



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **7807532**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Metaal-Immunotest.**
⑤1 Int.Cl.⁸: G01N33/58.
⑦1 Aanvrager: AKZO N.V. te Arnhem.
⑦4 Gem.: Drs. A.D. Douma c.s.
Kloosterstraat 6
5439 AB Oss.

- ②1 Aanvraag Nr. 7807532.
②2 Ingediend 13 juli 1978.
③2 --
③3 --
③1 --
②3 --
⑥1 --
⑥2 --

- ④3 Ter inzage gelegd 15 januari 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Akzo N.V. te Arnhem

Titel: Metaal-Immunotest

De uitvinding heeft betrekking op een methode voor de kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van een immunologische component, zoals een haptene, antigeen of antilichaam, in een waterig medium onder gebruikmaking van de immunologische reactiviteit van dergelijke componenten ten opzichte van elkaar.

Er is een groot aantal immunochemische methoden bekend, waarbij de aanwezigheid van een bepaalde immunologische component kwalitatief en/of kwantitatief wordt vastgesteld onder gebruikmaking van de onderlinge reacties tussen dergelijke componenten, zoals de reactie tussen antigeen en de daartegen gerichte antistof of antilichaam.

Bij de bestudering van dergelijke reacties voor het aantonen en/of bepalen van de gewenste component kan men gebruik maken van hulpmiddelen, bijvoorbeeld fysische hulpmiddelen zoals een elektronenmicroscop, of men kan gebruik maken van een reagens, dat voorzien is van een merkstof of label, die bepaald resp. aangetoond kan worden in een lagere concentratie dan het gevormde immunocomplex zelf.

Als voorbeelden van de eerste categorie van immunochemische technieken kunnen worden genoemd de in 1948 door Ouchterlony ontwikkelde immunodiffusie, de daarop in 1953 door Grabar ontwikkelde variant, immuno-electroforese, en de door Mancini in 1965 ontwikkelde radiale immunodiffusie.

De immunodiffusie techniek bestaat hierin, dat men een dunne agarlaag aanbrengt op een glazen plaat, waarna in de gel twee gaten worden gemaakt op enige afstand van elkaar. De testvloeistof met antigeen wordt gebracht in één der gaten, en een antiserum in het andere.

78 07 532

Door diffusie van beide stoffen in de gel ontmoeten deze elkaar en vormen een zichtbare precipitatielij. Alhoewel deze methode tamelijk eenvoudig is, heeft deze een aantal nadelen, met name, dat de diffusie
5 vrij lang duurt en dat de resultaten gewoonlijk slechts een kwalitatieve indicatie geven. Ook de andere immuno-chemische technieken hebben hun bezwaren, die behalve specifieke nadelen, in het algemeen bestaan uit een te lange tijdsduur van de test, een geringe gevoeligheid,
10 en/of het verkrijgen van slechts kwalitatieve aanwijzingen.

Naast deze niet-gelabelde immunochemische technieken is er in de loop der jaren een aantal gelabelde technieken ontwikkeld, waartoe kunnen worden genoemd
15 de haemagglutinatietest, waarbij één der componenten wordt gehecht aan het oppervlak van erythrocyten; de techniek van immunofluorescentie, waarbij één der componenten wordt gemerkt met een fluorescerende verbinding (fluorofoor); de door Yalow en Berson
20 rondom 1959 ontwikkelde radio-immunologische bepaling, waarbij in plaats van een fluorofoor een radio-actief atoom of radio-actieve groep als merkstof wordt toegepast; en de meest recente techniek van enzym-immunologische bepaling, waarover in 1971 de eerste publi-
25 caties verschenen van twee onafhankelijk van elkaar werkende groepen, nl. de Zweedse onderzoekers Engvall en Perlmann en de Nederlanders Schuurs en van Weemen. Laatstgenoemde bepaling is in principe analoog aan de bekende radio-immunologische bepalingen met dit
30 verschil, dat in plaats van een radio-actieve merking een enzym als label wordt toegepast.

De veelvuldig toegepaste radio-immunologische bepaling heeft ontegenzeggelijk grote verdiensten, maar er kleven toch een aantal belangrijke bezwaren
35 aan deze methode, zoals de risicofactor vanwege het werken met radio-actief materiaal, de hoge kosten van

78 07 532



reagentia en apparatuur, de korte houdbaarheid van radio-actief gelabelde reagentia, en de vereiste, dat slechts gekwalificeerd personeel deze bepalingen kan verrichten.

