

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. März 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/019038 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/544
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008995
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
13. August 2003 (13.08.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 39 568.3 23. August 2002 (23.08.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES ROTES KREUZ BLUTSPENDEDIENST BADEN-WÜRTTEMBERG-HESSEN GEMEINNÜTZIGE GESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; Gunzenbachstrasse 35, 76530 Baden-Baden (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SPINDLER, Jörg [DE/DE]; Emmertsgrundpassage 33, 69126 Heidelberg (DE).
- (74) Anwälte: KELLER, Günter usw.; Lederer & Keller, Prinzregentenstrasse 16, 80538 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AND/OR ANTIGENS IN A TEST LIQUID, PARTICULARLY FOR DETERMINING THE BLOOD TYPE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN UND/ODER ANTIGENEN IN EINER TESTFLÜSSIGKEIT, INSBESONDERE BEI DER BLUTGRUPPENBESTIMMUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting antibodies or antigens in a test liquid by means of a reaction with a given specific bonding partner. According to the inventive method, the antigens are tied to a carrier, and the resulting sample mixture is subjected to an incubation step and then centrifuged by means of a particle-buffer mixture. An agglutinate comprising the antigen that is to be detected, the carrier, and antibodies is formed in case of a positive antigen-antibody reaction. A predefined quantity of the incubated sample mixture is added to a predefined quantity of a buffer-particle mixture which is disposed inside a detection receptacle. The buffer-particle mixture is provided with an embedding buffer consisting of an aqueous solution of dextran and/or polyethylene glycol, glycine, and/or trisodium citrate.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern oder Antigenen in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind und das dergestalt hergestellte Probengemisch einem Inkubationsschritt ausgesetzt wird und anschließend durch ein Partikel-Puffer-Gemisch zentrifugiert wird, wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus nachzuweisendem Antigen, Träger und Antikörpern gebildet wird, wobei eine vorbestimmte Menge des inkubierten Probengemisches auf eine vorbestimmte Menge eines Puffer-Partikel-Gemisches, welches sich innerhalb eines Nachweisgefäßes befindet, zugegeben wird, wobei das Puffer-Partikel-Gemisch einen Einbettpuffer aufweist, der aus einer wässrigen Lösung von Dextran und/oder Polyethylenglycol, Glycin und/oder Trisodiumcitrat besteht.

WO 2004/019038 A2

Verfahren zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen  
in einer Testflüssigkeit, insbesondere bei der Blutgruppenbestimmung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen, insbesondere zur Blutgruppenbestimmung, Antikörper-Suchtest, Serumgegenprobe sowie zur Infektionsserologie, in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei die Antigene bzw. die Antikörper oder die spezifischen Bindungspartner in der Testflüssigkeit ungebunden und/oder an einen Träger gebunden sind und das dergestalt hergestellte Probengemisch einem Inkubationsschritt ausgesetzt wird, wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus nachzuweisenden Antigenen bzw. Antikörpern bzw. den spezifischen Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch als Sedimentationsbild detektierbar ist.

Menschliche Blutgruppen, aber auch eine Vielzahl von anderen in einem Organismus gebildeten Substanzen, werden durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Diese Reaktion ist detektierbar über eine Vernetzung, d.h. Agglutination, von Antigenen (Ag), Antikörpern (Ak) und gegebenenfalls bestimmten Trägersubstanzen, die Antigene oder Antikörper tragen, zu einem makroskopisch erfaßbaren optisch nachweisbaren Komplex, dem Agglutinat. Hierbei kann es sich um ein dreidimensionales Agglutinat handeln oder um ein sogenanntes Monolayer, das häufig dann zu beobachten ist, wenn die Oberflächen der Testplatten mit Antikörpern beschichtet (kodiert) sind.

Beispiele sind die erythrozytenseitige Blutgruppenbestimmung sowie die Serumgegenprobe. Bei der erstgenannten werden an die Membran des Spendererythrozyten gebundene Blutgruppen-Antigene durch Reaktion mit Antiseren nachgewiesen, die Antikörper als spezifische Bindungspartner enthalten. Die Antikörper, die sich in einer Testflüssigkeit befinden, sind bekannt (Such-Antikörper), zum Beispiel Testantikörper-

- 2 -

Aufschwemmung, und die unbekanntes Erythrozyten mit unbekanntes Antigenen werden zugegeben. Die Agglutination wird durch Reaktion von Antigen und Antikörper hervorgerufen. Damit kann das System ABO und RH und darüber hinaus noch eine Vielzahl von Antigenen bestimmt werden.

Bei der Serumgegenprobe sind die Erythrozyten, die bekannte Antigene (Such-Antigene) aufweisen, bekannt. Die Testflüssigkeit, zum Beispiel Serum, beinhaltet die unbekanntes körpereigenen Antikörper (sog. Isoagglutinine), welche durch Reaktion mit den Test-Erythrozyten nachgewiesen werden. Damit kann ebenfalls die Blutgruppe, jedoch nur ABO, bestimmt werden, Biotest, Lexikon der Immunologie, 2. Aufl., Medical Service München, Seite 36, 37.

Diese Technik arbeitet mit nativen Mikrotiterplatten mit Rundboden, wobei in die Vertiefungen der Platte eine Serie von verschiedenen Antiseren, insbesondere Anti-A, Anti-B, Anti-D und Rhesuskontrollserum, zur Bestimmung der Blutgruppe im ABO-System, einpipettiert und mit den zu testenden Erythrozyten in verdünnter Form versetzt wird. Nach einer Inkubationszeit von wenigstens 20 Minuten wird die Platte an zentrifugiert und vorsichtig aufgeschüttelt. Die Gesamtbearbeitungszeit beträgt circa 40 Minuten. Eine positive Antigen-Antikörper-Reaktion ist als Agglutinat sichtbar, eine negative Reaktion zeigt sich als eine aufgeschwemmte Erythrozytensuspension gegeben, die sich beim Stehenlassen als Knopf am Boden der Testplatte absetzt. Die Serumgegenprobe arbeitet in ähnlicher Weise.

Das Verfahren ist nur aufwendig automatisierbar und liefert oft keine Eindeutigkeit. Die Zuverlässigkeit der Detektion einer positiven Reaktion hängt von der Stärke der Antikörper-Antigen-Bindung ab: bei schwachen Bindungen können die agglutinierten Erythrozyten durch äußere Störungen, insbesondere durch das Aufschütteln, wieder getrennt und somit fälschlich als negative Reaktion diagnostiziert werden. Aus diesem Grunde ist wegen des eventuell fehlenden klaren Reaktionsbildes die automatische Unterscheidung zwischen positiver und negativer Reaktion, z.B. mittels automatischer photometrischer Auswertung, praktisch nicht möglich, sondern muß von einer erfahrenen Bedienperson vorgenommen oder zumindest visuell überprüft werden und ist deshalb sehr zeitaufwendig.

Aus der EP 0 363 510 A ist die sog. Solid-Phase-Technik zum Auffinden von irregulären Antikörpern bekannt, welche auf kodierter Mikrotiterplatten ohne Gel basiert. Diese benötigt mehrfache aufwendige Wasch- und Zentrifugierschritte. Die Gesamtabarbeitungszeit, Inkubation 20 Min, Zentrifugation, Waschschrirte, beträgt circa

- 3 -

40 Min. Die positiven Ergebnisse sind als Monolayer (Rasen), die negativen Ergebnisse als Knopf am Plattenboden zu sehen. Bedingt durch diese Schritte sowie die lange Dauer ist eine Flexibilität der Abarbeitung der Proben und somit Automatisierung schlecht gegeben. Außerdem kann mit dieser Technik nur bedingt und mit großem Aufwand die ABO-Rh und Serumgegenprobe abgearbeitet werden.

Aus der EP 0 305 337 A1 ist zum Nachweis von Antigenen oder Antikörpern ein Verfahren zur optischen Sichtbarmachung von Komplexen von trägergebundenen Antigenen mit Antikörpern in Reaktionsgefäßen bekannt geworden, welche ID-Gel-Technik genannt wird. Diese benützt sechs parallele, mit Gel-Beads gefüllte Säulen in Form einer Karte. Im oberen Bereich oberhalb der Säule befindet sich ein zur Aufnahme der Probe dienendes, größeres Behältnis. Zwischen der unteren, mit Gel gefüllten Säule und dem oberen Behältnis muß bei Befüllung mit der Probe ein Luftpolster verbleiben; es erfolgt eine Ruhe-Inkubationsphase von 15 Min bei 37°C; die anschließende Zentrifugationszeit der Karte beträgt 10 Minuten bei 85xg. Das Ergebnis wird durch eine seitliche Betrachtung der Säule abgelesen. Bei positiver Reaktion befinden sich die Agglutinate auf dem Gel der Säule oder im Gel der Säule flockig verteilt. Bei einer negativen Reaktion befinden sich die Erythrozyten in kompakter Form am Boden der Säule. Eine Verkürzung der Inkubationszeit ist nicht möglich, weil die Proben nicht mechanisch bewegt werden dürfen, weil sonst die Probe während der Inkubationsphase direkt mit dem Gel in Kontakt käme und dadurch eine falsch-negative Reaktion angezeigt würde. Auch kann die g-Zahl nicht erhöht und damit die Zentrifugationszeit nicht erniedrigt werden, weil sonst ebenfalls eine falsch-negative Reaktion angezeigt würde. Ebenso sind für die Serumgegenprobe und ABO-RH System gesonderte Karten notwendig, wie für die Unterscheidung von zum Beispiel IgG und IgM gesonderte Säulen einer Karte notwendig sind. Bedingt durch die noch immer lange Inkubations- und Zentrifugationszeit und die Kartenform sowie gesonderter Säulen für die einzelnen Bestimmungen ist diese Technik für eine Vollautomation nicht gut geeignet. Auch ist die Versendung der Karten zu den Kunden problematisch, da das Gel bei einem Aufdemkopfstehen der Säulen aus denselben herauslaufen kann. Zu erwähnen ist noch, dass eine Pipettierung des Gels aufgrund der hohen Viskosität und deren Verklebung nachträglich in die Säule problematisch ist.

