramm/ml	Extinkció 0,95 mikrométernél
0,1	0,0050
0,5	0,012
1,0	0,025
5,0	0,125
10,0	0,185

Az előzőekben tárgyalt módon kalibrációs görbét állítunk fel a XVI. táblázatban feltüntetett adatokból. A kalibrációs görbe felhasználásával meghatározhatjuk a szérumokban jelenlevő humán immunglobulin G koncentrációját.

13. példa

A 11. példa (1) pontjában ismertetett módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett anti(humán im-

munoglobulin M)-antitestet alkalmazunk, és 0,220 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol latexet (gyártó Dow Chemical Co.) használunk. Az így kapott anti(humán immunglobulin M)-mel érzékenyített latex reagens segítségével meghatározzuk az extinkciót 0,95 mikrométer hullámhosszúságú fényenél, a 11. példa (2) pontjában megadottak szerint. Az egyetlen eltérés az, hogy a standard humán immunglobulin E oldat helyett standard humán immunglobulin M oldatot használunk 4 mm szélességű küvetában. A kapott eredményeket a XVII. táblázatban foglaljuk össze.

XVII. Táblázat

A standard humán immun-globulin M oldat koncentrációja, mikrogramm/ml	Extinkció 0,95 mikrométernél
0,1	0,0075
0,5	0,023
1,0	0,034
5,0	0,105
10,0	0,140

A XVII. táblázatban foglalt adatok alapján kalibrációs görbét állítunk fel, amelynek felhasználásával meghatározhatjuk a szérum humán immunglobulin M tartalmát.

XVIII. Táblázat

A standard humán alfa-fetoprotein-oldat koncentrációja, mikrogramm/ml	Extinkció 0,94 mikrométernél
0,022	0,010
0,110	0,092
0,55	0,26
1,1	0,36

14. példa

A 11. példa (1) pontjában megadott módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett anti(humán alfa-fetoprotein)-antitestet használunk, és 0,220 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol latexet (gyártó Dow Chemical Co.) alkalmazunk. Az ilyen módon előállított, anti(humán alfa-fetoprotein)-nel érzékenyített latex reagens felhasználásával meghatározzuk az extinkciót 0,95 mikrométer hullámhosszúságon, a 11. példa (2) pontja szerint. Az

egyetlen eltérés az, hogy a standard humán immunglobulin E oldat helyett standard humán alfa-fetoprotein-oldatot alkalmazunk. A kapott eredményeket a XVIII. táblázat tartalmazza.

A XVIII. táblázat adatai alapján kalibrációs görbét szerkesztünk az előzőek során ismertetett módon. A kapott kalibrációs görbe felhasználásával meghatározhatjuk a szérumban jelenlevő humán alfa-fetoprotein mennyiségét.

15. példa

A 11. példa (1) pontjában ismertetett módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett tengerimalac anti(sértés inzulin)-antitestet (anti-inzulint) használunk, és 0,220 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol latexet alkalmazunk. A kapott, anti-inzulinnal érzékenyített latex reagens segítségével meghatározzuk az extinkciót 0,94 mikrométer hullámhosszúságon, a 11. példa (2) pontjában tárgyalt módon, azzal az eltéréssel, hogy a standard humán immunglobulin E oldat helyett standard sertés inzulin-oldatot használunk, és az extinkciót 3 perc elteltével mérjük. A kapott eredményeket a XIX. táblázatban tüntetjük fel.

XIX. Táblázat

Standard inzulin-oldat koncentrációja, nanogramm/ml	Extinkció 0,94 mikrométernél 3 perc elteltével
0,41	0,0011
1,21	0,0041
3,70	0,0130
11,1	0,0351
33,3	0,0643

A XIX. táblázat adatai alapján kalibrációs görbét szerkesztünk, amely a 14. ábrán látható. E kalibrációs görbe segítségével meghatározhatjuk a szérumban inzulin-tartalmát.

16. példa

A 11. példa (1) pontjában ismertetett módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett nyúl anti(humán chorion-gonadotropin-béta-alegység)-antitestet használunk, és 0,220 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol latexet (gyártó Dow Chemical Co.) használunk. Az ilyen módon kapott anti(humán chorion-gonadotropin)-béta-alegységre érzékenyített latex reagens segítségével meghatározzuk az extinkciót 0,95 mikron hullámhosszúságon, a 11. példa (2) pontjában megadott módon, azzal az eltéréssel, hogy a standard humán immunglobulin E oldat helyett standard humán chorion-gonadotro-

pin-béta-alegység-oldatot használunk, és az extinkciót 1 perc elteltével mérjük. A kapott eredményeket a XX. táblázat tartalmazza.

XX. Táblázat

A standard humán chorion-gonadotropin-béta-alegység-oldat koncentrációja, nanogramm/ml	Extinkció 0,95 mikrométernél 1 perc elteltével
1,56	0,0094
3,12	0,0122
6,25	0,0336
12,5	0,0844
25	0,166
50	0,364

A XX. táblázat adatainak grafikus ábrázolásával a 15. ábrán látható kalibrációs görbét kapjuk, amelynek felhasználásával meghatározhatjuk a szérumban jelenlevő humán chorion-gonadotropin-béta-alegység koncentrációját.

17. példa

A 11. példa (1) pontjában tárgyalt módon járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az anti(humán immunglobulin E)-antitest helyett humán gamma-globulint használunk, és 0,220 mikrométer átlagos részecskeméretű polisztirol latexet (gyártó Dow Chemical Co.) alkalmazunk. Az ilyen módon kapott, humán gamma-globulinra érzékenyített latex reagens felhasználásával meghatározzuk az extinkciót 0,95 mikrométer hullámhosszúságon, a 11. példa (2) pontjában megadott módon azzal az eltéréssel, hogy a standard humán immunglobulin E oldat helyett különböző hígításokban használjuk a reuma faktort tartalmazó szérumot, az üveg küvetta szélessége pedig 2 mm. A kapott eredményeket a XXI. táblázatban tüntetjük fel.

