



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 26 248 T3** 2008.01.24

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 466 914 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 26 248.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US91/00896**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 904 867.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1991/012336**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.02.1991**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **22.08.1991**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.01.1992**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **28.05.1997**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **06.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.01.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/551** (2006.01)

**G01N 33/546** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**476788**      **08.02.1990**      **US**

(73) Patentinhaber:  
**Pacific Biotech Inc., San Diego, Calif., US**

(74) Vertreter:  
**Hofer, Schmitz, Weber, 82031 Grünwald**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:  
**FAN, Eugene, La Jolla, CA 92037, US; WANG, Dou-Mei, Encinitas, CA 92024, US; CHEN, Fon-Chiu, Mia, Ramona, CA 92065, US; WILSON, Gregg, L., San Diego, CA 92129, US; MILNER, Michael, W., Murrieta, CA 92362, US; HUANG, Ching, Chula Vista, CA 92011, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNCHROMATOGRAPHISCHER ASSAY UND VERFAHREN ZUR NUTZUNG DESSELBEN**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Hintergrund der Erfindung

**[0001]** Einheitliche Latexteilchen ("ULPs") sind im wesentlichen äußerst einheitliche Kugeln mit geringem Durchmesser. Der typische Durchmesser liegt im Bereich von weniger als etwa 0,1 µm bis etwa 100 µm. Teilchen mit weniger als 5 µm Durchmesser werden üblicherweise durch Emulsionspolymerisation hergestellt. Das Ergebnis dieses Verfahrens ist eine Reihe von Teilchen mit äußerst gleichmäßiger Größenverteilung.

**[0002]** Die Hauptverwendung der ULPs liegt im Bereich der medizinischen Diagnostik, wobei die Teilchen für Latex-Agglutinationstests verwendet werden. Neuere bekannte Verwendungen umfassen mikrobiologische Anwendungen- z.B. Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien sowie Messen des Blutserumanteils in Antibiotika (siehe z.B. Bangs, L.B. "Uniform Latex Particles", vorgestellt in einem Workshop zur 41. Nationalversammlung, American Association for Clinical Chemistry, 1989 und in gedruckter Form erhältlich von Seragen Diagnostics Inc., Indianapolis, IN; oder Galloway, R.J., "Development of microparticle tests and immunoassays", 01988 von Seradyn Inc., Indianapolis, IN). Andere Arten von Teilchen, wie amidmodifizierter Latex ("AML") und carboxylatmodifizierter Latex ("CML") weisen an ihren Oberflächen jeweils Amid- und Carboxylsäuregruppen auf. Diese funktionellen Gruppen erlauben eine kovalente Bindung von Antigenen oder Antikörpern an die Oberfläche der ULPs zur Durchführung verbesserter Agglutinationstests.

**[0003]** Am häufigsten werden ULPs im Bereich der Immundiagnostik oder Immunoassays verwendet, insbesondere in Latex-Agglutinationstests, in denen sie zur Auffindung winzigster Mengen oder Konzentrationen von Antigenen oder Antikörpern in Blut, Serum, Urin oder cerebrospinalen Flüssigkeiten verwendet werden. Das heißt, ULPs werden zur Vergrößerung oder Sichtbarmachung von Antigen-/Antikörperkomplexbildungen verwendet; sie können auch zur Bestimmung der Mengenanteile dieser Reaktion verwendet werden.

**[0004]** Versucht man beispielsweise einen bestimmten Antikörper ("Ab") zu messen, wird ein geeignetes Antigen ("Ag") auf die Latexteilchen aufgebracht. Da das Ab zweiwertig ist, kann es sich an identischen Stellen von zwei nebeneinanderliegenden Teilchen anlagern und diese verbinden. Das heißt, wird Ab, das in der Probe einer Person vorhanden ist, mit den Agbeschichteten Teilchen vermischt, verursacht es Agglutination oder Coagulation der Teilchen. Diese Aggregate sind im allgemeinen mit bloßem Auge sichtbar. Dieses Phänomen bildet im wesentlichen die Basis für die Latex-Agglutinations-

tests ("LAT").