Der EP 0 849 595 B1, welche auf der EP 0 305 337A1 aufbaut, ist zu entnehmen, dass (Zitat)"kommerziell erhältliche Standardpartikel mit einem Durchmesser von 3-7,5 µm nur unvollständig in die Gelmatrix sedimentieren, während größere, 11,9 µm, bzw. kleinere synthetische Partikel < 1 µm nur schwach in das Gel eindringen konnten. Eine Erhöhung der Parameter ' Zentrifugationsdauer, von 10 Min bis auf 50 Min bzw.

- 4 -

Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1030 bis 1300 rpm brachte zwar eine bessere, aber immer noch keine vollständige Sedimentation. Selbst wenn durch diese beiden Maßnahmen eine optimale Sedimentation hätte erreicht werden können, so ist doch eine Veränderung/Erhöhung der Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit aus folgenden Gründen sehr nachteilig: 1. Das Verfahren der EP 0849595 B1 soll ein im Vergleich zu vergleichbaren Methoden besonders zeitaufwendiges Verfahren erlauben. Bei einer möglichen Zentrifugationsdauer von 50 Min würde sich die angestrebte Testdauer von 20 Minuten inklusive Inkubation damit verdreifachen. 2. Wie dem Fachmann bekannt ist, verringert sich die Sensitivität in Gel-Zentrifugationsverfahren mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit" (Zitat Ende). Zum Nachweis der Reaktion wird eine 10 minütige Zentrifugation bei 85 g angewandt.

Ein Vorteil der Erfindung besteht darin, eine neue Methode für die AB0- sowie RH-Bestimmung, für die Serumgegenprobe sowie für den Antikörpersuchtest bereitzustellen, welche den modernen Anforderungen des Marktes entspricht, nämlich eine flexible und schnelle automatische Abarbeitung der Proben über einen Vollautomaten mit Notfalleingabe für Patienten und Spender bereitzustellen. Dazu muß die Abarbeitungszeit möglichst kurz sein, was bedeutet, dass die Inkubationszeit höchstens 5 bis 7 Minuten möglichst separat in einer Platte und die Zentrifugationszeit 2 bis 4 Minuten ebenso separat in einer Reaktionsplatte betragen darf, welche noch die Anforderung erfüllen müssen, dass diese individuell beschickt werden können. Vorteilhaft ist auch, wenn sich die Testvorrichtung einfach mit den einzelnen Komponenten in einfacher Weise, z.B. kurz vor der Untersuchung, beschicken lässt.

Ebenso sind keine Waschschriffe erforderlich. Um Notfallpatienten vorziehen zu können, muß bei einer Notfalleingabe zusätzlich gewährleistet sein, dass die inkubierenden Patientenserum oder -plasmen, welche keine Priorität besitzen, auch längere Zeit ohne negative Beeinflussung der Ergebnisse, bis zirka 40 Minuten, inkubieren können, so dass ein Notfallpatient zwischendurch schnell abgearbeitet werden kann; anschließend wird die normale Routine wieder abgearbeitet. Ebenso muß die Abarbeitung der Proben mit möglichst gleichen Basisreagenzien durchgeführt werden können, und es ist auch die einfache Versandfähigkeit der Reagenzien gewährleistet. Vorteilhaft ist also, dass das Nachweisverfahren einfach an die speziellen Gegebenheiten angepasst werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt daher, unter Vermeidung der Nachteile des Standes der Technik ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen, wie zur Blutgruppenbestimmung, Antikörper-Suchtest, Serumgegenprobe sowie zur Infektionsserologie, mit hoher Empfindlichkeit bereit, das in einfacher Weise durchführbar

- 5 -

ist und mit einem hohen Grad an Automatisierung geführt werden kann. Das Verfahren führt insbesondere in sehr kurzer Reaktionszeit zu höchst zuverlässigen Testergebnissen der Proben; möglichst auch eine automatische Abarbeitung der Proben mittels eines Automaten. Ebenso sind Notfalleingaben von Untersuchungsproben von Notfallpatienten möglich, ohne dass dadurch eine Beeinträchtigung der übrigen Proben erfolgt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine vorbestimmte Menge des inkubierten Probengemisches auf eine vorbestimmte Menge eines Gemisches eines Puffers, und zwar eines Einbettpuffers, mit Partikeln gegeben, das im folgenden als Puffer-Partikel-Gemisch, abgekürzt PP-Gemisch bezeichnet wird. Dieses PP-Gemisch befindet sich innerhalb eines Nachweisgefäßes, wobei der Einbettpuffer die Eigenschaft aufweist, den Abstand zwischen den einzelnen Partikeln innerhalb des PP-Gemisches zu minimieren. Außerdem bewirkt der Einbettpuffer, dass das PP-Gemisch eine niedrigere Viskosität aufweist, was für eine problemlose Pipettierung wesentlich ist. Anschließend wird das Nachweisgefäß einer Zentrifugation unterworfen, was zur Sichtbarmachung der Reaktion des Probengemisches im Nachweisgefäß führt, wobei das PP-Gemisch die Positivreaktion fördert.

In vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens besteht der Einbettpuffer aus einer wässrigen Lösung aus Dextran  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$  und/oder Polyethylenglycol  $[HO(C_2H_4O)_nH]$ , wobei vorteilhaft zur Herstellung sämtlicher wässrigen Lösungen Laborwasser (Aqua bidest) verwendet wird. In weiterer vorteilhafter Ausgestaltung des Verfahrens wird der wässrigen Lösung aus Dextran  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$  und/oder Polyethylenglycol  $[HO(C_2H_4O)_nH]$  Glycin  $(H_2NCH_2COOH)$  und/oder Trisodiumcitrat  $(C_6H_5O_7Na_3)$  zugegeben.

In bevorzugter Ausgestaltung des Verfahrens wird für den Einbettpuffer ein hochmolekulares Dextran verwendet. Das Dextran weist ein Molgewicht ungefähr von 100 bis 40.000.000 g/Mol, vorzugsweise von 2.000.000 ( $2 \cdot 10^6$ ) g/Mol, auf und liegt in einem Bereich zwischen 0,1 g/l bis 500 g/l, vorzugsweise 5 g/l bis 40 g/l, noch bevorzugter von 18 g/l bis 22 g/l und insbesondere von 20 g/l, im Einbettpuffer vor.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens weist das Polyethylenglycol ein Molgewicht ungefähr von 50 bis 40.000 g/Mol, vorzugsweise 3500-4500 g/Mol, auf und liegt in einem Bereich zwischen 1 g/l bis 100 g/l, bevorzugt zwischen 10 g/l bis 70 g/l, noch bevorzugter von 35 g/l bis 45 g/l und insbesondere 40 g/l im Einbettpuffer vor.

- 6 -

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens liegt das Glycocol (Glycin) in einem Bereich zwischen 1 g/l bis 100 g/l, bevorzugt 10 g/l bis 25 g/l, noch bevorzugter von 16 g/l bis 20 g/l und insbesondere 18,0168 g/l, im Einbettpuffer vor.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens liegt das Trisodiumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3$ ) in einem Bereich zwischen 0,01 g/l bis 10 g/l, bevorzugt 1 g/l bis 5 g/l, noch bevorzugter von 2 g/l bis 3 g/l und insbesondere 2,581 g/l, im Einbettpuffer vor. Bei dem Trinatriumcitrat kann das Dihydrat eingesetzt werden. Die obigen Mengenangaben beziehen sich auf die wasserfreie Form. Wenn hydratisierte Formen eingesetzt werden, erhöhen sich die Mengen entsprechend.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens kann sich, in allen Varianten, der Einbettpuffer in einem pH-Bereich von 4 bis 9, bevorzugt von 6,9 bis 7,1, befinden.

Bevorzugt wird zur Haltbarmachung dem PP-Gemisch Natriumazid ( $NaN_3$ ) zugefügt, welches in einem Bereich zwischen 0,01g/ Liter bis 10 g/l, bevorzugt zwischen 0,5 g/l bis 2 g/l, insbesondere 1 g/l (entspricht 0,1%) vorliegt. Dem Einbettpuffer wird vorzugsweise zur Haltbarmachung ein antibakterielles und/oder antivirales Mittel, wie Natriumazid ( $NaN_3$ ) oder Antibiotika, zugesetzt. Dadurch ist der Einbettpuffer lange haltbar und stabil, zum Beispiel 1 Jahr. Der Puffer ist bei Zimmertemperatur lagerfähig, vorzugsweise sollte er für längere Lagerzeiten bei Kühlschranktemperaturen gelagert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein Einbettpuffer folgendermaßen hergestellt:

Zunächst werden 0,24 M (18,0168 g/l) Glycin und 0,01 M (2,581 g/l) Trisodiumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3$ ) mit  $H_2O$  Bidest auf 1 Liter aufgefüllt. Dabei ergibt sich ein pH-Wert zwischen 6,9 und 7,1. Zu dieser Pufferlösung werden dann 20 g Dextran (2,0%) mit einem Molekulargewicht von  $2 \times 10^6$  hinzugegeben und durch Rühren gelöst. Weiterhin werden 40 g/l (4%) Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von etwa 4000 (PEG 4000) sowie 1 g Natriumazid (0,1%) gelöst. Anschließend wird ein pH-Wert von 7,1 eingestellt.