XXI. Táblázat

A reuma faktort tartalmazó szérum hígítása	Extinkció 0,95 mikrométernél
2	0,630
4	0,440
6	0,321
8	0,196
16	0,023

A XXI. táblázat adatainak grafikus ábrázolásával kalibrációs görbét állítunk fel, amelynek segítségével meghatározhatjuk a reuma faktort a szérumban.

Szabadalmi igénypontok:

1. Eljárás antigének és antitestek meghatározására, azzal jellemezve, hogy valamely antigént vagy antitestet, célszerűen antifibrinogént, anti(humán chorion-gonadotropin)-t, humán chorion-gonadotropint, oxitocint, anti(humán immunglobulin E)-t, anti(humán immunglobulin G)-t, anti(humán immunglobulin M)-t, anti(humán chorion-gonadotropin)-béta-alegységet, humán gamma-globulint, anti(sértés inzulin)-t vagy anti(humán alfa-fetoprotein)-t legfeljebb 1,6 mikron átlagos átmérőjű, oldhatatlan hordozórészecskékhez rögzítünk, a hordozón a jelenlevő antitestet és/vagy antigént megfelelő antigénnel, antitesttel vagy elegyükkal cseppfolyós közegben reagáltatjuk, a reakcióelegyet 0,6–2,4 mikrométer közötti, de a hordozórészecskék átlagos átmérőjénél 1,5–10-szer hosszabb hullámhosszúságú fénnel besugározzuk és a reakcióelegy extinkcióját mérjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy hordozóként 0,1–1,0 mikrométer közötti átlagos átmérőjű oldhatatlan hordozórészecskéket alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy hordozóként 0,2–0,8 mikrométer közötti átlagos átmérőjű oldhatatlan hordozórészecskéket alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy hordozóként polisztirol-latex vagy szilíciumdioxid részecskéket alkalmazunk.

5

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a reakcióelegy besugárzását 0,94–1,7 mikrométer közötti hullámhosszúságú fénnel végezzük.

10

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a reakcióelegy besugárzását 1,2 mikrométer hullámhosszúságú fénnel végezzük.

15

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a reakcióelegy besugárzását a hordozórészecskék átlagos átmérőjénél 2–5-ször hosszabb hullámhosszúságú fénnel végezzük.

20

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a hordozórészecskéket 0,1–0,5 súly% közötti koncentrációban alkalmazzuk a reakcióelegyben.

25

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy cseppfolyós közegként vizet alkalmazunk.

30

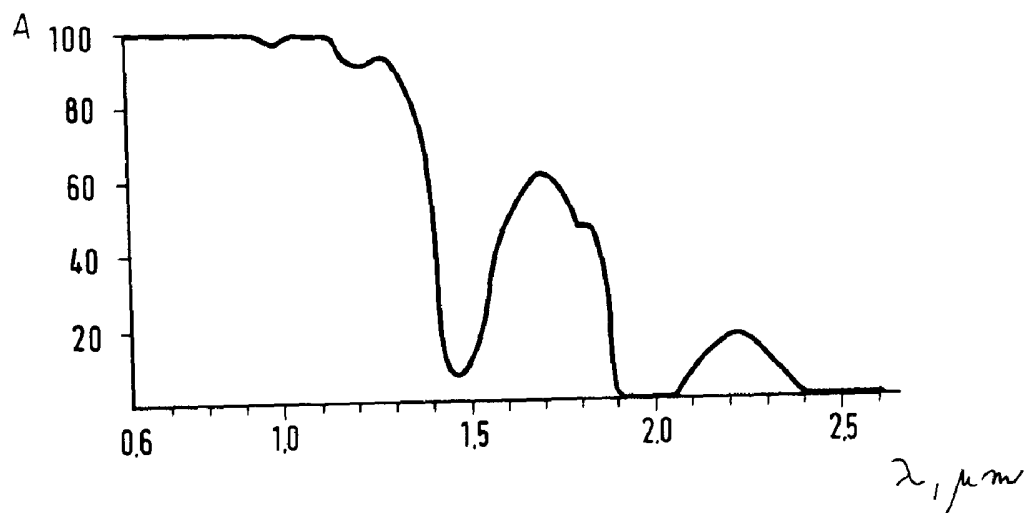
10. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a hordozón jelenlevő antitestet vagy antigént antigén vagy antitest és a cseppfolyós közegben jelenlevő antitest vagy antigén reakcióelegyével reagáltatjuk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogatosítási módja, azzal jellemezve, hogy az antitestet vagy az antigént fizikai és/vagy kémiai adszorpcióval rögzítjük az oldhatatlan hordozórészecskékhez.