5 De enzym-immunologische bepalingmethode bezit deze nadelen niet, maar niettemin is het gewenst, dat nieuwe bepalingstechnieken worden ontwikkeld, die nog gevoeliger zijn, sneller kunnen worden uitgevoerd, gemakkelijker geautomatiseerd kunnen worden, en/of
10 die bepalingen van meerdere immunocomponenten tegelijkertijd mogelijk maken.

De uitvinding nu heeft betrekking op een immunologische bepalingmethode, die daardoor gekenmerkt is, dat bij de immunochemische reactie tussen de te bepalen,
15 en aan het waterige testmedium toe te voegen immunologische componenten een metaalgemerkte component wordt toegepast, verkregen door deeltjes van een sol van een metaal of metaalverbinding direct of indirect te koppelen of te adsorberen aan de betreffende immunologische component,
20 waarbij na afloop van de immunochemische reactie, eventueel na scheiding van de gebonden en de vrije metaalgemerkte component, de aard en/of de hoeveelheid van het metaal in de gebonden en/of de vrije fractie wordt bepaald met de daarvoor in het algemeen bekende methoden,
25 welke bepaling een kwalitatieve respectievelijk een kwantitatieve aanduiding geeft van de te bepalen immunologische component.

Waar hierna in de tekst de term "metaalsol deeltjes" wordt gebruikt, wordt hieronder verstaan
30 deeltjes van een sol, bestaande uit een metaal of een metaalverbinding.

Het gebruik van metaalsol deeltjes, in het bijzonder die van goudsolen, welke aan de oppervlakte bedekt zijn met antilichamen, voor het vaststellen
35 van de verdeling van een antigeen over een celoppervlak door middel van raster-electronenmicroscopie is reeds

78 07 532

een aantal jaren geleden beschreven (zie artikel van M. Horisberger in *Experientia*, pp. 1147-1149, van 15 oktober 1975), maar de toepassing van metaalsol deeltjes als label voor een immunologische component voor een in vitro kwalitatieve en kwantitatieve bepaling van immunologische componenten, zoals haptenen, antigenen en antilichamen, in een waterig testmedium is niet eerder beschreven, en is verrassenderwijze mogelijk gebleken.

De volgens de uitvinding ontwikkelde metaal-immunochemische techniek is niet alleen gevoeliger dan de bekende radio-, en enzymimmuno technieken, maar maakt het bovendien mogelijk simultaan meerdere immunologische componenten in het zelfde testmedium aan te tonen en te bepalen door toepassing van verschillende metaal-labels.

De metaalsolen kunnen zijn van metalen, of metaalverbindingen, zoals metaaloxiden, metaalhydroxyden of metaalzouten. Als voorbeelden kunnen worden genoemd de metalen of metaalverbindingen van goud, zilver, ijzer, nikkel, aluminium, chroom, lood, arseen, vanadium, kwik, mangaan, en in het algemeen al die metalen, die gemakkelijk met behulp van de bekende technieken aan te tonen zijn.

Solen van metalen zijn bijv. die van zilver, goud en platina. Solen van metaalverbindingen zijn bijv. die van zilverjodide, ijzeroxyde, aluminiumhydroxyde, chroomhydroxyde, vanadiumoxyde, ijzerhydroxyde, arseensulfide, mangaanhydroxyde, en kwiksulfide.

Bij voorkeur worden metalen of metaalverbindingen gebruikt, die in het testmedium niet voorkomen, en daarvan in het bijzonder die, die met een gekozen techniek in een zo laag mogelijke concentratie aan te tonen zijn.

78 07 532



De als label toe te passen metaalsol deeltjes kunnen op een groot aantal, volgens op zich zelf bekende methoden bereid worden. Voor de bereiding van een goudsol wordt bijvoorbeeld verwezen naar een
5 artikel van G. Frens in Natural physical Science 241, 20 (1973).

De metaalsol deeltjes dragen een lading, hetgeen een stabiliserend effect oplevert door onderlinge afstoting. Door toevoeging van voornamelijk sterke
10 electrolyten wordt het ladingspatroon gewijzigd, waardoor samenklonteren en uitvlokking optreedt. Dit kan worden voorkomen door de deeltjes te omhullen door macromoleculen met polaire groepen, zoals eiwitten, polyethyleenglycolen, polymere carbohydraten, poly-
15 vinylalcoholen, e.d.