In bevorzugter Ausgestaltung des Verfahrens werden als Partikel innerhalb des Puffer-Partikel-Gemisches Beads verwendet. Vorzugsweise werden als Beads Acryl, Gelatine, Polyacrylamide, Solid nets, Silica, Ficoll, Percoll, Phtalate-Ester, Agarose oder Dextran-Gel verwendet. Die Partikel, vorzugsweise die Beads, weisen einen Durchmesser zwischen 1  $\mu m$  bis 300  $\mu m$ , vorzugsweise einen Beads-Trockendurchmesser zwischen 1  $\mu m$  bis 300  $\mu m$ , auf. In einer bevorzugten Ausgestaltung hat sich die Verwendung des Dextran-Gels SEPHADEX G-50 superfine, insbesondere zwischen 20  $\mu m$  bis 50  $\mu m$  zur

- 7 -

Herstellung des PP-Gemisches als vorteilhaft erwiesen. Auch SEPHADEX-Beads zwischen 20  $\mu\text{m}$  bis 300  $\mu\text{m}$  sind geeignet und können verwendet werden. Es hat sich gezeigt, dass Beads, welche eine Fraktionierung des Dextrans vornehmen können, am besten geeignet sind.

Ein SEPHADEX G-50, nämlich SEPHADEX G-50-50 superfine, besitzt einen Fraktionsrange von Dextran zwischen 500 und 10.000 MWt (Molekulargewicht), und Globularproteine von 1.500 bis 30.000 MWt. Zum Aufschwemmen (Swelling) der Beads wird bei SEPHADEX G-50-50 superfine 9-11 ml/g Beads Flüssigkeit benötigt. Je weniger Flüssigkeit zum Aufschwemmen der Beads benötigt wird, um so größer wird die benötigte Grundzentrifugation. Zum Beispiel wird bei der Verwendung von SEPHADEX G-25-50 superfine mit Globular-Protein 1.000-5.000 MWt, Dextrans: 100 bis 5.000 MWt sowie zum Aufschwemmen der Beads 4-6ml/g Beads, eine höhere Gravitation bei gleichbleibender Zentrifugationszeit, zum Beispiel 2 Minuten, benötigt, wobei die Beadsgröße unverändert ist, nämlich 20  $\mu\text{m}$  bis 50  $\mu\text{m}$  beträgt. Mitentscheidend ist somit die Swellingzahl der Beads, die Fraktionsrange der Proteine und Dextrans (angegeben in Molgewicht MWt). Wenn die Swellingzahl sowie die Fraktionsrange größer gewählt werden, zum Beispiel Dextran-Gel SEPHADEX G-100-50 superfine gewählt wird, wird bei gewünschter gleichbleibender Zentrifugationszeit eine geringere Gravitation benötigt. Das bedeutet, dass bei geringer werdendem Fraktionsrange des Dextrans oder der Globularproteine die g-Zahl der Zentrifugation bei gleichbleibender Zentrifugationszeit erhöht wird und umgekehrt.

Wenn also aus dem Einbettpuffer ein Partikel-Puffer-Gemisch hergestellt werden soll, werden besonders bevorzugt 0,250 g Sephadex G-50 (G-50-50) und 2,5 ml Einbettpuffer miteinander vermischt. Anschließend wird das Sephadex-Gel ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur quellen gelassen und es werden 6,5  $\mu\text{l}$  22%-ige Rinderserumalbuminlösung dazugegeben. Dieses PP-Gemisch wird dann über Nacht stehen gelassen und anschließend bei 2-8°C im Kühlschrank gelagert.

Der Einbettpuffer besitzt den Vorteil, dass bei der Verwendung von Dextran die kolloidale Lösung des Dextrans die Zwischenräume zwischen den Partikeln nach der Herstellung des Puffer-Partikel-Gemisches, PP-Gemisch, verkleinert. Diese Tatsache rührt offensichtlich von den Ketten des Dextrans her. Dadurch ist es möglich, beim Zentrifugierschritt mit einer viel höheren Gravitation (g) zu arbeiten. Und zwar kann der Zentrifugierschritt bei einer Beschleunigung von cirka 80xg bis 20.000xg während einer Zentrifugierzeit von 0,1 Minuten bis <10 Minuten, bevorzugt 1.000xg bis 4.000xg während einer bevorzugten Zentrifugierzeit zwischen 1 Minute bis 5 Minuten, insbesondere 1.900

- 8 -

bis 2.600xg bei 2 Minuten, oder besonders bevorzugt bei etwa 1.900 g für 4 Minuten durchgeführt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass das PP-Gemisch die Sichtbarmachung der Positivreaktion fördert und stabilisiert, richtet sich die Zentrifugationszeit und die Gravitation im Wesentlichen nur danach, nach welcher Zeit und bei welcher Gravitation, g-Zahl, eine negative Reaktion eindeutig nachzuweisen ist. Das bedeutet, dass in diesem Fall die g-Zahl erhöht werden kann, um die Zentrifugationszeit weiter herabzusetzen. Das ist beim Stand der Technik nicht möglich, weil zum Beispiel bei der ID-Gel-Technik ein enges Fenster an g-Zahl, 85xg, und Zentrifugationszeit, 10 Min., zwingend notwendig ist.

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass das PP-Gemisch die Positivreaktion bzw. die Sichtbarmachung der Monolayerschicht entscheidend fördert. Denn die mit IgG beladenen Erythrozyten werden unter hohem Druck bei Verwendung von kodierten Gefäßen an die mit Anti-IgG kodierte Wandung gedrückt und festgehalten. Bedingt durch das PP-Gemisch bzw. den Einbettpuffer sind die räumlichen Abstände der beteiligten Reaktionspartner bzw. Partikel sehr gering, weshalb die hohe g-Zahl benötigt wird, wodurch aber auch die Zentrifugierzeit herabgesetzt wird. Selbst bei einer g-Zahl von 2500 und einer Zentrifugierzeit von > 10 Minuten blieb die Positivreaktion des Monolayers stabil erhalten. Das heißt, bedingt durch das PP-Gemisch bzw. den Einbettpuffer, bleiben über einen großen Gravitationsbereich, die Ergebnisse praktisch unverändert.

Des Weiteren besitzt der Einbettpuffer den Vorteil, die Bindung zwischen Anti-Antikörper und Antikörper-Erythrozyten-Komplex zu fördern und zu stabilisieren, nämlich die Bindung zwischen Fab- und Fc-Teilen der Antikörper. Somit entsteht positiv ein ausgeprägter Rasen: Plastikwandung/Anti-Antikörper/Antikörper-Erythrozyten-Komplex. Das PP-Gemisch hat des Weiteren den Vorteil, dass diese Monolayerschicht stabil bleibt und festgehalten wird. Das bedeutet, dass eine erhöhte Empfindlichkeit für den Nachweis von Antikörpern gegeben ist.

Ohne an eine Theorie gebunden sein zu wollen, könnten die überraschenden vorteilhaften Eigenschaften auf die unerwarteten vorteilhaften mechanischen Eigenschaften zurückzuführen sein, die durch das PP-Gemisch bewirkt werden. Es wäre möglich, dass durch die Zugabe des PP-Gemisches die Zwischenräume zwischen einzelnen Beads eingeengt werden, und dass dadurch ein überraschend guter Aufreinigungseffekt bei der Passage der Erythrozyten durch das Gel erzielt wird, weshalb beispielsweise für IgM-Antikörper keine Zusätze wie Anti-IgM-Antikörper gebraucht

- 9 -

werden. Dies bedeutet, dass der Agglutinationskomplex auch durch verhältnismäßig hohe Gravitationskräfte nicht durch die Gelstruktur hindurchzudrücken ist. Die schwächeren Agglutinate werden zwar möglicherweise der einwirkenden Gravitationskräfte bis an die Wandungen des Nachweisgefäßes hindurchgedrückt, aufgrund der räumlichen Größe und der hohen g-Zahl sind sie aber in der Wanderung langsamer als einzelne Erythrozyten.

Diese unerwarteten Vorteile haben praktische Auswirkungen bei der Durchführung des Verfahrens. Die Monolayerschicht wird schnell gebildet und ist verhältnismäßig stabil, was eine kurze Zentrifugationszeit bei hoher g-Zahl ermöglicht.

Andererseits ist die Viskosität des erfindungsgemäßen PP-Gemisches aber so niedrig, dass sich das Gemisch leicht luftblasenfrei in die Nachweisgefäße füllen lässt und sich dabei gleichmäßig verteilt.

Überraschenderweise wurde auch festgestellt, dass bei der Verwendung von kodierten Nachweisgefäßen gute Ergebnisse erzielt werden können. Die an die Nachweisgefäße gebundenen Antikörper werden durch Verwendung des erfindungsgemäßen PP-Gemisches durch die Gravitation bei der Zentrifugation nicht verbogen bzw. verschoben. Durch Zusatz geringer Mengen von Rinderserumalbumin oder Tween-20 kann dieser Effekt sogar noch gesteigert werden.

Unter dem Begriff „kodierte“ Gefäße oder Wände wird verstanden, dass an die bevorzugt verwendeten Mikrotiterplatten mit Spitzboden Antikörper gebunden werden oder Verbindungen, die Antikörper binden, wie beispielsweise Protein A. Wenn beispielsweise an die kodierten Gefäße Antikörper gebunden werden, die gegen den Fc-Teil von Antikörpern gerichtet sind, dann reagieren die an die Wand gebundenen Antikörper mit dem Fc-Teil von Antikörpern, die sich in der Lösung befinden. Dadurch werden die in der Nachweislösung befindlichen Antikörper an die Wände der Nachweisgefäße gebunden. Wenn die sich in der Nachweislösung befindlichen Antikörper an Erythrozyten gebunden haben, so wird dadurch erreicht, dass die Erythrozyten über den Antikörper und den Anti-Antikörper an die Gefäßwand gebunden werden.