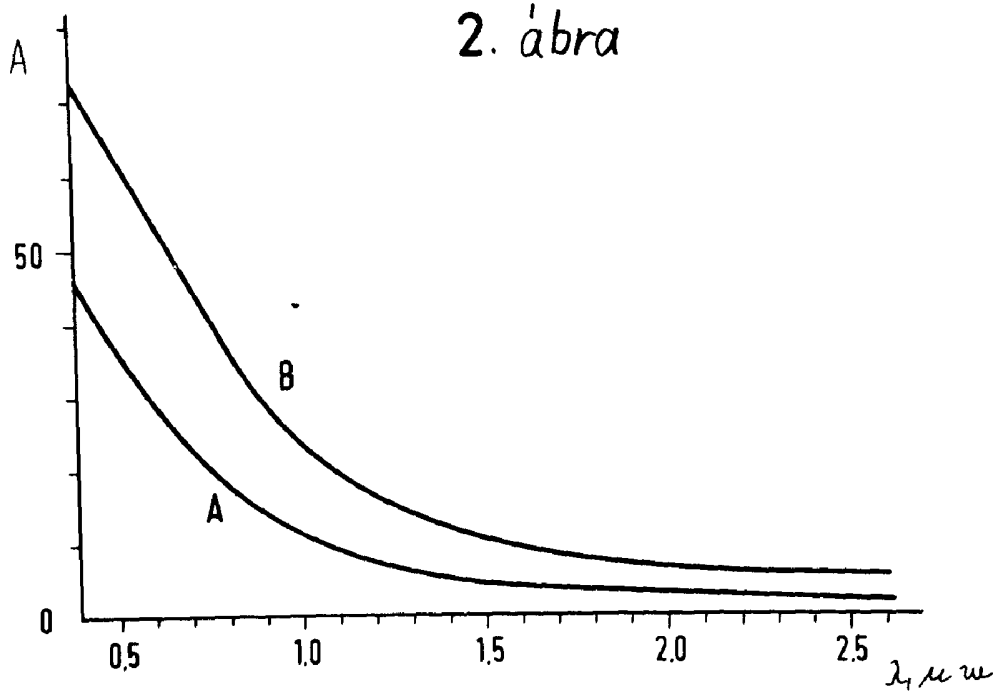
9 lap ábrákkal

1. ábra

9/1

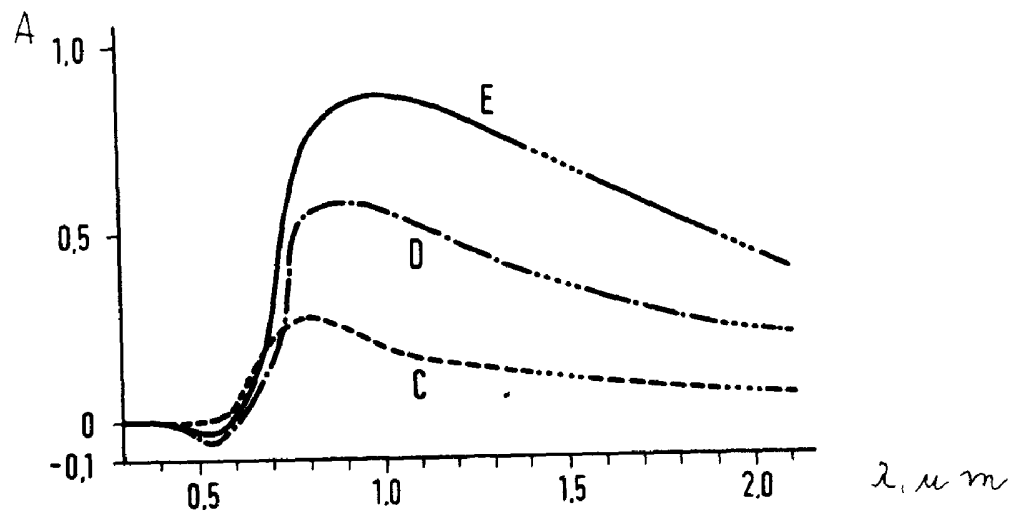


2. ábra