Als beschermende eiwitten kunnen worden toegepast antigenen, antilichamen en anti-antilichamen of immunochemisch actieve brokstukken daarvan, of haptenen, welke laatstgenoemden gekoppeld zijn aan immuno-
20 chemisch inerte, beschermende macromoleculen, hetgeen direct resulteert in metaalsol deeltjes gelabelde immuno-componenten.

Het verdient echter de voorkeur voor de omhulling van de metaalsol deeltjes niet uitsluitend immuno-
25 componenten toe te passen, omdat daardoor wel een stabiliserend effect wordt verkregen, maar de immunochemische reactiviteit geringer is dan verwacht mocht worden, waarschijnlijk door sterische hindering. Het is dan ook van voordeel gebleken de omhulling slechts gedeeltelijk
30 uit te voeren met een immunocomponent, en de omhulling te completeren met een ander beschermend, doch immunochemisch inert materiaal, zoals inerte eiwitten, bijvoorbeeld albumine, een polyetheenglycol of een ander polair macromolecuul. Als omhullend materiaal kan ook
35 worden toegepast protein A of verwante eiwitten, die reactiviteit bezitten t.o.v. het Fc gedeelte van anti-

78 07 532

lichamen. Na de omhulling van de metaalsol deeltjes door
proteïn A kan een verdere omhulling tot stand worden
gebracht met een gewenst antilichaam.

Een andere mogelijkheid bestaat hierin, dat men
5 de metaalsol deeltjes eerst omhult met een inert
hydrophiel polymeer of co-polymeer, waarna vervolgens
door adsorptie of via covalente bindingen de immuno-
logische component wordt gekoppeld aan het omhullende
materiaal.

10 De na omhulling verkregen bolletjes kunnen een
enkel metaalsol deeltje bevatten, maar het is ook
mogelijk, dat het polymeer meerdere metaalsol deeltjes
omsluit.

De omhulling van de metaalsol deeltjes door het
15 inerte polymeer kan op twee manieren plaats vinden,
en wel door de metaalsol in contact te brengen met
het polymeer, ofwel door het metaalsol te brengen in
een milieu van een monomeer, respectievelijk ver-
schillende monomeren, en deze laatste in situ te
20 laten polymeriseren resp. te co-polymeriseren. De
polymerisatie kan op gang worden gebracht onder
invloed van straling, of door toevoeging van initiatoren,
zoals een persulfaat.

De omhulling van een metaalsol deeltje door poly-
25 merisatie van het monomere medium, waarin zich het
deeltje bevindt, onder invloed van een anorganische
initiator zoals een persulfaat, stuit op praktische
moeilijkheden, omdat de sol bij toevoeging van een
dergelijke initiator uitvlokt. Gevonden werd nu, dat
30 een dergelijke omhulling toch mogelijk is door de
metaalsol deeltjes eerst te beschermen, daarna de
beschermde deeltjes in het monomere medium te brengen
en daarna pas de polymerisatie te initiëren. Als be-
schermend materiaal komen de hiervoor eerder genoemde
35 verbindingen in aanmerking.

78 07 532

De metaalsol deeltjes gelabelde immunocomponenten worden toegepast als reagens, gewoonlijk in combinatie met andere reagentia, voor het aantonen en kwantificeren van haptenen, antigenen en antilichamen in een waterig testmedium, waarvoor allerlei immunochemische technieken, zoals in gebruik bij radio-immuno testen en enzym-immuno testen, in aanmerking komen.

De uitvinding heeft derhalve ook betrekking op testkitten, te gebruiken bij dergelijke immuno-chemische technieken, die als belangrijkste component bevatten een metaal-gelabelde immunocomponent, bestaande uit een metaalsol, waarvan de deeltjes ofwel direct omhuld zijn door de gewenste immunocomponent, ofwel door een inert polymeer, waaraan de immunocomponent is gekoppeld of geadsorbeerd.

Eén van de gebruikelijke immunochemische technieken is de competitieve immunotest, die toegepast kan worden voor het aantonen en bepalen van iedere immunocomponent. Voor het aantonen van bijvoorbeeld een bepaald antigeen bestaat deze methode hierin, dat men een testmonster, bevattende een onbekende hoeveelheid antigeen, in contact brengt met ofwel een bepaalde hoeveelheid van het betreffende metaal-gelabelde antigeen en een onoplosbaar gemaakt antilichaam, gericht tegen dit antigeen, ofwel een bepaalde hoeveelheid onoplosbaar gemaakt antigeen en een metaal-gelabeld antilichaam gericht tegen dit antigeen.