**[0005]** Eine Hauptschwierigkeit bei LATs liegt in der Tatsache, daß die beschichteten Teilchen zu spontaner Agglutination neigen. Dies liegt hauptsächlich daran, daß Latexsuspensionen kolloidale Suspensionen hydrophober Teilchen sind. Die Stabilität einer Suspension hängt von der aktiven Oberflächenladung ab. Die Zugabe von kleinen Mengen Protein (ca. 10 µg pro mg Latex) kann eine Agglomeration bewirken, wogegen eine fortgesetzte Zugabe größerer Mengen Protein zu einer Verbesserung der Teilchenstabilität führt.

**[0006]** Diese Art von Agglutination stellt auch bei der chromatographischen Analyse, bei welcher farbige oder sichtbare Teilchen verwendet werden, ein Problem dar, wie z.B. in der in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 88/08534 beschriebenen Analyse. In dieser Analyse wird eine Probe auf ein Substrat aus absorbierendem Material aufgebracht und ein Analyt bindet bewegliche farbige Latexteilchen an Antikörper- oder Antigenträger. Die Teilchen, an die der Analyt gebunden ist, sind wiederum selbst an immobilisierte Immunoreagenzien gebunden während die Probe das Absorbionsmaterial im Rahmen der Chromatographie in Längsrichtung durchströmt.

**[0007]** Es wurden verschiedene Methoden zur Lösung des damit verbundenen Problems der nichtspezifischen Agglutination vorgeschlagen, einschließlich der Verwendung von Verbindungsgliedern (Linkers) und Abstandhaltern (Spacers). Einige der vorgeschlagenen Abstandhalter beinhalten Protein A, Diaminoalkane, nackte Antikörper und Streptavidin-Biotin Spacer, um nur einige zu nennen. Die Verwendung von heterobifunktionellen Verbindungsgliedern, halogensubstituierten Carbonsäuren, Rinderserumalbumin, oberflächenaktive Mittel und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente wurde ebenfalls vorgeschlagen. Es erweisen sich jedoch nur wenige dieser Vorschläge als völlig zufriedenstellend, da sie dazu neigen, die Analyse zu stören und viele dabei eine Agglutination verhindern. Für LATs ist dies natürlich völlig unannehmbar.

**[0008]** Des weiteren wurde versucht, die Genauigkeit der in den nachfolgenden Veröffentlichungen beschriebenen Immunoassays zu verbessern. May et al. (Britisches Patent GB-A-2 204 398) beschreibt Vorrichtungen und Immunoassays für Analyten in Proben, in welchen eine feste Phase in mindestens zwei Bereiche aufgeteilt ist, von denen einer ein freibewegliches, markiertes und für das Analyt charakteristisches Reagens und der zweite ein permanent unbewegliches Reagens zum optischen Auffinden des an das bewegliche Reagens gebundenen Analyts enthält. Sakai et al. (US-Patent 4,680,274) beschreibt, daß ultrafeine Mikrokügelchen ("ultramicrospheres") mit einer Durchschnittsgröße von 0,2 µm oder weniger, auf das ein Stoff aufgebracht ist, der

mit einem nichtspezifischen Faktor in einer Probe reagiert, zur Verhinderung einer nichtspezifischen Immunreaktion verwendet werden können, wenn sie in einer Reihe von Immunoassays enthalten sind. Die Veröffentlichungen Manita (JP-A-5748658; Pat. Abstr. of Japan, Bd. 6 (121) (P-126) (999); Database WPI/Derwent, AN:82-34252E) beschreiben einen Immunoassay, in dem die Empfindlichkeit dadurch verbessert wird, daß die Reaktion in Gegenwart von immunologisch inaktiven Teilchen durchgeführt wird.

**[0009]** Aufgrund des ausdrücklichen Bedarfs an einem Immunoassayverfahren mit unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten, das die Agglomerationsprobleme anderer Analysen vermeidet und die Ziele verbesserter Genauigkeit und größerer Auflösung fördert und das darüber hinaus bestechend einfach ist, offenbart die Anmelderin die vorliegende Erfindung.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Minimieren von Agglomeration von Ligand-gebundenen oder Antiligand-gebundenen Partikeln bereitgestellt, welche bei einer die Verwendung von gebundenen und ungebundenen Partikeln verwendenden Analyse eingesetzt werden, wobei der Bestandteil mit einem Analyt eine Wechselwirkung eingeht, gekennzeichnet durch die Schritte Bereitstellen der gebundenen Partikel, der ungebundenen Partikel und eines Analyts auf einer Trägerschicht, wobei sowohl die gebundenen Partikel als auch die ungebundenen Partikel eine Größe von 0,8 µm aufweisen, so dass sich die Partikel mittels Kapillarwirkung durch die Trägerschicht bewegen können und aus dem gleichen Material bestehen, Ermöglichen einer Wechselwirkung des Bestandteils und des Analyts, und nach der Wechselwirkung, Bewegen der gebundenen Partikel durch die Trägerschicht von einer ersten Zone weg zu einer zweiten Zone, ohne dass eine Agglomeration der Partikel auftritt. Eine Variation sieht eine Immobilisierung des Gemisches auf einem ersten definierten Bereich einer Trägerschicht mit einer oder mehreren definierten Bereichen vor.