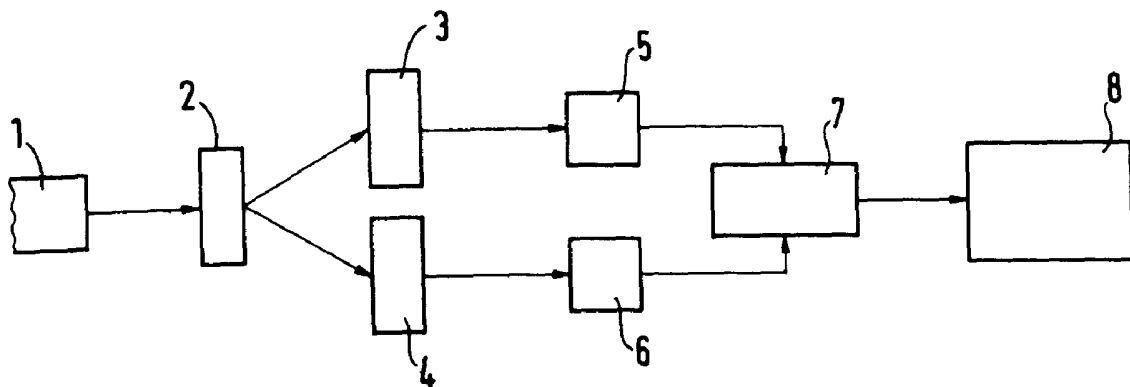


3. ábra

9/2

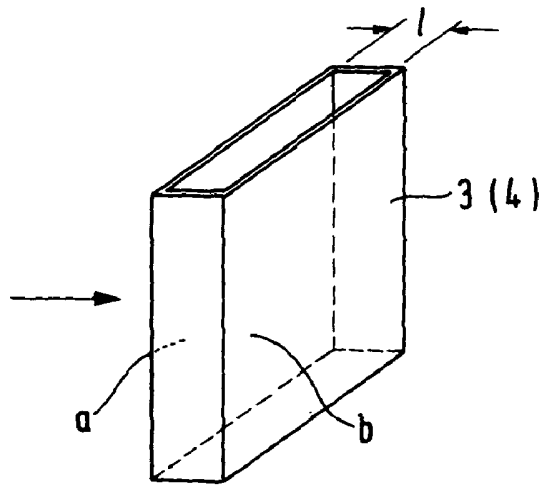


4. ábra

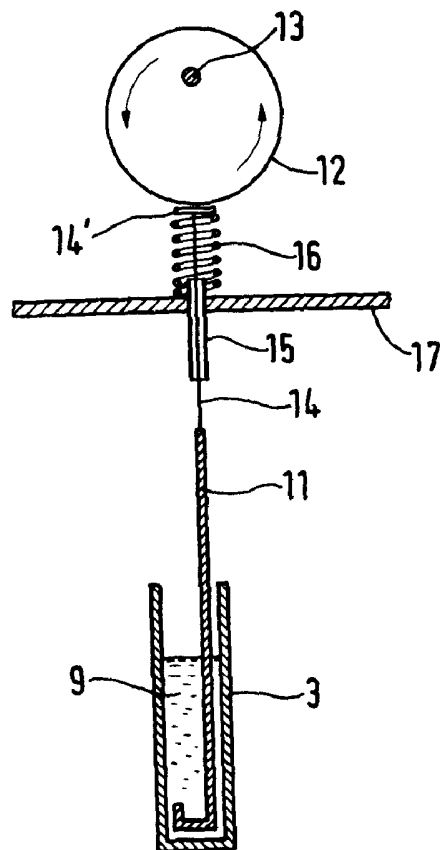