Na afloop van de reactie wordt de aard en/of de hoeveelheid van het metaal bepaald in de gebonden of vrije fractie, hetgeen een kwalitatieve respectievelijk een kwantitatieve aanduiding geeft voor het te bepalen antigeen. Mutatis mutandis geldt een analoge methodiek voor de bepaling van andere immunocomponenten.

Veelvuldig toegepast zijn ook de zgn. Sandwich-technieken, die zich ook in het bijzonder lenen voor

78 07 532

het gebruik van een metaal-gelabelde component volgens de uitvinding. Volgens deze technieken wordt een immunologische component, bijvoorbeeld een antilichaam in het geval een antigeen moet worden bepaald, onoplosbaar gemaakt door deze te koppelen aan een vaste drager. Deze vaste drager is bijvoorbeeld de binnenzijde van het reactievat, waarin de immunochemische reactie wordt uitgevoerd. Na een eerste incubatie, eventueel gevolgd door een wasstap, vindt een tweede incubatie plaats met een metaal-gelabeld antilichaam, waarna het metaal wordt bepaald in de gebonden of de vrije fase.

Naast de hiervoor genoemde technieken bestaan er talloze andere immunochemische technieken, waarbij de metaal-gelabelde immunocomponent als reagens kan worden toegepast. De onderhavige uitvinding maakt het ook mogelijk verschillende haptenen, antigenen, antilichamen, of combinaties daarvan tegelijkertijd in één testmonster aan te tonen, door voor elk der aan te tonen componenten een immunocomponent als reagens toe te passen, die gelabeld is met een verschillend metaalsol deeltje.

De meting van de aard en/of de concentratie van het metaal in een bepaalde fase van het reactiemengsel kan op talloze, volgens op zich zelf bekende technieken plaats vinden. Als voorbeelden daarvan worden genoemd de colorimetrische bepaling, waarbij gebruik gemaakt wordt van de eigenschap, dat metaalsolen sterk gekleurde dispersies zijn, die bovendien van kleur veranderen bij fysisch-chemische wijzigingen; de visuele methode, die vaak voor kwalitatieve bepalingen reeds toepasbaar is, gezien het hiervoor genoemde feit, dat metaalsolen gekleurd zijn; het gebruik van vlam emissie spectrofotometrie of een andere plasma emissie spectrofotometrische methode, die een simultane bepaling mogelijk maakt, en de zeer gevoelige methode van vlamloze atomaire absorptie spectrofotometrie.

7807532



De uitvinding wordt aan de hand van de volgende voorbeelden nader toegelicht.

Voorbeeld I

- 5 Colorimetrische bepaling van menselijk placenta lactogeen (HPL) d.m.v. met gouddeeltjes gelabelde antilichamen uit een konijne anti HPL serum.

1.1. Bereiding van het goudsol

- 500 ml van een 1% (w/v) chloorgoudzuur (HAuCl_4)
10 in gedestilleerd water wordt in een bekerglas van 800 ml verhit tot koken. Bij de kokende oplossing wordt 3,5 ml van een 1% (w/v) oplossing van trinatriumcitraat in gedestilleerd water gebracht, waarna men het na blauw-
15 kleuring donkerrood geworden goudsol nog 15 minuten laat doorkoken. Na afkoelen tot kamertemperatuur wordt het aldus verkregen rode goudsol in een maatkolf aan-
gevuld tot 500 ml met gedestilleerd water. Het op deze wijze verkregen goudsol bestaat uit gouddeeltjes met
20 afmetingen tussen 45 en 70 nm, hetgeen door electronen-microscopisch onderzoek is vastgesteld. Een op deze wijze bereid goudsol heeft een $\text{pH} = 3,45 \pm 0,07$ en een lichtabsorptie maximum bij 536 nm terwijl $A_{536}^{1\text{ cm}} = 1,15 \pm 0,03$.

1.2. Bereiding van konijne anti HPL sera

- Anti HPL sera werden gemaakt door konijnen in te
25 spuiten met een HPL oplossing volgens het onderstaande schema.