Zum Beispiel hat die marktführende Standardmethode, die ID-Gel-Technik, als Referenzmethode beim Nachweis von irregulären Antikörpern, welche bekannt sind, von 95 hochtitrigen Patientenseren im Vergleich zum erfindungsgemäßen Verfahren eine Sensitivität von 87,2% gegenüber von 98% bei der Erfindung. Bei den 95 hochtitrigen

- 10 -

Patientenseren waren es folgende Antikörper: anti-D 11, -E 9, -c 2, -Cw 2, -D+C 4, -D+E 1, -C+C<sup>w</sup> 1, -E+C<sup>w</sup> 2, -c+E 4, -c+E+C<sup>w</sup> 1, -D+Fy<sup>a</sup>+C 1, -Kell+E+C<sup>w</sup> 1, -S+C<sup>w</sup> 3, -E+Jk<sup>a</sup> 2, -Jk<sup>a</sup> 3, -Kell 18, -Lu<sup>a</sup> 1, -Lu<sup>a</sup>+Le<sup>b</sup> 2, -Lu<sup>a</sup>+C 1, -Fy<sup>a</sup> 4, -Fy<sup>b</sup> 2, -Le<sup>b</sup> 1, -M 5, AIHA 4, -Fy<sup>a</sup>+E 1, -E+S-M+C<sup>w</sup>+Jk<sup>b</sup> 1, -Jk<sup>a</sup>+Kell 2, -D+Kell 1, -S+Kell+C+Fy<sup>a</sup> 1, Lu<sup>b</sup> 1, Le<sup>a</sup> 3.

Die Zahl hinter der Bezeichnung der Seren gibt die Anzahl der jeweiligen Seren an.

Die Spezifität von 104 negativen Patienten entsprach bei der ID-Gel-Technik 97%, beim Gegenstand der Erfindung 93%. Das ist deshalb plausibel, weil, je sensitiver ein Test ist, umso geringer ist dessen Spezifität. Selbstverständlich ist es möglich, durch Feineinstellung die Balance zwischen Sensitivität und Spezifität optimal bzw. im gewünschten Maß einzustellen, wie durch Feineinstellung des Dextrans durch Konzentrationsänderung oder durch dosierte Zugabe von Albumin, vorzugsweise aus Rinderserum oder durch Zugabe des Standardpuffers „Liss“.

Im Folgenden ist ein Testergebnis einer Referenzmethode des Standes der Technik gegenüber der Erfindung wiedergegeben:

Antikörper-spezifität	Referenzmethode ID-Technik 25 Min	Erfindung 7 Minuten	Erfindung 19 Minuten
	Titer	Titer	Titer
Fy <sup>a</sup>	256	256	512
Lu <sup>a</sup>	256	512	512
Kell	32	256	128
JK <sup>a</sup>	256	2048	2048
Kell	2048	8192	8192
D	4096	8192	8192
E	512	2048	8192
c	1024	2048	8192
C	1024	2048	8192

In Spalte 1 sind die Antikörperspezifitäten angegeben. Die in Spalte 1 angegebenen Antikörper-Spezifitäten stellen gängige Abkürzungen für bestimmte Antikörper dar. Die Titer der Spalte 2 geben die Werte eines Vergleichsverfahrens an. Die Titer der Spalte 3 beruhen auf einer Inkubationszeit von 5 Min und einer Zentrifugationszeit von 2 Min (insgesamt 7 Minuten) bei 2054 g; das PP-Gemisch ist durch die Zufügung von Albumin

- 11 -

fein eingestellt. Die Titer der Spalte 4 beruhen auf einer Inkubationszeit von 15 Min und einer Zentrifugationszeit von 4 Min (insgesamt 19 Minuten) bei 2054 g; das PP-Gemisch lag in der erfindungsgemäßen Grundeinstellung mit Dextran ohne Albumin vor.

Für die Interpretation der Testergebnisse bedeutet ein höherer Titerwert, dass das Testverfahren empfindlicher ist, weil der Nachweis noch bei einer höheren Verdünnung möglich war. Beispielhaft kann dies erläutert werden an den Antikörper-Spezifitäten c bzw. C. Bei der Referenzmethode nach dem Stand der Technik war ein Nachweis noch möglich bei einem Titer von 1:1024. Bei einer Inkubationsdauer von 5 Minuten und 2-minütiger Zentrifugation (Spalte 3) war eine positive Reaktion noch nachweisbar bei einem Titer von 1:2048, d.h. das erfindungsgemäße Verfahren ist doppelt so empfindlich wie die Referenzmethode. Bei einer Inkubation von 15 Minuten (Spalte 4) war ein Nachweis noch möglich bei einem Titer von 1:8192, d.h. das erfindungsgemäße Verfahren ist 8 mal so empfindlich wie die Referenzmethode.

Zur Absicherung der Sensitivität wurden in einem weiteren Beispiel weitere 58 Patientenplasmen mit bekannten klinisch signifikanten Antikörper mit einen sehr niedrigen Titer untersucht. Es waren folgende Antikörper: anti-Lu<sup>a</sup>+C<sup>w</sup> 1, -C 2, -E 7, -D 3, -P<sub>1</sub>2, -C<sup>w</sup> 3, -S 3, -Fy<sup>a</sup>+C 1, -M+Jk<sup>a</sup> 1, -Lu<sup>a</sup> 12, -C+Kell 1, -M 5, -Le<sup>a</sup> 1, -Kell 7, -Jk<sup>a</sup> 2, -Fy<sup>a</sup> 4, -Le<sup>a</sup>+le<sup>b</sup> 1, -Jk<sup>b</sup>+M 1 und -E+c 1. Die marktführende Standardmethode, die ID-Gel-Technik, hatte eine Sensitivität von 35%. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren war die Sensitivität bei 5 Minuten Inkubation und 4 Minuten Zentrifugierzeit 48%, bei 10 Minuten Inkubation 4 Minuten Zentrifugierzeit 48%, und 15 Minuten Inkubation und 4 Minuten Zentrifugierzeit 76%. Dies zeigt, dass bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine höhere Sensitivität als bei der Referenzmethode erreicht werden kann. Bei 15 Minuten Inkubationszeit hatten die im Titer sehr niedrigen Antikörper Zeit zu binden und kamen somit über der Nachweisgrenze des neuen Verfahrens. Dieses Beispiel zeigt, dass die Sensitivität deutlich höher liegt als die der Referenzmethode.

In einem weiteren Beispiel wurden 101 Patienten mit bekannter Blutgruppe auf ABO, Rh und Serumgegenprobe untersucht. Die Übereinstimmung war 100%.

Als Ergebnis aus diesen Tests ist hinsichtlich der Erfindung zu entnehmen, dass, entgegen dem Stand der Technik in der EP 0849595B1, sich bei der Erfindung die Sensitivität mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit bzw. größer werdendem g und somit verkürzter Zentrifugationszeit nicht verringert. Ebenso liegt auch bei abgekürzter Inkubationszeit die Sensitivität immer noch wesentlich über derjenigen der

- 12 -

Referenzmethode. Bei der Benutzung einer Zentrifugation von 2.500xg bei 2 Min Zentrifugationszeit sind die Ergebnisse völlig vergleichbar.

Aufgrund der durch den Einbettpuffer bedingten sehr geringen Abstände der Partikel voneinander sind beim Nachweis von irregulären IgM-Antikörpern keine Zusätze von Anti-IgM jeglicher Art notwendig, so dass weder eine Kodierung der Gefäßwandung, noch eine solche der Partikel, Beads, oder als Einmischung mit Anti-IgM erforderlich ist; die räumliche Struktur von Ery/IgM/Ery-Komplex ist zu groß, so dass der Komplex bei der Zentrifugation entweder auf dem PP-Gemisch verbleibt oder im PP-Gemisch oder zwischen PP-Gemisch und Wandung stecken bleibt.

Gleiches gilt, wenn keine kodierten Gefäße verwendet werden, sondern entweder die Partikel, Beads, kodiert sind oder die Fänger-Antikörper direkt dem PP-Gemisch zugegeben werden.

In weiterer Ausgestaltung des Verfahrens wird ein PP-Gemisch verwendet, welches eine derart geringe Viskosität aufweist, dass das PP-Gemisch in flüssiger oder pastöser Form vorliegt, welche gegenüber dem Stand der Technik die Pipettierung des PP-Gemisches mittels Stepper oder Pipette in das Nachweisgefäß gestattet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das PP-Gemisch kurz vor der Untersuchung in das Nachweisgefäß pipettiert. Dies stellt einen weiteren Vorteil gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Lösungen dar. Die aus dem Stand der Technik bekannten Standardgele sind hochviskos und lassen sich daher nur schlecht in Platten oder Säulen einfüllen. Außerdem tritt hierbei häufig das Problem der Bildung von Luftblasen innerhalb des Gemisches auf. Luftblasen in Gelen haben aber eine Störwirkung auf die Wanderung der nachzuweisenden Lösung durch das Gel. Dieser Nachteil wird durch die erfindungsgemäße Lösung vermieden.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen, wie zur Blutgruppenbestimmung, Antikörper-Suchtest, Serumgegenprobe sowie zur Infektionsserologie, in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei die Antigene bzw. die Antikörper oder die spezifischen Bindungspartner in der Testflüssigkeit ungebunden und/oder an einen Träger gebunden sind und das dergestalt hergestellte Probengemisch einem Inkubationsschritt ausgesetzt wird, wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus nachzuweisenden Antigenen bzw. Antikörpern bzw. den spezifischen Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch als Sedimentationsbild

- 13 -

detektierbar ist, besteht dasselbe darin, dass eine vorbestimmte Menge des inkubierten Probengemisches auf eine vorbestimmte Menge eines Gemisches eines Puffers, Einbettpuffer, mit Partikeln, Puffer-Partikel-Gemisch, abgekürzt PP-Gemisch, welches sich innerhalb eines Nachweisgefäßes befindet, zugegeben wird. Dabei weist der Einbettpuffer die Eigenschaft auf, den Abstand zwischen den einzelnen Partikeln innerhalb des PP-Gemisches zu minimieren. Anschließend wird das Nachweisgefäß einer Zentrifugation unterworfen zur Sichtbarmachung der Reaktion des Probengemisches im Nachweisgefäß, wobei das PP-Gemisch die Positivreaktion fördert. Der Einbettpuffer wird aus einer wässrigen Lösung aus Dextran  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$  und/oder Polyethylenglycol  $[HO(C_2H_4O)_nH]$  hergestellt, wobei dem Einbettpuffer Glycocol (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>COOH) (Glycin) und/oder Trisodiumcitrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>) zugegeben werden kann. Als Partikel werden in den Einbettpuffer Beads gegeben, welche bevorzugt Dextran-Gel SEPHADEX G-50 superfine mit einem Trockendurchmesser von 20 µm bis 50 µm sind, wobei anschließend zur Sichtbarmachung einer Reaktion der Zentrifugierschritt bevorzugt bei einer Beschleunigung von 1900 bis 2.600xg bei zirka 2 Minuten Zentrifugierzeit durchgeführt wird.