**[0011]** In einer bevorzugten Ausführungsform weist der Immunoassay außerdem immobilisierendes Kaninchen-Antiimmunoglobulin G (IgG) (anti-rabbit immunoglobulin) auf einem zweiten definierten Bereich der Trägerschicht auf. In einer anderen Ausführungsform ist das an das zweite bewegliche Teilchen gebundene Protein BSA. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die beweglichen Teilchen farbig. Eine weitere Ausführungsform umfaßt die Zugabe eines Detergens zum Gemisch.

**[0012]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform sind die Teilchen, an die keine Liganden gebunden sind, mit einem Protein beschichtet, welches nicht an der

in der Analyse verwendeten Liganden-Antiliganden-Bindung teilnimmt, wie BSA. In einer weiteren Ausführungsform umfassen die Polymerteilchen Latex oder Polystyrolkugeln.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0013]** Fig. I ist ein Diagramm mit den Ergebnissen unter Verwendung eines Antikörper-Latex/BSA-Latex-Gemisches in einem Strep-A-Test, Testlauf Nr. 1;

**[0014]** Fig. II ist ein Diagramm mit den Ergebnissen unter Verwendung eines Antikörper-Latex/BSA-Latex-Gemisches in einem Strep-A-Test, Testlauf Nr. 2;

**[0015]** Fig. III ist ein Diagramm mit den Ergebnissen unter Verwendung eines Antikörper-Latex/BSA-Latex-Gemisches in einem Okkulten Bluttest.

#### Ausführliche Beschreibung

**[0016]** Es wurde herausgefunden, daß viele gegenwärtig verwendete Immunoassays eine beeinträchtigte Genauigkeit aufweisen, und zwar aufgrund der falschen negativen und positiven Größen. Diese Probleme wurden wesentlich reduziert, wenn nicht sogar ganz ausgeräumt.

##### A. Herstellung von Antikörper-Latex-Konjugationen

**[0017]** Das Grundverfahren einer Protein-Latex-Konjugation, entweder über einfache Adsorption oder über kovalente Bindung, ist im Stand der Technik bekannt, ebenso wie die Verwendung von farbigen Latexteilchen, die die Auflösung und Lesbarkeit von Immunoassays verbessern. Es wurde verschiedene Verfahren allgemein beschrieben, z.B. in Bangs, L.B., "Uniform Latex Particles", vorgestellt in einem Workshop zum 41. National Meeting, Amer. Assoc. Clin. Chem., 1989, erhältlich in gedruckter Form von Seragen Diagnostics Inc., Indianapolis, IN; oder Galloway, R.J., "Development of microparticle tests and immunoassays," Seradyn, Inc., Indianapolis, IN.

**[0018]** Ein Verfahren zur Herstellung beschichteter ULPs ist das Adsorptionsverfahren. Hierbei werden 1) reine Reagenzien verwendet; 2) die Teilchen vor dem Beschichten gereinigt und 3) die quantitative Oberflächenbedeckung des ULPs und die Ligandenchemie bestimmt. Die Antikörper-Latex-Konjugate ("Ab-Latex") können beispielsweise nach dem folgenden Verfahren hergestellt werden: Im einfachsten Fall wird der geeignete Ligand in einer Pufferlösung aufgelöst, zu einer Latexsuspension gegeben und während eines Zeitraumes von wenigen Minuten bis mehr als 24 Stunden gerührt. Nach der Aquilibrierung wird der Latex zentrifugiert und der Oberstand, der noch nicht adsorbierte Liganden enthält, wird entfernt. Der Latex wird in einer frischen Pufferlösung er-

neut suspendiert und dann zentrifugiert; der Überstand wird wieder entfernt. Diese Schritte werden wiederholt bis der Latex als frei von sämtlichen nicht adsorbierten Liganden angesehen werden kann. An diesem Punkt ist das Latexbeschichtungsverfahren abgeschlossen und der Latex fertig zur Verwendung in LATs.