Dag	methode van injecteren	μg HPL	opgelost in 0,9% w/v NaCl	met CFA
1	intramusculair	100	0,5 ml	0,5 ml
30	15 "	200	0,5 ml	0,5 ml
29	"	400	0,5 ml	0,5 ml
43	intraveneus	200	1,0 ml	-

- 50 bloedmonster voor de bepaling van de titer van
35 het antiserum in een EIA test.

78 07 532



De konijnen werden ontbloed als de titer van het antiserum in een EIA HPL test groter was dan 1:5000. Indien dit niet het geval was kregen de konijnen een additionele injectie van 200 µg HPL in 1,0 ml 0,9% w/v NaCl (intraveneus) en werd de titer van het antiserum opnieuw bepaald 7 dagen na deze injectie. De antisera werden opgeslagen bij -25 °C of drooggevroren en daarna opgeslagen bij -25 °C als een droog poeder.

1.3. Bereiding van de anti HPL immuunglobuline-oplossing uit het konijne anti HPL serum.

Hiertoe wordt 600 mg drooggevroren konijne anti HPL serum opgelost in 7,5 ml van een 0,9% (w/v) NaCl-oplossing. Hieraan wordt toegevoegd 10 ml 18% (w/v) Na₂SO₄-oplossing in gedestilleerd water, waarna er nog 1,35 g vast Na₂SO₄ aan wordt toegevoegd. De verkregen troebele vloeistof laat men gedurende 1 uur staan in een centrifugebuis, waarna de vloeistof wordt gecentrifugeerd bij 25.000 N/kg gedurende 10 minuten. De bovenstaande vloeistof wordt afgezogen en het residu wordt geredispergeerd in 20 ml van een 18% (w/v) Na₂SO₄-oplossing in gedestilleerd water. Deze procedure wordt nog tweemaal herhaald.

Na de laatste maal centrifugeren en afzuigen van de bovenstaande vloeistof wordt het residu opgelost in 20 ml van een 0,9% (w/v) NaCl-oplossing in gedestilleerd water. Deze oplossing wordt gedialyseerd tegen 6 liter dialyse vloeistof bestaande uit een 0,03% (w/v) NaCl-oplossing in gedestilleerd water, welke op pH = 7,0 is gebracht met een oplossing van 0,2 mol K₂CO₃ in 1 l gedestilleerd water. Er wordt gedurende 16 uur bij 4 °C gedialyseerd, waarna de gedialyseerde vloeistof wordt gecentrifugeerd bij 160.000 N/kg gedurende 20 minuten. De immuunglobuline-oplossing wordt opgeslagen in flacons van 1 ml bij een temperatuur van -20 °C.

Het immuunglobuline gehalte wordt bepaald door van een 10 maal verdunde immuunglobuline-oplossing $A_{260\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$

7807532

en $A_{280\text{ nm}}^1\text{ cm}$ te meten met een spectrophotometer. Het immuunglobuline gehalte G in mg/ml kan dan worden berekend met de formule $G = 10 * [(1,45 * A_{280\text{ nm}}^1\text{ cm}) - (0,75 * A_{260\text{ nm}}^1\text{ cm})]$.

5 1.4. Bereiding van het gouddeeltje-konijne anti HPL immuunglobuline conjugaat.

500 ml van het op de onder 1.1. beschreven wijze bereide goudsol wordt op pH = 7,0 gebracht met behulp van een oplossing van 0,2 mol K_2CO_3 in 1 l gedestilleerd water. Aan 25 ml van dit geneutralizeerde goudsol wordt onder goed roeren druppelsgewijs 0,5 ml van de konijne anti HPL immuunglobuline-oplossing, met een gehalte van 125 μg immuunglobuline per ml, toegevoegd waarna men het sol 10 minuten laat incuberen. Eveneens onder goed roeren wordt hierna 0,5 ml van een 5% (w/v) runderserum albumine (BSA) oplossing in een 5 mmol NaCl/l oplossing in gedestilleerd water, welke op pH = 7,0 gebracht is met een 0,2 mol K_2CO_3 oplossing in 1 l water

20 Het op deze wijze verkregen gouddeeltje-konijne anti HPL immuunglobuline conjugaat wordt gecentrifugeerd bij 25.000 N/kg gedurende 10 minuten, waarna de bovenstaande vloeistof wordt afgezogen. De rode pellet bestaande uit het conjugaat wordt opgenomen in een dusdanig volume (ca. 23 ml) 0,01 mol/l trometamol, op pH = 7,4 gebracht met 0,01 mol/l HCl in gedestilleerd water (0,01 mol/l TRIS/HCl buffer pH = 7,4), dat de uiteindelijke $A_{536\text{ nm}}^1\text{ cm} = 1,00$ is.