5. ábra

9/3

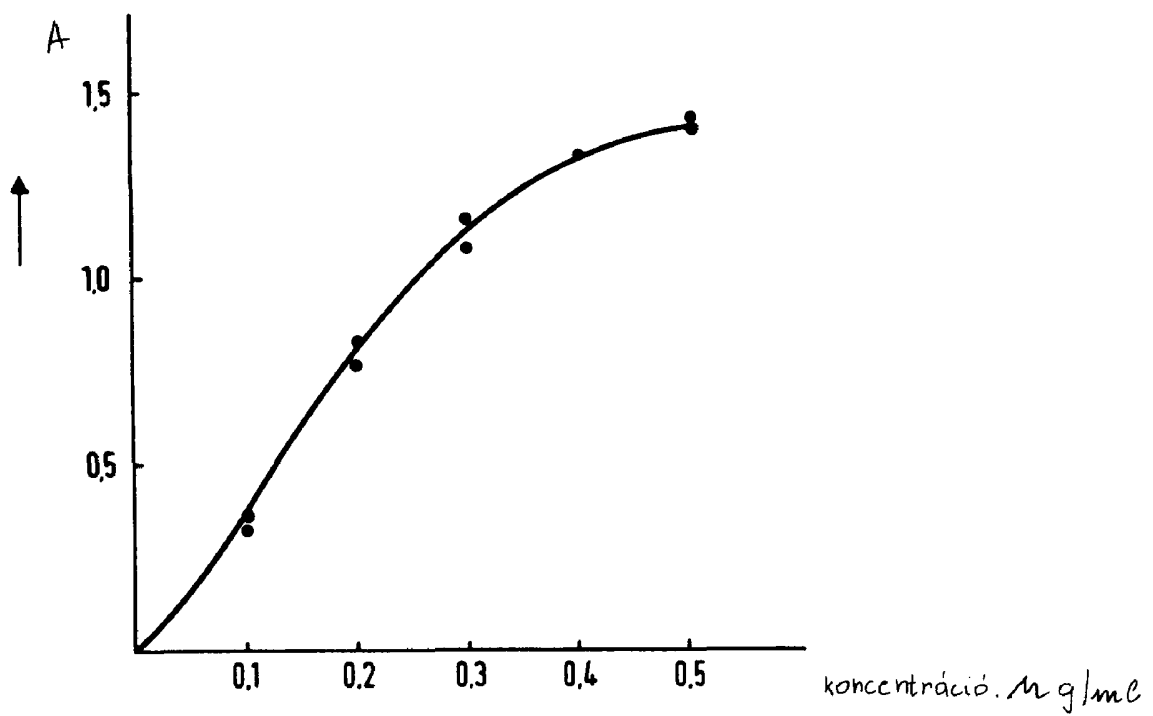


6. ábra

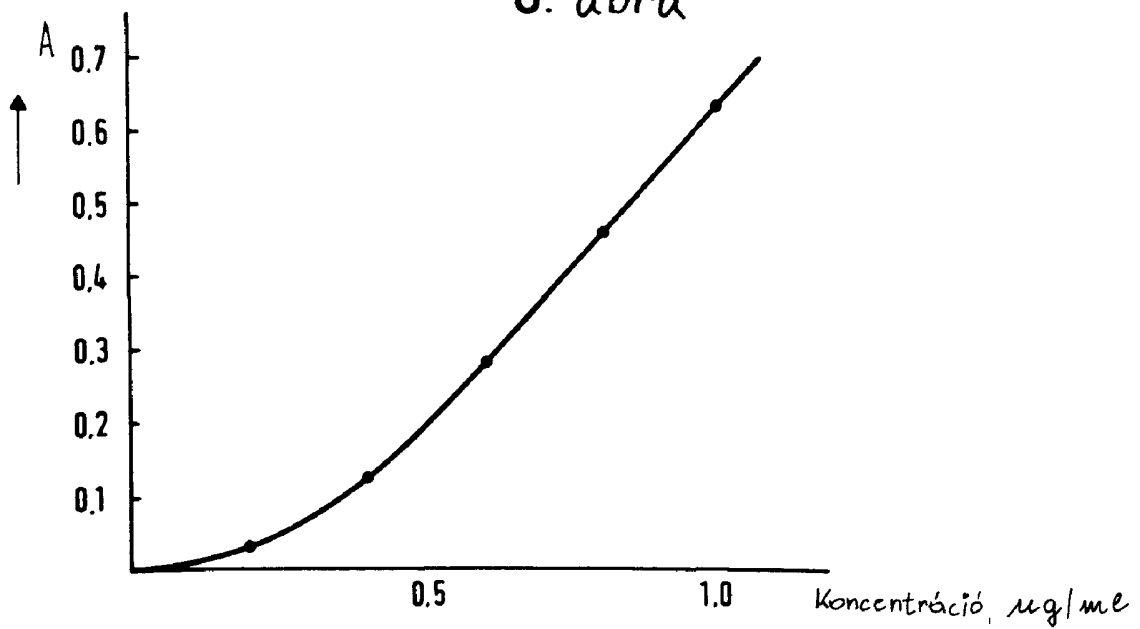