**[0019]** Das kovalente Verbinden umfaßt die dauerhafte oder covalente Verbindung eines Liganden oder eines anderen Materials an die Oberfläche des Latexteilchens. Ist das kovalente Verbinden das gewählte Verfahren, muß zuerst der Ligand an die ULPs gebunden werden, dann ist die Stabilität der Latexteilchensuspension aufrechtzuerhalten und anschließend das Gerinnen des Proteins zu verhindern. (Eine allgemeine Beschreibung von kovalenten Bindungstechniken und die Nennung weiterer Veröffentlichungen findet man in Bangs, L.B., "Uniform Latex Particles.")

**[0020]** Obwohl sich die vorstehende Beschreibung auf Latexteilchen bezieht, können auch andere Polymerteilchen, wie Polystyrolteilchen, und sogar Metallteilchen, wie Goldsolteilchen, verwendet werden. Diese Teilchen und ihre Herstellungsverfahren sind bekannt.

#### B. Herstellung von BSA-Latex-Konjugaten

**[0021]** Die Herstellung von Rinderserumalbumin-Latexkonjugaten ("BSA-Latex") entspricht der oben beschriebenen Herstellung von Ab-Latex, mit der Ausnahme, daß anstelle der Antikörper BSA verwendet wird. Anstelle von BSA können alternativ auch andere Proteine, wie andere Albumine (einschließlich Lactoalbumin), Kasein, Globulin, Immunoglobulin (das nicht an der Antigen-Antikörper-Reaktion teilnimmt) und ähnliches verwendet werden, um eine nichtspezifische Bindung zu verhindern.

#### C. Gemische aus Ab-Latex und ESA-Latex

**[0022]** Ab-Latex und ESA-Latex werden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, je nach dem durchzuführenden Test. Zur Herstellung von Gemischen, wie sie beispielsweise in den nachfolgenden Beispielen beschrieben werden, werden Ab-Latex und ESA-Latex in einem Volumenverhältnis von ca. 1:1 und 1:3 vermischt, zur Verwendung im okkulten Bluttest (siehe Beispiel II). In dem Strep-A-Test (Beispiel I) betrug das Verhältnis von Ab-Latex : ESA-Latex ca. 1:2. Die Menge des Latex (oder anderer Teilchen), die keinen Antikörper tragen, kann in jeder Größenordnung liegen, die eine angemessene Reduzierung der nichtspezifischen Bindung oder falscher Positivwerte bewirkt. Diese Mengen werden nach naheliegenden empirischen Verfahren bestimmt.

#### D. Ein-Schritt-Analyse

**[0023]** Die in einer bestimmten erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendete Analysenreaktionseinheit umfaßt einen Streifen aus einer Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von ca. 8 µm, obwohl auch größere oder kleinere Porengrößen verwendet werden können (d.h. vorzugsweise in einem Bereich von ca. 3 µm bis ca. 12 µm). Der Streifen befindet sich in einem Kunststoffgehäuse. Das Verhältnis zwischen Porengröße und Teilchengröße ist wichtig. Der Durchmesser der verwendeten Teilchen sollte kleiner sein als die Porengröße der Membran, so daß die Teilchen sich durch die Membrane bewegen können.

**[0024]** Ca. je 5µl Ab-Latex oder Ab-Latex/BSA-Latex-Gemisch ("Ab/ESA") wurden dünnflüssig auf die Membran aufgebracht, und spezifisches Ab (positives Signal) und Ziegen-Anti-Kaninchen IgG (goat anti-rabbit IgG) (negatives Signal) wurden vor dem Test an getrennten Bereichen auf der Membrane immobilisiert. (Der Ziegen-Anti-Kaninchen IgG ist von vielen Quellen erhältlich, z.B. von Pel-Freez, Rogers, AR.) Diese Bereiche können jedoch aneinander angrenzen oder sich überlappen.