25 1.5. Coaten van Microelisa^(R) platen met konijne anti HPL immuunglobulinen

30 Hiertoe wordt een konijne anti HPL immuunglobuline-oplossing gemaakt met een gehalte van 25 μg immuunglobuline per ml, in een oplossing van 0,04 mol Na_2HPO_4 per liter, op pH = 7,4 gebracht met een oplossing van 0,04 mol NaH_2PO_4 per liter, beide in gedestilleerd water, waaraan 0,01% w/v Merthiolaat is toegevoegd.

7807532

In iedere put van de Microelisa^(R) plaat wordt 0,1 ml van bovenstaande immuunglobuline-oplossing toegevoegd, waarna men de plaat 16 uur laat incuberen bij 0 à 4 °C. Hierna wordt in iedere put 0,1 ml 2% (w/v) BSA oplossing in een 0,04 mol/l fosfaatbuffer pH = 7,4 waaraan is toegevoegd 0,01% Merthiolaat, gepipetteerd. Hierna laat men het geheel nog 30 minuten incuberen bij kamertemperatuur. De putten van de Microelisa^(R) platen worden nu leeg gezogen en 3 maal gewassen met gedestilleerd water, waarna ze bij -20 °C worden bewaard tot gebruik.

1.6. Test protocol voor HPL bepaling met gouddeeltje konijne anti HPL immuunglobuline conjugaat.

1.6.a. Bepalen van een standaardcurve voor HPL

- 15 Voor HPL werd een standaardcurve opgesteld volgens het onderstaande protocol.
1. Pipetteer in een putje van een met konijne anti HPL immuunglobuline gecoate Microelisa^(R) plaat 0,1 ml standaard oplossing HPL en incubeer 2 uur bij kamertemperatuur.
 - 20 2. Zuig het putje leeg en was de put met 0,1 ml 0,01 mol/l TRIS/HCl buffer pH = 7,4.
 3. Pipetteer in de put 0,1 ml gouddeeltje konijne anti HPL immuunglobuline conjugaat ($A_{536}^{1\text{ cm}} = 1,00$) en incubeer gedurende een nacht bij kamertemperatuur.
 - 25 4. Zuig het putje leeg en was de put met 0,3 ml 0,01 mol/l TRIS/HCl/NaCl-buffer pH = 7,4.
 5. Pipetteer in de put 0,1 ml 0,1 mol/l HCl-oplossing in water en laat dit gedurende een half uur op een schudapparaat inwerken.
 - 30 6. Meet nu met een klein volume spectrophotometer de licht absorptie bij 536 nm.

De resultaten van de bepaling van een standaardcurve staan vermeld in onderstaande tabel.

78 07 532



HPL concentratie in standaardoplossing ng/ml	$A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ na afloop van de test
0	0,030
0,2	0,030
5 0,8	0,060
3,2	0,106
12,5	0,136
50	0,188
200	0,220

- 10 Het oplosmedium voor de HPL standaardoplossing is
0,04 mol/l fosfaatbuffer + 0,1% BSA + 0,9% NaCl
pH = 7,4.

1.6.b. Bepaling van HPL in het serum van zwangere vrouwen.

- 15 Het serum van zwangeren werd zodanig verdund dat
het HPL gehalte binnen een range van 5 t/m 80 ng/ml lag.
De verdunningsvloeistof voor de sera was 0,04 mol/l
fosfaatbuffer pH = 7,4 + 0,1% w/v BSA + 0,9% w/v NaCl.

- 20 Met behulp van het testprotocol beschreven onder
1.6.a. werd het HPL gehalte van de verdunde sera bepaald
aan de hand van de opgestelde standaardcurve. Na correctie
voor de verdunningsfactor werden de volgende resultaten
gevonden.

serum	HPL gehalte EIA test	HPL gehalte MIA
25 A	$4,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$	$4 \pm 1 \mu\text{g/ml}$
B	$3,2 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$	$3,5 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$
C	$0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$	$1 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$



78 07 532

Voorbeeld II

Bepaling van HPL d.m.v. met gouddeeltjes gelabelde antilichamen en atomaire absorptie spectrophotometrie.