7. ábra

9/4

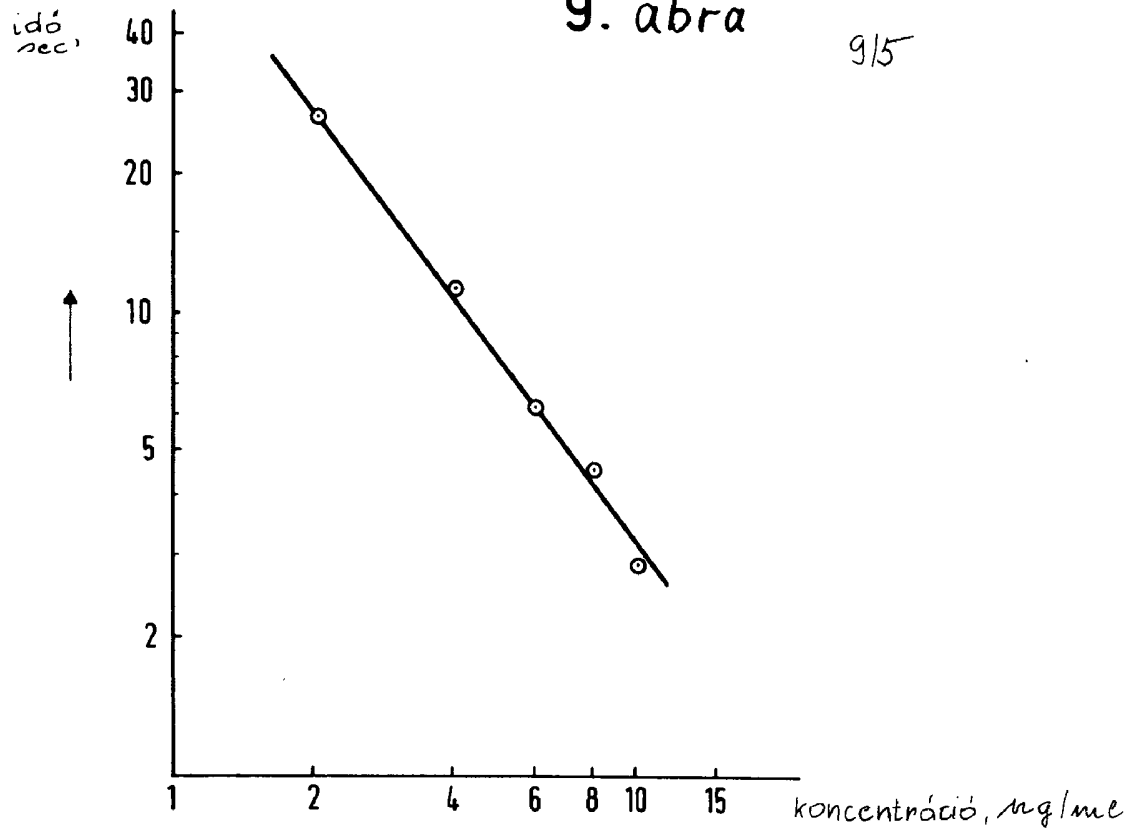


8. ábra

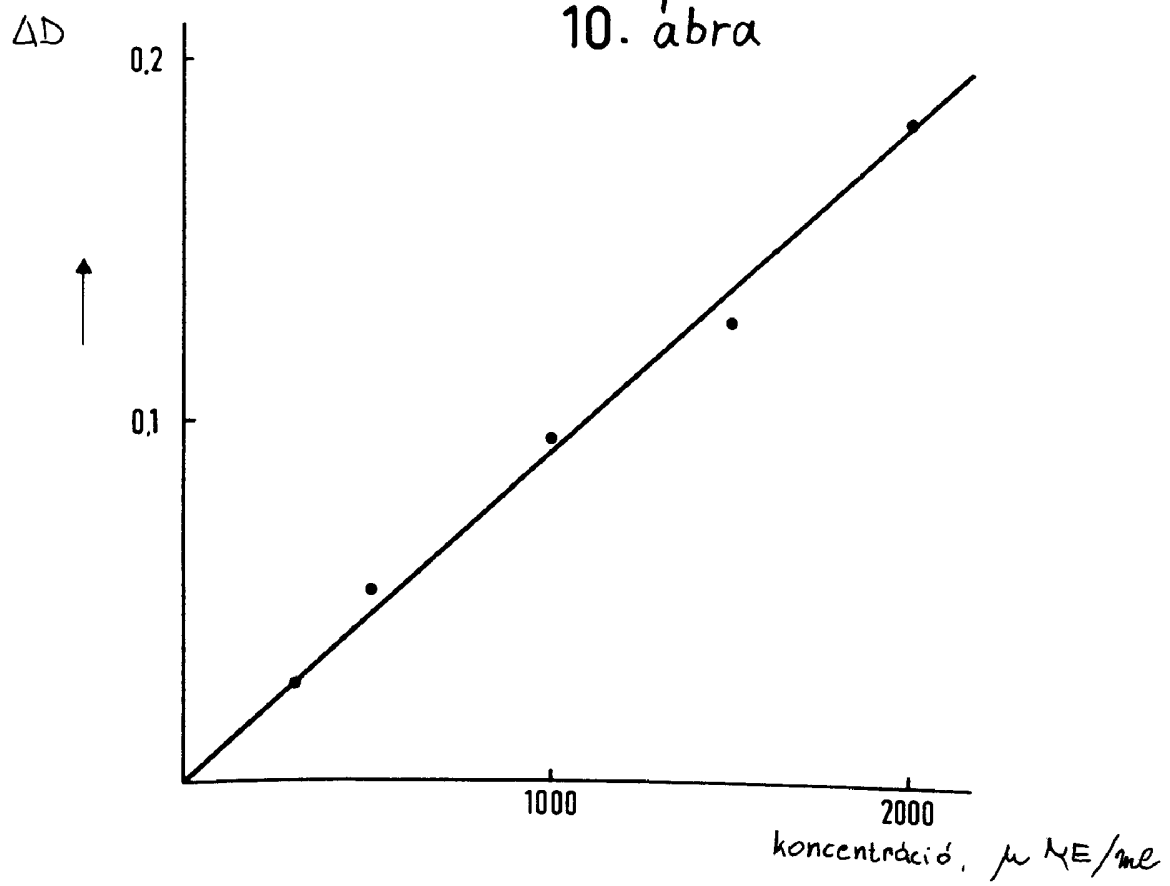


9. ábra