**[0025]** Bei der Durchführung der Analyse wird eine Probe auf die Membran aufgebracht und fließt aufgrund der Kapillarwirkung entlang der Membran. Die fließende Probe trägt das Latexgemisch entlang der Membran, und der in der Probe enthaltene Analyt wird an den mit Antikörper markierten Latex gebunden. Der an den Latex gebundene Analyt wird bis zum "positiven Signal" Ab immobilisiert, und der nur das Kaninchen-Ab enthaltende Latex wird bis zum "negativen Signal" Ab immobilisiert. Ist der markierte Latex gefärbt, entsteht in den positiven und negativen Bereichen ein sichtbares Signal.

**[0026]** Durch die nachfolgenden Beispiele werden die bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung im einzelnen beschrieben. Die bedeutet aber nicht, daß die Erfindung hierauf beschränkt ist.

#### BEISPIEL I

##### Strep-A-Test

**[0027]** Das Carbohydrat-Antigen der Gruppe Streptococcus A (Strep-A-Antigen) wurde durch das Salpetrigsäure-Extraktionsverfahren hergestellt (Manual of Clinical Microbiology, 4. Ausgabe, American Society for Microbiology). Die Strep-A-Antigenlösung (0,25 ml) wurde auf die dafür vorgesehene Stelle der Probe einer Immunoassay-Vorrichtung aufgebracht; diese Vorrichtung umfaßt zumindest eine Trägerschicht oder eine Membran mit einer oder mehreren definierten Zonen, an die Liganden oder Antiliganden gebunden sind, wobei die Probe in einem Bereich außerhalb der definierten Zonen auf die Trägerschicht

aufgebracht und dann ein Flüssigkeitsstrom auf die Trägerschicht geleitet wird, wodurch sich die Probe über die definierten Zonen verbreitet und die in der Probe enthaltenen Substanzen an die Zonen gebunden werden. Zumindest eine der definierten Zonen weist kolloidale Teilchen mit einem daran gebundenen Liganden auf, wobei der Ligand und jegliche in der Probe enthaltenen Analyten den in der ersten definierten Zone gebundenen Antiliganden ergänzen (Immunoassay-Vorrichtungen umgeben oder tragen oft die Membran noch mit einem Kunststoffgehäuse).

**[0028]** Zwei identische Tests wurden nebeneinander gefahren. Ein Test wurde nach 3 Minuten beendet, der andere nach 10 Minuten.

**[0029]** Wurde nur Ab-Latex (siehe **Fig. 1.A.**) allein verwendet, bewirken Antigenkonzentrationen zwischen  $5 \times 10^8$  und  $5 \times 10^9$  Strep-A-Zellen pro Test ein Zusammenkleben des Ab-Latex. Das Ergebnis war, daß sich nur eine sehr geringe Menge Latex über die Nitrocellulose-Membran bewegte und dadurch die positiven Signale bei 3 und 10 Minuten sehr leise waren. Wenn andererseits das Ab/BSA-Gemisch verwendet wurde (siehe **Fig. 1.B.**), bewirkte die gleiche Anzahl Strep-A-Zellen, die im Ab-Latex ein Zusammenkleben verursacht hatte, nicht die gleiche Agglutination in dem Ab/BSA-Gemisch. Dies wurde durch die Tatsache belegt, daß bei Verwendung von Ab/BSA mehr Latex beim Wandern über die Membrane beobachtet wurde. Dieses höhere Volumen an Latexbewegung bewirkte eine nachfolgende Verstärkung des Signals bei 3 und 10 Minuten, verglichen mit dem Einsatz von Ab-Latex allein. Bei niedrigeren Strep-A-Zellen-Konzentrationen ( $5 \times 10^4$  Zellen pro Test) zeigten jedoch beide, sowohl das Ab-Latex-Gemisch als auch das Ab/BSA-Gemisch, ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der sich bewegenden Latexmenge und der Signalstärke.

**[0030]** Bei Verwendung eines Gemisches von Ab-Latex und reinem Latex (**Fig. 2.A.**) bewirkten  $5 \times 10^9$  Strep-A-Zellen pro Test, daß eine gewisse Menge an Latex zusammenklebte und das positive Signal nicht sichtbar war, der Hintergrund jedoch dunkel und unklar war, verglichen mit Ab/BSA (**Fig. 2.B.**). Bei  $5 \times 10^8$  Zellen oder weniger pro Test (**Fig. 2.b.**) zeigte das Ab/BSA-Gemisch einen klareren Hintergrund verglichen mit dem Test, bei dem ein Gemisch aus Ab-Latex und reinem Latex verwendet worden war (**Fig. 2.A.**). Jedoch zeigte sogar die Kombination von Ab-Latex und reinem Latex eine bessere Latexbewegung als der Ab-Latex allein (**Fig. 1.A.** und **Fig. 2.A.**)