Das Probengemisch wird zuerst einem Inkubationsschritt unterworfen, welcher bevorzugt in einem Inkubator durchgeführt wird und zwischen einer Minute und 40 Minuten dauert, wobei während der Inkubation eine Zwangsdurchmischung der Testflüssigkeit erfolgt. Eine permanente Zwangsdurchmischung ist in der Immunhämatologie nicht Stand der Technik. Diese Zwangsdurchmischung wird bevorzugt durch Schütteln oder Rühren der Testflüssigkeit erzielt. Die Zwangsdurchmischung verkürzt die Inkubationszeit und beschleunigt dadurch die Reaktionszeit der Antigen-Antikörperreaktion wie auch die Zwangsdurchmischung die Empfindlichkeit des Verfahrens erhöht. Beim Antikörpersuchtest hat sich vorzugsweise eine Inkubationszeit von 5 bis 7 Min, bei der Blutgruppenbestimmung eine solche von 1 bis 5 Min und bei der Serumgegenprobe eine solche von 2 bis 3 Min als vorteilhaft erwiesen. Damit bietet sich eine Standardisierungszeit von 5 Min an, so dass Blutgruppenbestimmung, Antikörpersuchtest und Serumgegenprobe mit demselben PP-Gemisch und ein und derselben Gravitationszahl sowie gleicher Zentrifugationszeit wie auch mit ein und demselben Gefäß, zum Beispiel Mikrotiterplatten, durchgeführt werden können.

Zur Durchführung des Inkubationsschrittes sowie der Zwangsdurchmischung kann dem Probengemisch bzw. den Erythrozyten Liss und/oder modifiziertes Liss zugesetzt werden. Hierbei kann Liss ohne oder modifiziert mit Rinderalbumin verwendet werden. Es wird folgendes Liss auf der Basis von Laborwasser (H<sub>2</sub>O Bidest) bevorzugt verwendet:

- 14 -

Natriumchlorid, bevorzugt 1,788 g/l

Dinatriumhydrogenphosphat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , bevorzugt 0,204 g/l

Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , bevorzugt 0,233 g/l

Glycin  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$  bevorzugt 18 g/l

Thymerosal  $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgO}_2\text{SNA}$  bevorzugt 0,20 g/l (Konservierungsmittel)

ergibt Liss mit 0,03 Mol bei einem pH-Wert von zirka 6,7.

Von diesem Liss-Puffer werden zum Beispiel 4 ml plus 0,5 ml Laborwasser plus 0,5 ml 22%-tiges Rinderalbumin genommen und ergeben modifiziertes Liss. Der pH-Wert beträgt etwa 7,1.

In einer weiteren Ausgestaltung des Verfahren wird zur Feineinstellung der Reaktion dem PP-Gemisch Albumin, wie Rinderserumalbumin, zugegeben wie auch gleichzeitig oder unabhängig davon die Dextrankonzentration entsprechend angepaßt werden kann. In der vorangegangenen Tabelle ist zum Beispiel in Spalte 3 eine Feineinstellung des PP-Gemisches über Rinderalbumin erfolgt.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden bei der Anwendung derselben auf die Infektionsserologie statt Erythrozyten als vorgegebene spezifische Bindungspartner mit Proteinen kodierte, eingefärbte Beads verwendet, welche ungefähr das spezifische Gewicht der Erythrozyten aufweisen. Hierzu werden vorteilhaft Standardpartikel - auch im Gegensatz zum Stand der Technik der EP 0849595B1 - mit einem Durchmesser von 3  $\mu\text{m}$  bis 7,5  $\mu\text{m}$  benutzt, welche in vorteilhafter Weise eingefärbt worden sind. Anschließend wird dieses Reaktionsgemisch, welches den zu bestimmenden Analyten enthält, zur Sichtbarmachung der Reaktion auf das PP-Gemisch gegeben.

Bei dieser bevorzugten Ausführungsform werden die Träger (eingefärbte Beads) mit Bindungspartnern, beispielsweise Antigenen gekoppelt. Bei derartigen Antigen handelt es sich bevorzugt um Antigene, die bei der Blutanalytik eine Rolle spielen. Wenn es sich beispielsweise um ein Antigen des Hepatitis-C-Virus (HCV) handelt, kann in einem Test auch nachgewiesen werden, ob das zu untersuchende Serum Antikörper gegen diesen Erreger enthält. In diesem Fall wird ein Antikörper, der gegen HCV gerichtet ist, an das an die gefärbten Beads gekoppelte Antigen binden und wenn das Nachweisgefäß mit Anti-Antikörpern kodiert ist, bleiben die gefärbten Beads an den Wänden des Nachweisgefäßes hängen und es entsteht nach Zentrifugation nicht der Knopf in der Spitze des Nachweisgefäßes, der für eine negative Reaktion sprechen würde. Anstelle des oben beispielhaft erläuterten HCV-Antigens können auch andere Antigene an die Beads gekoppelt werden, beispielsweise Antigene von anderen Hepatitis-Viren wie Hepatitis-A oder -B oder HIV-Viren sowie beliebig anderweitige Antigene.

In einer weiteren Ausgestaltung des Verfahrens wird das Probengemisch in einem gesonderten Reaktionsgefäß zur Reaktion gebracht und anschließend das Probengemisch auf das PP-Gemisch innerhalb des Nachweisgefäßes aufgebracht, wobei das PP-Gemisch individuell je nach Bedarf während der Abarbeitung in das Nachweisgefäß befüllt werden kann und dadurch eine noch größere Flexibilität gewährleistet ist. Aufgrund der Verwendung von zwei Gefäßen, nämlich Reaktionsgefäß und Nachweisgefäß, ist eine größere Flexibilität des Verfahrens gegeben, außerdem kann die permanente Zwangsbewegung des Probengemisches durchgeführt werden. Diese Ausgestaltung ist besonders für eine automatische Abarbeitung von Proben geeignet, weil, während die erste Platte inkubiert, bei einem Notfall in diese Platte eine individuelle Nachbeschickung erfolgen kann, welche Probe anschließend nach der kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten in der zweiten Platte oder einem Streifen für den Zentrifugenschritt weiter bearbeitet werden kann, hingegen die auf die übrigen Proben der ersten Platte einwirkende verlängerte Inkubationszeit keine negativen Auswirkungen auf die nachfolgenden Ergebnisse hat.

Selbstverständlich ist es ebenso möglich, bei der Verwendung von kodierten Gefäßen das Probengemisch vor der Inkubation direkt auf das im Gefäß befindliche PP-Gemisch zu geben; hierbei findet eine Zwangsbewegung des Probengemisches nicht statt. Die für die Durchführung des Verfahrens verwendeten Nachweisgefäße zur Aufnahme des PP-Gemisches sind bevorzugt Spitzbodengefäße.

Für den Antikörpersuchtest mittels des PP-Gemisches hat sich als vorteilhaft herausgestellt, wenn die Innenwandungen der Nachweisgefäße mit Proteinen kodiert sind, insbesondere mit Anti-IgG, Anti-IgA, Anti-IgM, Protein A, Protein G oder Anti-C3d und/oder mit einer Mischung derselben. Der in bekannter Weise bei positiver Reaktion entstehende Rasen ist erfindungsgemäß äußerst stabil, die Reaktion ist äußerst sensitiv. Außerdem hat sich gezeigt, dass derartig präparierte Platten vakuumverpackt oder unter Schutzgas verpackt in einfachster Weise zu versenden und im Kühlschrank lange Zeit zu lagern sind.

In weiterer bevorzugter Ausgestaltung des Verfahrens hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Fangproteine, zum Beispiel Anti-IgG, stabilisiert werden. Zur Stabilisierung der an den Innenwandungen der Nachweisgefäße befindlichen Proteine werden Stabilisierungssubstanzen verwendet, wie Triton X-100 oder Albumin oder Casein oder Gelatine oder Tween 20 oder Mischungen derselben innerhalb eines Puffers. Diese bekannten Puffer mit den genannten Substanzen, welche in der ELISA-Technik zum

- 16 -

Blocken von unspezifischen Reaktionen (falsch positiv oder erhöhter Background) verwendet werden, dienen hier zur mechanischen Stabilisierung der Proteine und somit zur Sichtbarmachung der positiven Reaktion. Eine Erklärung ist, dass die Stabilisierungssubstanzen die Fangproteine einhüllend umgeben, so dass die Fangproteine bei der hohen Zentrifugationszahl mechanisch nicht weggebogen oder verschoben werden können. Diese Stabilisierung kann entweder sofort nach der Kodierung oder erst vor der Verwendung der kodierten Gefäße durchgeführt werden. Hierzu hat sich gezeigt, dass, wenn keine Stabilisierung der Fangproteine stattfindet, bei Durchführung des Verfahrens keine vernünftige positive Reaktion nachzuweisen ist, obwohl eine derartige Reaktion aufgrund der Versuchsbedingungen zu erwarten gewesen wäre.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des Verfahren ist das gesonderte Reaktionsgefäß zur Reaktion des Probengemisches während der Inkubation mit einer Membran nach unten verschlossen, wobei Reaktionsgefäß und Nachweisgefäß, in welchem sich das PP-Gemisch befindet, ineinander bzw. aufeinanderfügbar sind und zur Sichtbarmachung der Reaktion das Reaktionsgefäß in bzw. auf das Nachweisgefäß gefügt wird und beide gemeinsam zentrifugiert werden, wobei während der Zentrifugation der beiden Gefäße die Membran des Reaktionsgefäßes wenigstens teilweise für das Probengemisch durchlässig wird und dieses in das Nachweisgefäß eintritt.