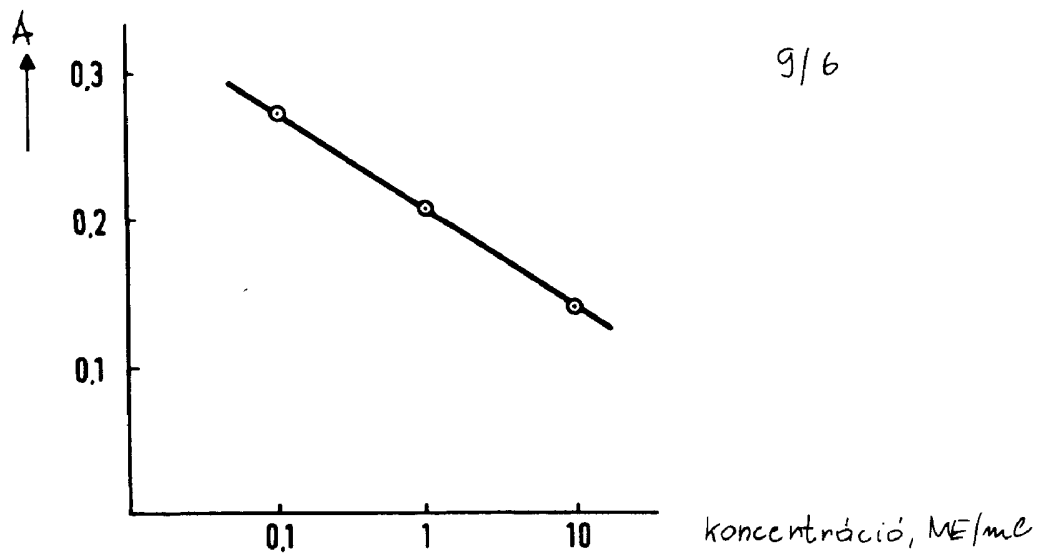
9/5



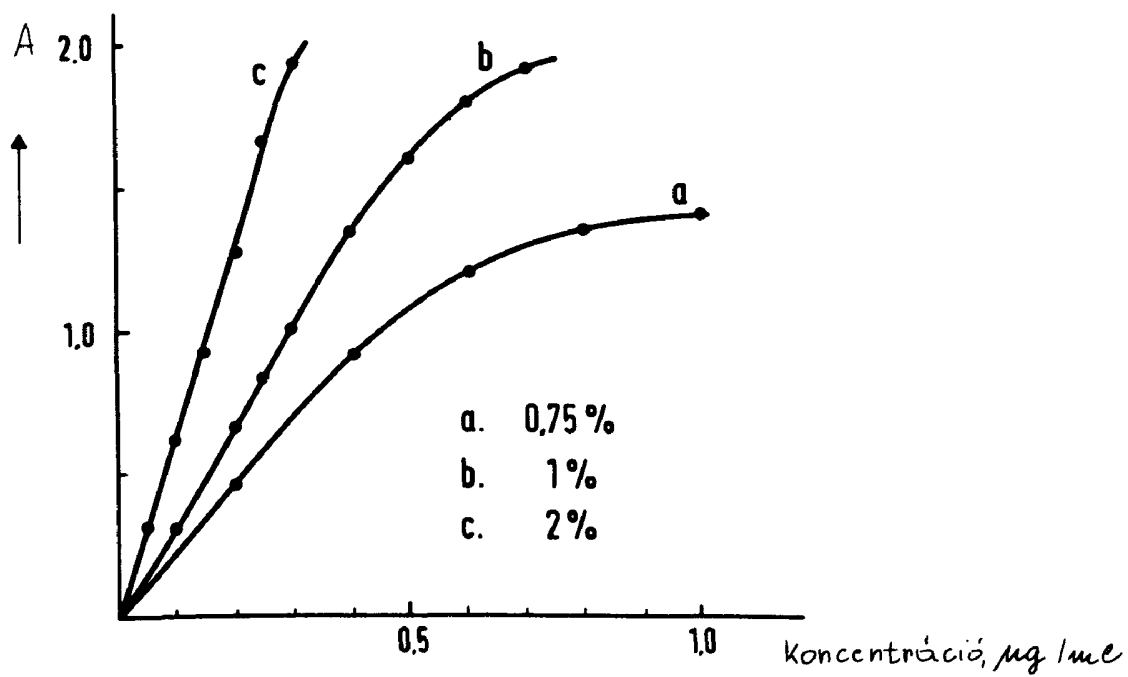
10. ábra

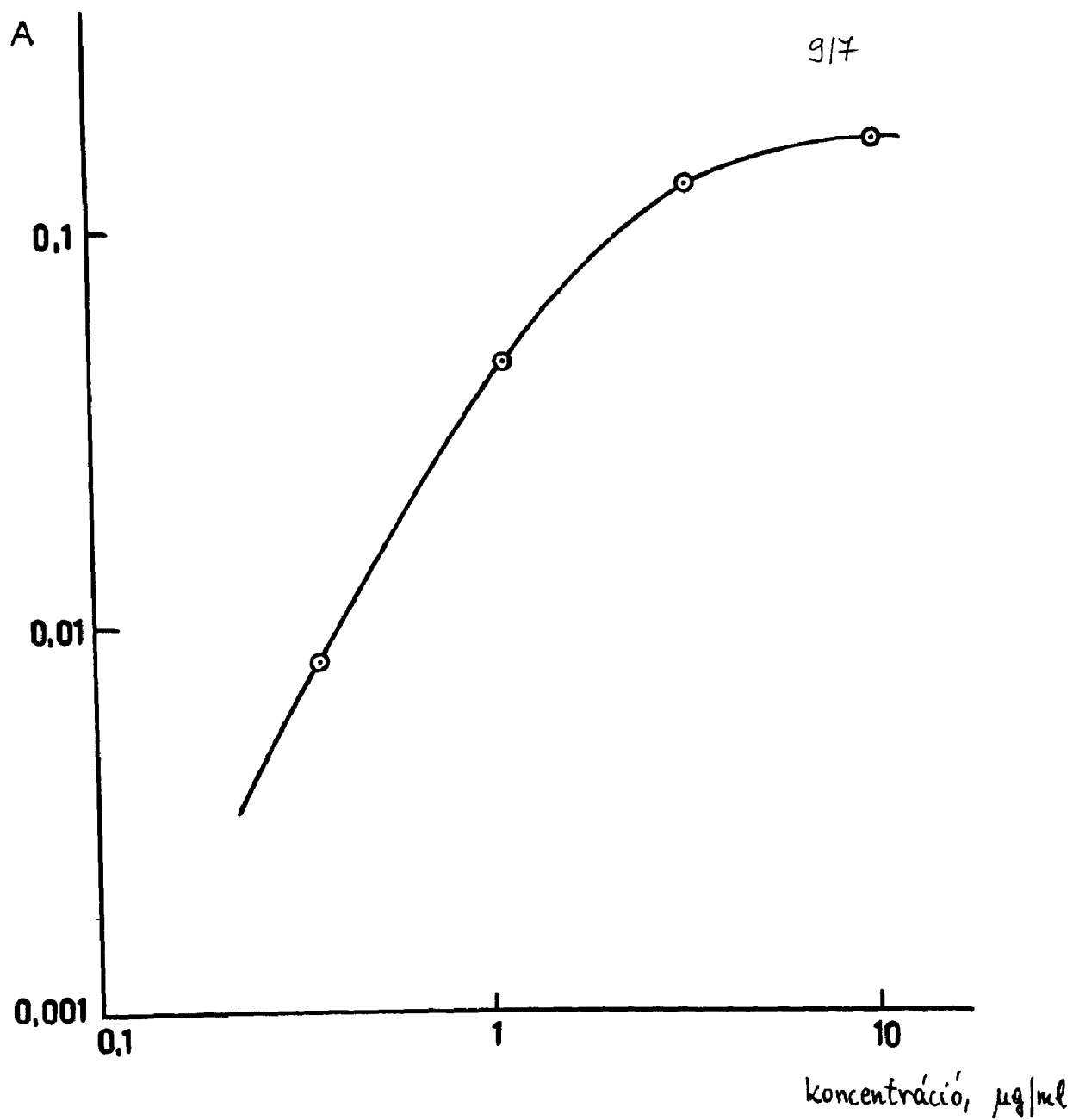