2.1. Bereiding reagentia en gecoate Microelisa^(R) platen.

- 5 De bereidingswijze van het gouddeeltje konijne anti HPL immuunglobuline conjugaat en de Microelisa^(R) platen gecoat met konijne anti HPL immuunglobuline was hetzelfde als beschreven in voorbeeld I.

2.2. Test protocol

- 10 Voor het opstellen van een standaardcurve voor HPL werd een verdunningsreeks voor HPL gemaakt van achtereenvolgens 1, 10, 100 en 1000 ng/ml en een blanco. Het oplosmedium voor HPL was 0,04 mol/l fosfaatbuffer pH = 7,4 waaraan was toegevoegd 0,1% (w/v) BSA en 0,9% (w/v) NaCl.
- 15 1. Pipetteer in het putje van de gecoate Microelisa plaat 0,1 ml standaard HPL oplossing en laat gedurende 2 uur bij kamertemperatuur incuberen.
2. Zuig het putje leeg en was het putje met 0,1 ml 0,02 mol/l TRIS/HCl-buffer pH = 7,4.
- 20 3. Pipetteer in het putje 0,1 ml van het gouddeeltje anti HPL antilichaam conjugaat ($A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,00$) en laat dit gedurende de nacht (ca. 16 uur) incuberen.
4. Zuig het putje leeg en was het putje met 0,02 mol/l TRIS/buffer pH = 7,4.
- 25 5. Pipetteer in het putje 0,1 ml 0,1 mol/l HCl en laat dit onder schudden op een schudmachine gedurende een half uur inwerken.
6. Meet nu met één van een klein volume injector voorziene vlam atomaire absorptie spectrophotometer de
- 30 piekwaarde van de lichtabsorptie bij 242,8 nm.

Een typerend voorbeeld van een op deze wijze verkregen standaardcurve staat in onderstaande tabel.

HPL concentratie in standaardoplossing	piekwaarde licht absorptie bij 242,8 nm na afloop van de test
0 ng/ml	0,020
1 ng/ml	0,040
5 10 ng/ml	0,160
100 ng/ml	0,200
1000 ng/ml	0,220

Voorbeeld III

- 10 Visuele detectie van Hepatitis Bs antigeen (HBsAg) d.m.v.
gouddeeltje schaap anti HBs immuunglobuline conjugaat.

3.1. Bereiding van het goudsol

Zie voorbeeld 1.1.

3.2. Bereiding van schape anti HBsAg sera

- 15 Schapen werden ingespoten met gezuiverd HBsAg
oplossing.

3.3. Bereiding van de schape anti HBsAg immuunglobuline oplossing

- 20 Aan 10 ml schape anti HBsAg serum wordt 1,4 g vast
 Na_2SO_4 toegevoegd. Nadat al het natriumsulfaat is opgelost
laat men de troebele vloeistof 1 uur bij kamertemperatuur
staan. Hierna wordt de vloeistof gecentrifugeerd bij
25.000 N/kg gedurende 10 minuten. De bovenstaande vloeistof
wordt afgezogen en het residu wordt geredispergeerd in
25 10 ml 14% w/v Na_2SO_4 oplossing in gedestilleerd water.
Deze procedure wordt nog 2 x herhaald.

Na de laatste maal centrifugeren en afzuigen van de
bovenstaande vloeistof wordt de pellet opgelost in 10 ml
van een 0,9% w/v NaCl oplossing in gedestilleerd water.

- 30 Deze oplossing wordt gedialyseerd tegen 6 liter van een
0,03% w/v NaCl oplossing in gedestilleerd water, op
pH = 7,0 gebracht met een oplossing van 0,2 mol/l K_2CO_3 .
Er wordt gedurende 16 uur gedialyseerd bij 4 °C, waarna
de gedialyseerde vloeistof gedurende 20 minuten wordt
35 gecentrifugeerd bij 160.000 N/kg.

7807532

De immuunglobuline-oplossing wordt in porties van 1 ml opgeslagen in flacons bij -20°C . Het immuunglobuline gehalte wordt bepaald met de reeds eerder beschreven $A_{260\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$, $A_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ methode.

5 3.4. Bereiding van het gouddeeltje schape anti HBsAg immuunglobuline conjugaat

De bereiding van het conjugaat is identiek met de bereidingswijze beschreven in voorbeeld I punt 4 met als wijziging dat i.p.v. de konijne anti HPL immuunglobuline-oplossing een verdunde oplossing (ook 125 ng
10 immuunglobuline per ml) van de schape anti HBsAg immuunglobuline-oplossing werd gebruikt.