#### Beispiel II

##### Okkultes Bluttest

**[0031]** Zwei Probenstäbchen aus einer okkulten Bluttesteinheit (wie z. B. im US-Patent 5 182 191 be-

schrieben) wurden mit einer Kotprobe beschmiert und in einen Extraktionsbecher, der 350 µm Extraktionslösung enthaltend 0,1% TRITON® in 50 mM Tris-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8,0 (Tris und TRITON® erhalten von Sigma Co., St. Louis, MO) enthielt, gegeben. Nach 10 sec schneller Bewegung in der Extraktionslösung wurden die Probenstäbchen entfernt und das Extraktionsgemisch wurde wie in Beispiel I beschrieben auf die dafür vorgesehene Stelle der Probe einer Immunoassay-Vorrichtung aufgebracht. Die Analyse wurde nach 10 min durch Entfernen der Membran aus ihrem Kunststoffgehäuse beendet.

**[0032]** Beobachtungen wären ähnlich denen für den Strep-A-Test. Es wurde gefunden, daß in Gegenwart von menschlichem Hämoglobin (126 ng-600 ng pro Test) der Ab-Latex zu einer zu frühen Agglutination neigte, was zu einer unausgeglichenen Latexbewegung führte ("Schlierenbildung" erschien auf dem Signalfenster; siehe **Fig. 3**). Aufgrund dieser frühen Agglutination konnte sich weniger Latex über das Signalfenster bewegen und das Signal erschien etwas verstümmelt und "unbeendet". Bei Zugabe von ESA-Latex wurde eine gleichmäßigere Bewegung von Latex beobachtet. Bei der Verwendung eines Ab/BSA-Gemisches wurde ein sauberer Hintergrund erhalten und gleiche oder bessere Empfindlichkeit als nur mit Ab-Latex. Vergleicht man ein Gemisch von Ab-Latex und ESA-Latex in einem Verhältnis von 1:1 mit einem Gemisch im Verhältnis von 1:2 oder 1:3 zeigt sich, daß der Hintergrund um so besser und die Bewegung des Latex über das Signalfenster um so schneller ist, je höher die BSA-Latex-Konzentration ist. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Verwendung eines Gemisches von Ab-Latex und ESA-Latex anstelle von Ab-Latex allein die Durchführung des Tests ohne Kompromisse hinsichtlich der Testempfindlichkeit verbesserte. Es wurde angenommen, daß das ESA-Latex in dem Ab/BSA-Gemisch als "Abstandskalter" wirkt und dadurch die sofortige Agglutination des Ab-Latex in Gegenwart des Testantigens verhindert. Es wurde ebenfalls festgestellt, daß die Verwendung des Ab/BSA-Gemisches dazu neigt, die nichtspezifische Bindung und falsche Positivwerte zu unterbindet.

#### BEISPIEL III

##### HCG-Urin-Test

**[0033]** Es wurde festgestellt, daß die Verwendung des Ab/BSA-Gemisches das Auftreten falscher Positivwerte in einstufigen HCG-Urin-Tests vermindert oder ausgeschaltet. Wurde Ab-Latex vor der Durchführung des Tests allein auf den Träger aufgetragen, wurde festgestellt, daß ein falscher Positivwert erhalten werden kann. Wurde das Ab/BSA-Latex-Gemisch zum Testen desselben Urins verwendet, wurden keine falschen Positivwerte festgestellt. Das Auftreten

falscher Positivwerte bei einigen Urinproben ist aufgrund der Gegenwart von Substanzen, die eine nicht-spezifische Bindung an Ab-Latex und irremobilisiertes Ab bewirken, wahrscheinlich, Das Ergebnis ist die Bildung eines "Sandwichs". Die Gegenwart von ESA-Latex kann die nichtspezifische Bindung beeinträchtigen und damit das Auftreten von falschen Positivwerten vermindern oder ausschalten. Die Substanz im Urin, die eine solche nichtspezifische Bindung verursacht, ist vermutlich das Protein A des Staphylococcus aureus. Es ist bekannt, daß das Protein A des S. aureus IgG stark bindet, und wenn S. aureus im Urin einer nicht schwangeren Frau enthalten sind, wird eine falsche positive Reaktion beobachtet.

den ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

**[0034]** Obwohl die Erfindung im Zusammenhang mit bestimmten Ausführungsformen beschrieben wurde, ist der Umfang des Patentes nicht auf diese bestimmten Ausführungsformen beschränkt, er wird aber durch Bezug auf die nachfolgenden Ansprüche bestimmt.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Minimieren von Agglomeration von Ligandgebundenen oder Antiligand-gebundenen Partikeln, welche bei einer die Verwendung von gebundenen und ungebundenen Partikeln verwendenden Analyse eingesetzt werden, wobei der Bestandteil mit einem Analyt eine Wechselwirkung eingeht, gekennzeichnet durch die Schritte:

Bereitstellen der gebundenen Partikel, der ungebundenen Partikel und eines Analyts auf einer Trägerschicht, wobei sowohl die gebundenen Partikel als auch die ungebundenen Partikel eine Größe von 0,8 µm aufweisen, so dass sich die Partikel mittels Kapillarwirkung durch die Trägerschicht bewegen können und aus dem gleichen Material bestehen, Ermöglichen einer Wechselwirkung des Bestandteils und des Analyts, und

nach der Wechselwirkung, Bewegen der gebundenen Partikel durch die Trägerschicht von einer ersten Zone weg zu einer zweiten Zone, ohne dass eine Agglomeration der Partikel aufgrund der Wechselwirkung auftritt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die ersten beweglichen Partikel Latexpartikel aufweisen, mit denen das Ligand oder Antiligand verbunden ist, und wobei die zweiten beweglichen Partikel einfache Latexpartikel aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die ersten beweglichen Partikel gefärbt sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein nicht mit dem Liganden oder Antiliganden wechselwirkendes Protein an den zweiten beweglichen Partikeln gebun-

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

STREP A.		A. STREP A.Ab/NUR LATEX		B. GEMISCH AUS STREP A.Ab/L+BSA/L
ZELLEN PRO TEST	TEST ZEIT	Ab/LATEX CONZ. 3 %	Ab/LATEX CONZ. 1 %	
5 x 10 <sup>9</sup>	3 min			(STREP A/L) + (BSA/L) 1 % + 2 %
"	10 min			
5 x 10 <sup>8</sup>	3 min			
"	10 min			
1 x 10 <sup>5</sup>	3 min			
"	10 min			

NIEDRIGE  
DOSIS  
AN STREP A

FIG. 2

STREP A. Ag PRO TEST	LAUF- ZEIT	A. STREP A. Ab/LATEX + LATEX (1 %)	REINER LATEX (2 %)	B. GEMISCH AUS STREP A.Ab /LATEX + BSA / LATEX (1 %) (2 %)	BEMERKUNG
5 x 10 <sup>9</sup> ZELLEN	3 min				B. bewegte sich schneller und zeigte Signale
"	10 min				B. Hintergrund ist besser
5 x 10 <sup>8</sup> ZELLEN	3 min				A & B: bewegten sich gleich schnell
"	10 min				B: Hintergrund ist besser
1 x 10 <sup>5</sup> ZELLEN	3 min				A = B
"	10 min				A = B



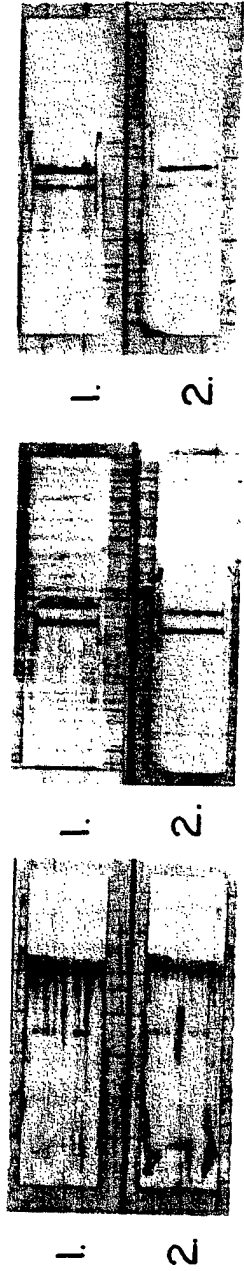


FIG. 3(A)

FIG. 3(B)

FIG. 3(C)