Diese Ausgestaltung unter Verwendung einer Membran, welche den Boden des Reaktionsgefäßes bildet, ist insbesondere vorteilhaft für eine manuelle Abarbeitung von Proben. Denn bei einer manuellen Abarbeitung der Proben entfällt der Pipettierschritt zum Einpipettieren des Reaktionsgemisches in das Nachweisgefäß.

In einer weiteren Ausgestaltung des Verfahren sind Reaktionsgefäß und Nachweisgefäß ein und dasselbe Gefäß sowohl zur Durchführung der Inkubation und Reaktion als auch des Nachweises der Reaktion, wobei das Gefäß in zwei Teile geteilt ist und sich im unteren Teil des Gefäßes das PP-Gemisch befindet, welches durch eine Membran abgedeckt ist, und oberhalb derselben im oberen Teil sich der Reaktionsraum für die Reaktion des Probengemisches während der Inkubation befindet. Während der nachfolgenden Zentrifugation des Gefäßes wird die Membran wenigstens teilweise für das Probengemisch durchlässig. Diese Ausgestaltung hat die allgemeinen Vorteile, dass das verwendete Gel oder PP-Gemisch in das Gefäß schon eingefüllt sein kann und durch die Membran zuerst einmal sicher verschlossen ist. Der weitere Vorteil besteht darin, dass nunmehr mit ein und demselben Gefäß der Inkubationsschritt mit der Zwangsbewegung des Probengemisches durchgeführt werden kann.

- 17 -

Bei dieser Ausgestaltung eines Probengefäßes mit einer Membran kann das Gefäß praktisch beliebig geformt sein, zum Beispiel eine Spitzboden- oder Rundboden-oder Flachboden-Mikrotiterplatte oder eine Säule sein. Eine Spitzboden- oder Rundboden-Mikrotiterplatte oder Streifen wird von oben oder unten ausgewertet; eine Säule oder Flachbodenplatte oder Streifen wird seitlich ausgewertet.

Die Anwendung einer Membran kann ebenso auf beliebige Partikel-Tests, zum Beispiel Gel-Tests, angewendet werden. Ein derartiges Behältnis zur Durchführung eines Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen, wie zur Blutgruppenbestimmung, Antikörper-Suchtest, Serumgegenprobe sowie zur Infektionsserologie, in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei die Antigene bzw. die Antikörper oder die spezifischen Bindungspartner in der Testflüssigkeit ungebunden und/oder an einen Träger gebunden sind und das dergestalt hergestellte Probengemisch einem Inkubationsschritt ausgesetzt wird, wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus nachzuweisenden Antigenen bzw. Antikörpern bzw. den spezifischen Bindungspartnern und den Trägern gebildet wird, welches optisch als Sedimentationsbild detektierbar ist, ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Behältnis, welches ein Rundboden- oder Spitzboden- oder Flachbodengefäß oder eine Säule ist, durch eine Membran in zwei Kammern getrennt ist, nämlich in eine obere und eine untere Kammer, wobei die Membran die in der unteren Kammer befindliche Nachweisschicht, zum Beispiel ein Gel, zur optischen Sichtbarmachung einer stattgefundenen Reaktion abdeckt und die obere Kammer den Reaktionsraum für die Aufnahme und Reaktion des Probengemisches darstellt, wobei durch einen Zentrifugationsschritt die Membran wenigstens teilweise durchlässig wird und dadurch das Probengemisch vom Reaktionsraum in den Nachweisraum gelangt.

Im allgemeinen Fall kann das Behältnis auch aus zwei gesonderten Gefäßen bestehen, wobei das erste Gefäß nach unten durch die Membran verschlossen ist und zur Aufnahme des Probengemisches und Durchführung gegebenenfalls einer Inkubation und der Reaktion dient, und das zweite Gefäß die Nachweisschicht, zum Beispiel ein Gel, enthält und zur Sichtbarmachung der Reaktion dient und die beiden Gefäße ineinander bzw. aufeinander fügbar sind und beide Gefäße gemeinsam zentrifugiert werden, wobei während der Zentrifugation der beiden Gefäße die Membran des Reaktionsgefäßes wenigstens teilweise für das Probengemisch durchlässig wird und dieses dadurch in das Nachweisgefäß eintritt. In beiden Fällen kann natürlich eine Zwangsbewegung des Probengemisches während der Inkubation erfolgen.

Die Membran kann aus Kunststoff oder Kautschuk oder aus einer Gummimischung bestehen oder ein Latex oder ein Gel sein.

Beispiele zur Durchführung des Verfahrens sind nachfolgend beschrieben. In der Zeichnung zeigen:

- Figur 1 ein V-Boden-Gefäß, beispielsweise in einer Mikrotiterplatte, mit einer Membran
- Figur 2 ein Rundbodengefäß einer Mikrotiterplatte mit einer Membran
- Figur 3 ein V-Boden-Gefäß mit einem unterhalb einer Membran befindlichen Stachel zum Durchstechen der Membran und
- Figur 4 ein V-Boden-Gefäß mit einem oberhalb einer Membran angeordneten, nach unten beweglichen Stachel zum Durchstechen der Membran.

Im nachfolgenden Beispiel wird von kodierten Gefäßen ausgegangen. Zur Verwendung kommen vorzugsweise handelsübliche V-Boden-ELISA-Platten, welche in 12- oder 8-ter Riegel unterteilt sein können. Ein Kodierungspuffer wird mit spezifischen Proteinen, wie Anti- Antikörper, im Verhältnis von circa 1:800 mit PbS-Puffer verdünnt und eine Lösung hergestellt. In ein jedes Gefäß werden von der genannten Lösung circa 50  $\mu$ l einpipetiert. Das Gefäß wird einer Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur unterworfen. Die Lösung bzw. restliche Lösung aus Kodierpuffer und spezifischen Proteinen wird entfernt. Ein mehrmaliger Waschschriff ist nicht erforderlich. Es wird dann von einem PbS-Puffer, welcher eine zirka 1%tige Rinderserumalbuminlösung enthält, 200  $\mu$ l in jedes Gefäß hinzugefügt. Dieser letzte Schritt mit Rinderserumalbumin ist auch förderlich für die unkodierten V-Bodenplatten zur Untersuchung der Blutgruppen. Denn eine Beschichtung mit Proteinen ist allgemein förderlich für die Adhäsion. Das heißt, bei Befüllung mit dem PP-Gemisch verteilt sich das PP-Gemisch gleichmäßig über die Bodenwandung der Mikrotiterplatte und somit ist die Platte besser befüllbar.

Das Gefäß wird während 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, wonach zum Beispiel ein Auswaschen des Gefäßes mittels eines Waschpuffers erfolgt, in welchem bevorzugt Tween 20 und Rinderalbumin enthalten sind. Das Gefäß ist nunmehr als kodiertes Gefäß fertig präpariert und steht zur weiteren Verwendung als Nachweisgefäß zur Verfügung. Diese sind nach einer Vakuum- oder Schutzgasverpackung sehr lange haltbar. Mit einer dergestalt kodierten Platte kann ein Arbeitsablauf für einen Antikörper-Suchtest, zum Beispiel Antikörper-Suchzellen von 1, 2 und 3, wie folgt durchgeführt werden:

In gesonderte Reaktionsgefäße, welche unbehandelte, handelsübliche V-Bodengefäße, Mikrotiterplatten, sein können, werden 3 mal 25  $\mu$ l Serum oder Plasma plus 50  $\mu$ l Suchzellensuspension 1,2,3 zu 0,3%±0,1% eingegeben, wobei die Arbeitsverdünnung mit modifiziertem Liss-Puffer erfolgt. Die Suchzellensuspension kann aus einer handelsüblichen 3%+/-1% Stamm-Suchzellensuspension nach Bedarf hergestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass diese Suchzellen sehr gut in ihren speziellen Puffer lange haltbar sind, was in Liss problematisch sein kann, und diese aufgrund der höheren Suchzellenanteile leichter großtechnisch herstellbar sind. Zum Beispiel kann in einer extra Mikrotiterplatte (oder Röhrchen bei einer größeren Serie) 270  $\mu$ l mod. Liss plus 30  $\mu$ l Stamm-Suchzellsuspension gegeben werden.

Die Gefäße werden bei circa 37° C und gleichzeitig bei einer Schüttelfrequenz zwischen 700±25 UpM während 5 Minuten inkubiert und ein Probengemisch erzeugt. Während der Inkubation wird das Puffer-Gel-Gemisch mittels eines Steppers von 50  $\mu$ l in die Nachweisgefäße einpipetiert; danach werden jeweils 50  $\mu$ l des Probengemisches auf das PP-Gemisch in den Nachweisgefäßen einpipetiert. Die Nachweisgefäße werden einem Zentrifugierschritt während circa 2 Minuten bei circa 2054g unterworfen. Anschließend wird das Reaktionsergebnis innerhalb der Nachweisgefäße optisch ausgewertet entweder visuell oder automatisch. Eine positive Reaktion zeigt sich als Monolayer, Rasen, eine negative als Knopf. Bei der Knopfbildung sammeln sich die nicht aggregierten Erythrozyten am tiefsten Punkt der Vertiefung in der Mikrotiterplatte. Da es sich um eine Mikrotiterplatte handelt, wird das Ergebnis entweder durch Aufsicht von oben oder unten abgelesen.

Die mit Anti-IgG kodierte Platte zeigt einmal IgG-Antikörper und aufgrund des PP-Gemisches gleichzeitig auch eventuell vorhandene IgM-Antikörper an. Bei einer positiven Reaktion kann eine selektive Unterscheidung, ob IgG- und/oder IgM-Antikörper vorliegen, folgendermaßen vorgenommen werden, indem eine zweite, unkodierte Platte mit PP-Gemisch benutzt und der Test nochmals durchgeführt wird. Wird eine negative Reaktion mit der zweiten Platte erhalten, dann liegt ein IgG-Antikörper vor. Erscheint eine positive Reaktion gleich der kodierten Platte, dann liegt ein IgM-Antikörper vor.