11. ábra

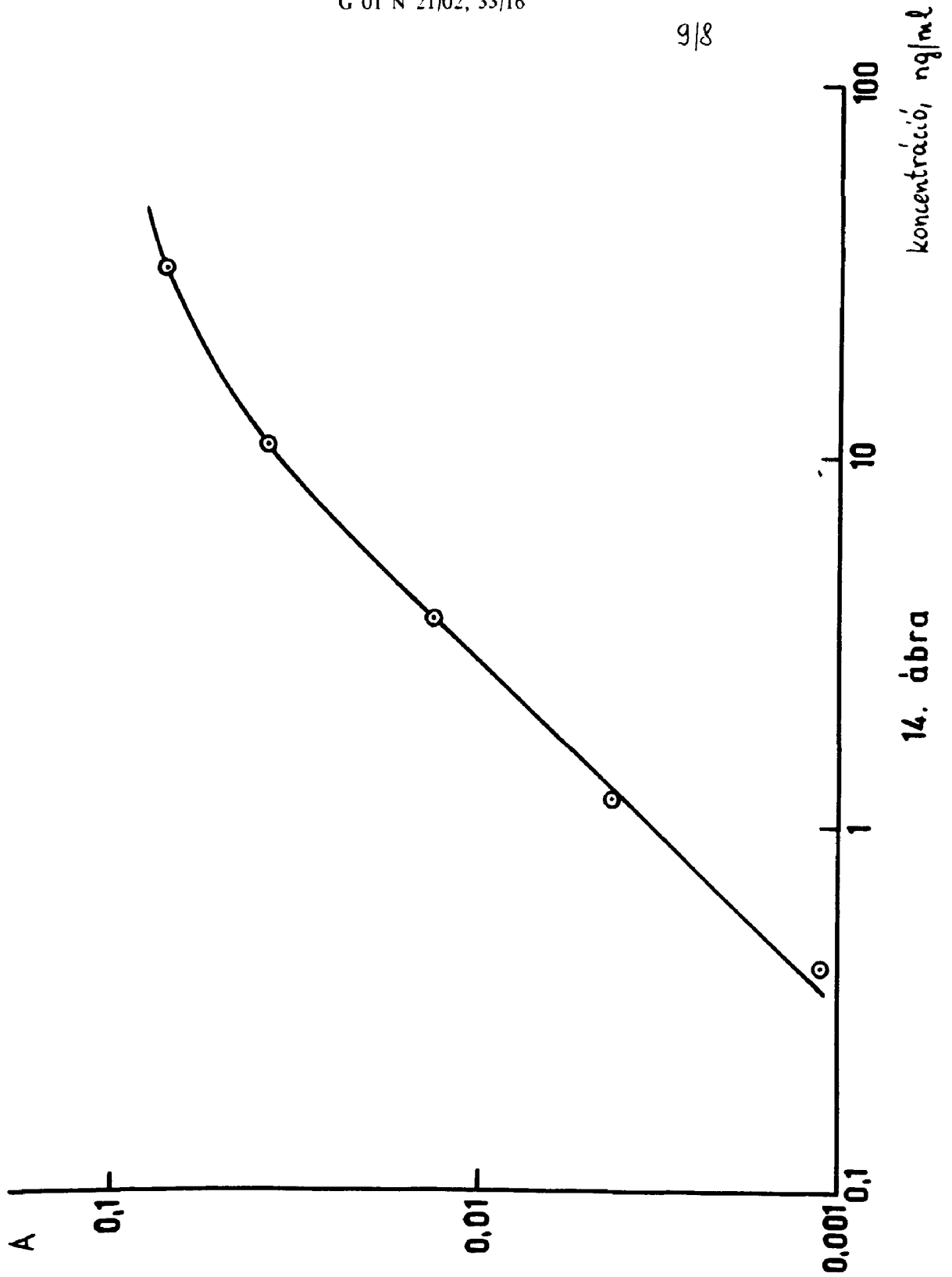


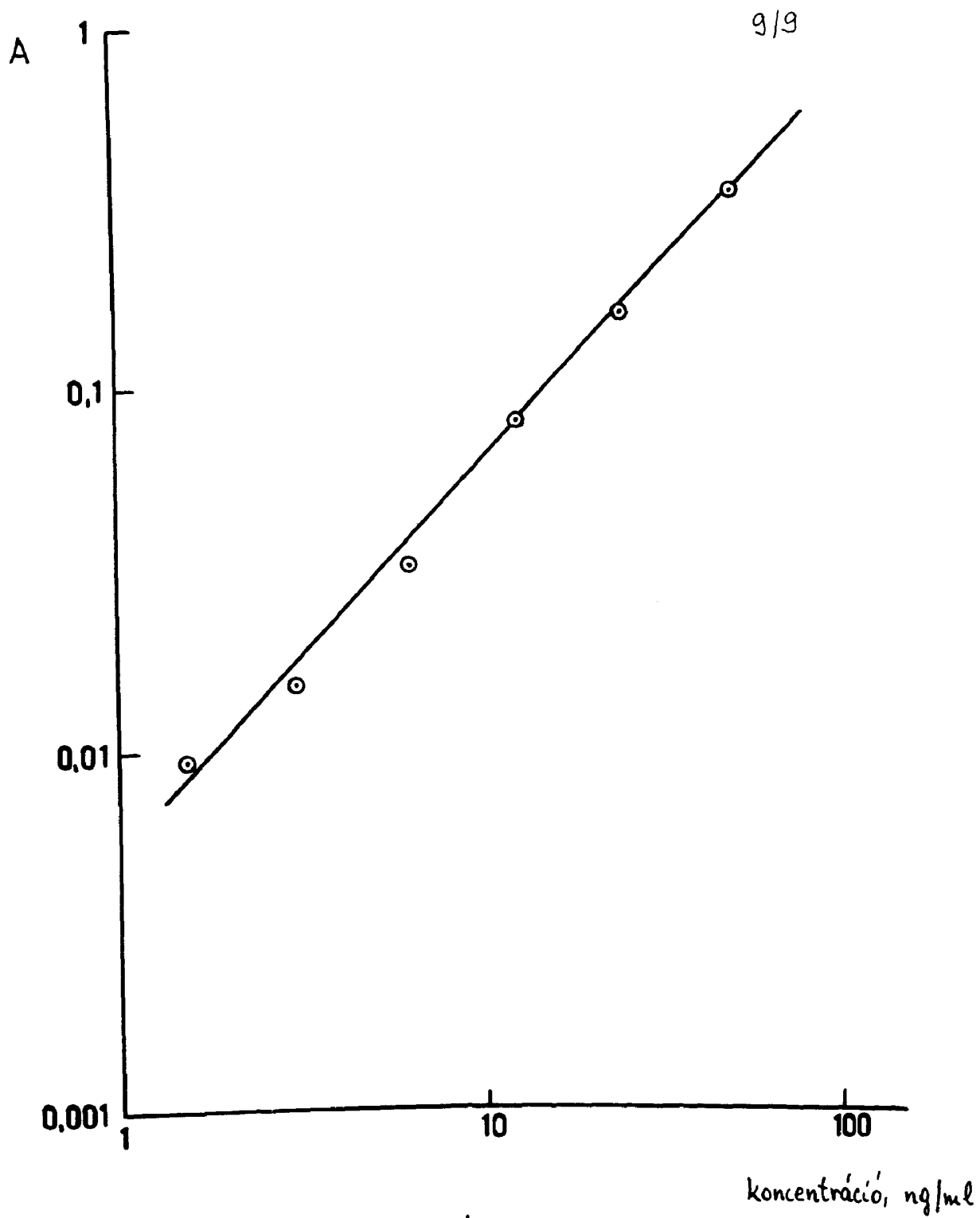
12. ábra





13. ábra





15. ábra