Wenn die Reaktion in der zweiten Platte gegenüber derjenigen in der ersten Platte schwächer ausfällt, dann liegt eine Mischform von IgG- und IgM-Antikörper vor. Ebenso wird keine Kodierung von Anti-C3d benötigt, da der Nachweis so empfindlich ist, dass die wenigen von Komplement abhängigen IgG-Antikörper, welche das Antigen C3d auf dem Erythrozyten bilden, zum Nachweis ausreichen. Falls keine IgM-Antikörper wegen

- 20 -

eventueller unspezifischer Reaktionen gewünscht werden, können reduzierende, bekannte Agenzien, zum Beispiel Natriumdithionit, zur Reduktion bzw. Herabsetzung der IgM-Antikörper genommen werden.

Beispielsweise werden zur AB0-RH-Bestimmung sowie zusätzlich zur Durchführung der Serumgegenprobe wiederum eine unbehandelte oder mit Rinderalbumin behandelte Mikrotiterplatte als Reaktionsgefäß verwendet. In diese werden:

- a) 50  $\mu$ l AntiA (Biotest Clone: A003 IgM) einer mittels Liss-Puffer oder mit isotonischem NaCl hergestellten Lösung von 1:100
- 50  $\mu$ l AntiB (Biotest Clone: B005 IgM) einer mittels Liss-Puffer oder mit isotonischem NaCl hergestellten Lösung von 1:100
- 50  $\mu$ l AntiD (Immucor, Clone : RUM-1 IgM) einer mittels Liss-Puffer oder mit isotonischem NaCl hergestellten Lösung von 1:30
- 50  $\mu$ l RH mono-Control einer mittels Liss-Puffer oder mit isotonischem NaCl hergestellten Lösung 1:30 einpipetiert,
- b) es werden jeweils 25  $\mu$ l einer 0,6 $\pm$ 0,2%igen Erythrozyten-Patientensuspension, in welcher Liss-Puffer oder isotonisches NaCl enthalten ist, auf die vorgenannt beschickten vier Gefäße aufpipetiert (das ist für die AB0-RH-erythrozytenseite Bestimmung notwendig)
- c) es wird 4mal 50  $\mu$ l Plasma (Serumgegenprobe) in weitere vier Reaktionsgefäße einpipetiert,
- d) es werden jeweils 25  $\mu$ l einer 0,6 $\pm$ 0,2%igen Suspension, in welcher Liss-Puffer enthalten ist, mit A1-Zellen, A2-Zellen, B-Zellen und 0-Zellen hergestellt und in die Reaktionsgefäße einpipetiert.

Die Iso-Suchzellen können aus einer handelsüblichen 3% $\pm$ 1% Stamm-Zellensuspension nach Bedarf hergestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass diese Iso-Suchzellen gut in ihren speziellen Puffer haltbar sind, was in Liss problematisch sein kann, und diese aufgrund der höheren Suchzellenanteile leichter großtechnisch herstellbar sind. Zum Beispiel kann in einer extra Mikrotiterplatte (oder Röhrchen bei einer größeren Serie) 240  $\mu$ l mod. Liss plus 60  $\mu$ l Stamm-Zellsuspension genommen werden;

- e) die Probenmischungen werden während circa 2 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur zwischen 18 bis 25 Grad Celsius und gleichzeitig bei einer Schüttelfrequenz zwischen 700  $\pm$ 25 UpM inkubiert,
- f) in acht unbehandelte oder mit Albumin behandelte, unkodierte Nachweisgefäße werden 8mal jeweils 25  $\mu$ l PP-Gemisch mittels eines Steppers einpipetiert,

- 21 -

g) nunmehr werden je 50  $\mu$ l der Probenmischungen in die Nachweisgefäße auf das PP-Gemisch einpipetiert,

h) die Nachweisgefäße werden einem Zentrifugierschritt während circa 2 Minuten bei circa 2054g unterworfen und die Reaktionsergebnisse visuell oder automatisch ausgewertet. Eine negative Reaktion zeigt sich als Knopf; eine positive Reaktion zeigt sich entweder auf oder innerhalb des PP-Gemisches, was aber den Eindruck eines Rasens erweckt. Da es sich um eine Mikrotiterplatte handelt, wird das Ergebnis entweder durch Aufsicht von oben oder unten abgelesen.

Ein Testkit besteht zum Beispiel aus den folgenden Komponenten:

Mit Anti-IgG kodierte Platte (Nachweisplatte),

Flasche mit PP-Gemisch,

mit Albumin behandelte Blutgruppenplatte,

Flasche mit modifiziertem Liss,

3 Flaschen mit je Testzellen 1, 2, 3,

handelsübliche Reaktionsplatte,

4 Flaschen mit Iso-Zellen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, O

Ein besonderer Vorteil eines derartigen Testkits liegt in der einfachen Versandfähigkeit und in seiner Flexibilität.

In den Figuren 1 und 2 sind je ein V-Boden-Gefäß (Figur 1) und ein Rundbodengefäß (Figur 2) mit einer Membran 2 bzw. 4 gezeigt, welche an der Gefäßwandung oberhalb des V-Bodens bzw. des Rundbodens über den gesamten Querschnitt befestigt ist und das Gefäß in zwei voneinander getrennte Teile trennt. Unterhalb der Membran 2, 4 innerhalb des Gefäßes 1 bzw. 3 befindet sich das PP-Gemisch 5.

Hinsichtlich der verwendeten Membran 2, 4 sind die folgende Ausgestaltungsbeispiele gegeben. Eine Membran 2, 4 aus Latex kann durch eine vorherige Perforation, vorzugsweise mit einem Durchmesser von 6 bis 8  $\mu$ m, durchlässig gemacht werden. Da Latex sehr flexibel ist, sind diese Löcher im Ruhezustand geschlossen. Bei einer Zentrifugation von zum Beispiel 2.500xg eines Gefäßes, welches vorher mit einer Probenmischung von 50  $\mu$ l befüllt worden ist, hat diese Probenmischung ein Gewicht von zirka 125 g, welches ausreicht, die Membranöffnungen aufzuweiten und die Probenmischung bzw. die Erythrozyten passieren zu lassen.

- 22 -

Oder eine Latexmembran 2, 4 hat eine geringe Membrandicke und ist dergestalt vorgespannt, dass sie bei der Zentrifugation des Gefäßes 1, 3 schon bei einem Gewicht von einigen 10g reißt.

Die Figuren 3 und 4 zeigen zwei weitere Möglichkeiten der Ausführung. Innerhalb eines V-Boden-Gefäßes 6 ist oberhalb des V-Bodens eine Latexmembran 7 über den gesamten Querschnitt des Gefäßes 6 angeordnet und zwar vorgespannt. Unterhalb der Latexmembran 7 befindet sich - neben dem PP-Gemisch 5 - an der schrägen Wandung des V-Bodens ein Stachel 8, welcher in Richtung der Membran aufragt und bis zur Membran 7 reicht.

Der Stachel kann auch durch eine scharfe Kante gebildet sein, welche an der Wandung des V-Bodens direkt unterhalb der Membran ausgebildet ist.

Während der Zentrifugation bombiert die Membran 7 aufgrund der Fliehkraft in Richtung des Bodens des Gefäßes nach unten und dringt in den Stachel 8 ein oder drückt auf die Kante und wird so zum Reißen gebracht.

Figur 4 zeigt ein weiteres V-Boden-Gefäß 9 mit einer Membran 10, welche oberhalb des V-Bodens über den gesamten Querschnitt des Gefäßes 9 gespannt ist. Oberhalb der Membran 10 ist an der Wandung des Gefäßes 9 ein beweglicher Stachel 11 angeordnet, welcher bis zur Membran 10 reicht. Weist dieser beispielsweise ein Gewicht von 0,5 g auf, so ergibt sich bei einer Zentrifugation von 2.500xg ein Stachelgewicht von 1.250 g, so dass die Membran durchstoßen und so zum Reißen gebracht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist spezifisch und sehr sensitiv. Es ist einsetzbar für die vollständige Blutgruppenbestimmung, den Antikörpersuchtest sowie die Kreuzprobe. Es ist ein Einschrittzentrifugationsverfahren, welches keiner Waschschriffe bedarf. Eine vollständige Blutgruppenbestimmung und ein Antikörpersuchtest ist innerhalb von 7 Minuten möglich, weshalb insbesondere das Verfahren notfalltauglich ist. Aufgrund der variablen Inkubationszeiten ist das Verfahren notfalltauglich und für eine Halb- und Vollautomation sehr gut geeignet. Aufgrund der identischen Basisreagenzien, Inkubationszeiten und Zentrifugationszeiten ist die komplette Blutgruppenbestimmung mit Serumgegenprobe, Antikörpersuchtest und Kreuzprobe auf einer Mikrotiterplatte möglich. Ebenso ist es möglich, auf derselben Mikrotiterplatte Infektionsserologie, wie zum Beispiel Hepatitis B, mitabzuarbeiten.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern und/oder Antigenen in einer Testflüssigkeit durch Reaktion mit einem vorgegebenen spezifischen Bindungspartner, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind und das dergestalt hergestellte Probengemisch einem Inkubationsschritt ausgesetzt wird und anschließend durch ein Partikel-Puffer-Gemisch zentrifugiert wird, wobei bei positiver Antigen-Antikörper-Reaktion ein Agglutinat aus nachzuweisendem Antigen, Antikörper und Träger gebildet wird, welches optisch als Sedimentationsbild detektierbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass eine vorbestimmte Menge des inkubierten Probengemisches auf eine vorbestimmte Menge eines Puffer-Partikel-Gemisches, welches sich innerhalb eines Nachweisgefäßes befindet, zugegeben wird, wobei das Puffer-Partikel-Gemisch einen Einbettpuffer aufweist, der aus einer wässrigen Lösung von Dextran und/oder Polyethylenglycol sowie Glycin und/oder Trisodiumcitrat besteht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Einbettpuffer eine wässrige Lösung ist, enthaltend  
0,1 bis 500 g/l Dextran und/oder  
1 bis 100 g/l Polyethylenglycol, sowie  
1 bis 100 g/l Glycin und/oder  
0,01 bis 10 g/l Trisodiumcitrat.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Dextran ein Molgewicht von ungefähr 100 bis 40.000.000, vorzugsweise von 2.000.000 ( $2 \cdot 10^6$ ) g/Mol, aufweist und in einem Bereich von 5 g/l bis 40 g/l, vorzugsweise 20 g/l im Einbettpuffer vorliegt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polyethylenglycol ein Molgewicht von ungefähr 50 bis 40.000 g/Mol aufweist, vorzugsweise 3500-4500 g/Mol, aufweist und in einem Bereich von 10 g/l bis 70 g/l, vorzugsweise 40 g/l, im Einbettpuffer vorliegt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Glycin in einem Bereich zwischen 10 g/l bis 25 g/l, vorzugsweise 18,0168 g/l, im Einbettpuffer vorliegt.
6. Verfahren nach Anspruch 2, 3, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Trisodiumcitrat ( $C_6H_5O_7Na_3$ ) in einem Bereich zwischen 1 g/l bis 5 g/l, vorzugsweise 2,581 g/l, im Einbettpuffer vorliegt.
7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Einbettpuffer einen pH-Wert von 4 bis 9, bevorzugt von 6,9 bis 7,1, aufweist.
8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Partikel innerhalb des Puffer-Partikel-Gemisches Beads verwendet werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als Beads Acryl, Gelatine, Polyacrylamide, Solid nets, Silica, Ficoll, Percoll, Phtalate-Ester, Agarose oder Dextran-Gel verwendet werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass Beads mit einem Trockendurchmesser zwischen 1  $\mu m$ , bis 300  $\mu m$ , insbesondere SEPHADEX G-50 superfine, insbesondere 20  $\mu m$  bis 50  $\mu m$  zur Herstellung des PP-Gemisches verwendet wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Feineinstellung der Reaktion dem Partikel-Puffer-Gemisch Albumin, wie BSA, zugegeben und/oder die Dextrankonzentration entsprechend angepaßt wird.
12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Partikel-Puffer-Gemisch eine derart geringe Viskosität aufweist, dass es in flüssiger oder pastöser Form vorliegt, welche die Pipettierung des PP-Gemisches mittels Stepper oder Pipette in das Nachweisgefäß gestattet.
13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Probengemisch in einem gesonderten Reaktionsgefäß inkubiert wird und anschließend das Probengemisch auf das Partikel-Puffer-Gemisch innerhalb des Nachweisgefäßes aufgebracht wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Zwangsdurchmischung der Testflüssigkeit durch Schütteln oder Rühren erfolgt.
16. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Durchführung des Inkubationsschrittes sowie der Zwangsdurchmischung der Testflüssigkeit dieser Liss und/oder modifiziertes Liss zugesetzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zentrifugation bei einer Beschleunigung von 80xg bis 20.000xg sowie während einer Zentrifugierzeit von 0,1 Minuten bis <10 Minuten, bevorzugt 1.000xg bis 4.000xg, sowie während einer bevorzugten Zentrifugierzeit zwischen 1 Minute bis 5 Minuten, insbesondere 1900 bis 2.600xg bei 2 Minuten, durchgeführt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das gesonderte Reaktionsgefäß zur Reaktion des Probengemisches während der Inkubation mit einer Membran nach unten verschlossen ist, wobei Reaktionsgefäß und Nachweisgefäß, in welchem sich das PP-Gemisch befindet, ineinander bzw. aufeinanderfügbar sind und zur Sichtbarmachung der Reaktion das Reaktionsgefäß in bzw. auf das Nachweisgefäß gefügt wird und beide gemeinsam zentrifugiert werden, wobei während der Zentrifugation der beiden Gefäße die Membran des Reaktionsgefäßes wenigstens teilweise für das Probengemisch durchlässig wird und dieses in das Nachweisgefäß eintritt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass Reaktionsgefäß und Nachweisgefäß ein und dasselbe Gefäß sowohl zur Durchführung der Inkubation und Reaktion als auch des Nachweises der Reaktion sind, welches in zwei Teile geteilt ist, wobei im unteren Teil des Gefäßes das PP-Gemisch sich befindet, welches durch eine Membran abgedeckt ist, und oberhalb derselben im oberen Teil sich der Reaktionsraum für die Reaktion des Probengemisches während der Inkubation befindet, wobei während der nachfolgenden Zentrifugation des Gefäßes die Membran wenigstens teilweise für das Probengemisch durchlässig wird.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Membran aus Kunststoff oder Kautschuk oder Gummimischung oder Latex oder Gel besteht.
21. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisgefäße zur Aufnahme des Partikel-Puffer-Gemisches Spitzbodengefäße oder Säulen sind.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Innenwandungen des Nachweisgefäßes mit Proteinen kodiert sind, insbesondere mit Anti-IgG, Anti-IgA, Anti-IgM, Protein A, Protein G und/oder mit einer Mischung derselben.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass zur Stabilisierung der an den Innenwandungen der Nachweisgefäße befindlichen Proteine Stabilisierungssubstanzen, wie Triton X-100 oder Albumin oder Casein oder Gelatine oder Tween 20 oder mit Mischungen derselben, verwendet werden.

24. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass entweder in das Partikel-Puffer-Gemisch Proteine eingemischt oder die Beads mit Proteinen kodiert werden.

25. Verfahren nach Anspruch 24 zum Einsatz in der Infektionsserologie, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den an einen Träger gebundenen Antigenen um mit Proteinen kodierte, eingefärbte Beads handelt, die ungefähr das spezifische Gewicht von Erythrozyten aufweisen.

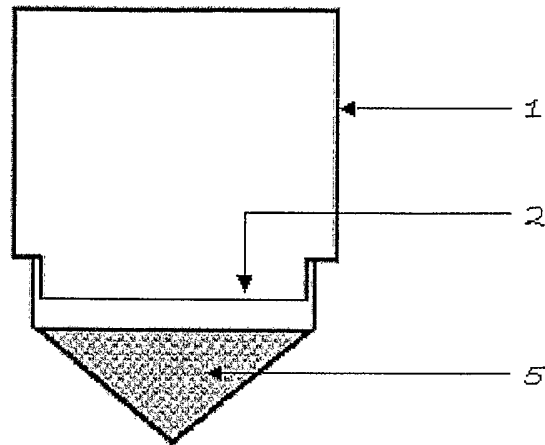


FIG 1

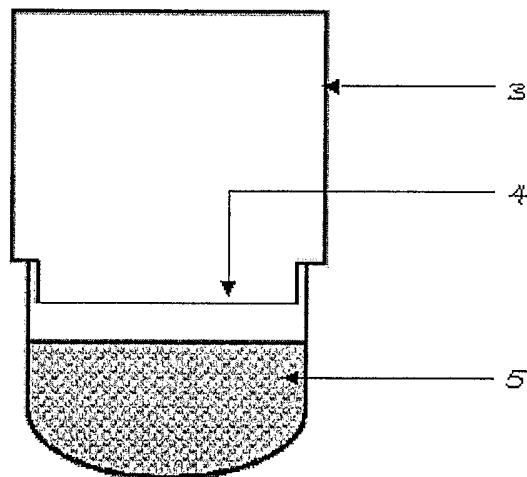


FIG 2

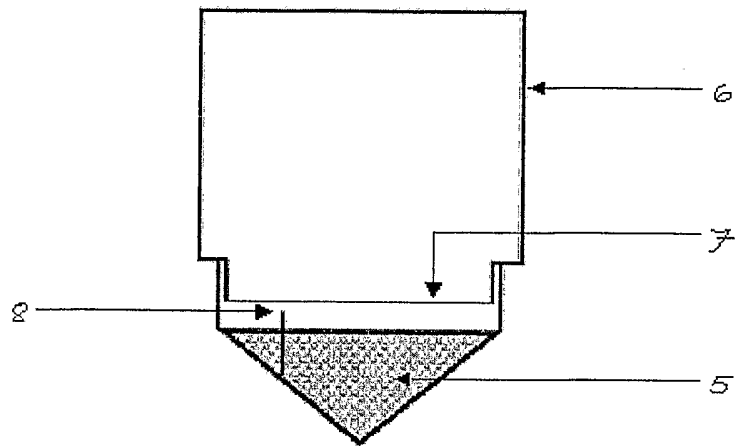


FIG. 3

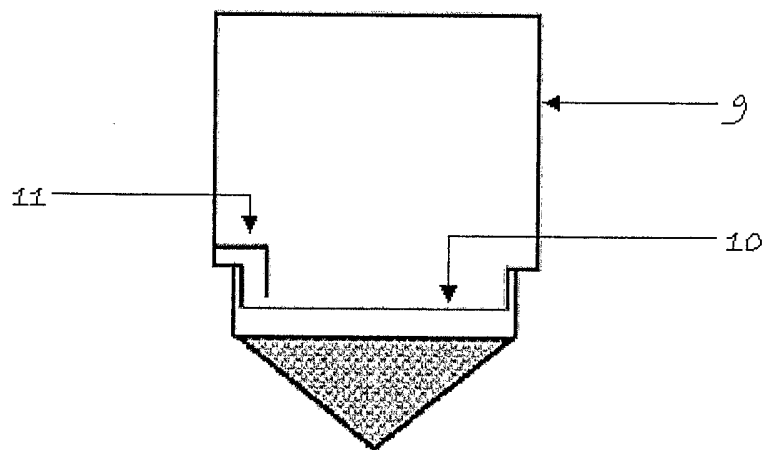


FIG. 4