3.5. Coaten van Microelisa^(R) platen met schape anti HBsAg immuunglobulinen

15 De coating van Microelisa^(R) platen met schape anti HBsAg immuunglobulinen geschiedde op dezelfde wijze als beschreven in voorbeeld I punt 5, waarbij in plaats van een konijne anti HPL immuunglobuline-oplossing de schape anti HBsAg immuunglobuline-
20 oplossing werd gebruikt. Per plaat werden een tiental controleputjes opgenomen welke werden gecoat met een immuunglobuline-oplossing uit menselijk serum, dat negatief was in de volgende testen.

- Hepanosticon en Hepanostica
- 25 - Monosticon
- Rheumanosticon
- Immunodiffusie tegen normaal schape serum
- EIA voor anti-HBs.

3.6. Testprotocol voor visueel afleesbare test voor HBsAg

- 30 1. Pipetteer 0,1 ml van het monster in een put van de gecoate Microelisa plaat en incubeer 2 uur bij 37°C .
2. Was iedere put 3 x met 0,3 ml 0,02 mol/l TRIS/HCl-buffer pH = 7,4.
3. Pipetteer in de put 0,1 ml gouddeeltje schape anti
35 HBsAg conjugaat ($A_{536\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,00$) en incubeer gedurende een nacht bij kamertemperatuur.

7807532

4. Zuig 't putje leeg en was de put 3 x met 0,3 ml 0,01 mol/l TRIS/HCl/NaCl-buffer pH = 7,4.
5. Pipetteer in de put 0,1 ml 0,1 mol/l HCl-oplossing in gedestilleerd water en laat dit gedurende een half uur op een schudapparaat inwerken.
6. Beoordeel visueel de kleur van de op vloeistof in de put en vergelijk met de aanwezige controleputten.

Sera, welke sterk positief reageerden in de Hepanostica-test waren in 't algemeen bij 8-voudige verdunning visueel nog te onderscheiden van de blanco's.

Voorbeeld IV

Bepaling van testosteron met behulp van een zilver-deeltje testosteron-11 α -succinyl runderserumalbumine-conjugaat.

4.1. Bereiding van het zilversol

8,5 ml van een 1% w/v AgNO₃-oplossing in gedestilleerd water wordt verdund met 486,5 ml gedestilleerd water, en hieraan wordt toegevoegd 5,0 ml van een 1% w/v oplossing van trinatriumcitraat.2H₂O in gedestilleerd water. Bij kamertemperatuur en onder goed roeren met een magnetische roerder wordt aan deze oplossing 40,0 ml van een 1% w/v oplossing van hydrazine in gedestilleerd water toegevoegd. Binnen 60 seconden ontstaat een grijs-geel-groenig zilversol met een sterke Tijndal verstrooiing. Na 10-voudige verdunning met gedestilleerd water was de pH = 8,85 en had het sol een licht absorptie van $A_{416 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 0,83$.

20 ml van het onverdunde sol werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 25.000 N/kg. 15 ml van de bovenstaande vloeistof wordt afgezogen en vervangen door 15 ml van een 0,01% w/v trinatriumcitraat.2H₂O-oplossing in gedestilleerd water (pH = 6,88).

Deze wassing wordt nog 2 x herhaald. Na de laatste keer aanvullen tot 20 ml met de 0,01% w/v natriumcitraat-

7807532

oplossing had het sol na viermaal verdunnen met gedestilleerd water de volgende eigenschappen:

$$\lambda_{\text{max}} = 416 \text{ nm}$$

$$A_{416 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,12$$

5 pH = 7,0

4.2. Bereiding van testosteron-11 α -hemisuccinaat-BSA

40 mg testosteron-11 α -hemisuccinaat wordt opgelost in 2 ml dimethylformamide (DMF) en daarna afgekoeld tot -15 °C.

10 140 mg runderserumalbumine wordt opgelost in 3 ml gedestilleerd water, waarna er 1 druppel 4N NaOH en 2 ml DMF aan wordt toegevoegd. Afkoelen tot -15 °C.

Aan de steroidoplossing wordt nu 12,5 μ l N-methyl-morpholine en 12,5 μ l isobutylchlorformiaat toege-
15 voegd. Na 3 minuten wordt deze oplossing toegevoegd aan de BSA-oplossing. Na 1 uur roeren bij -15 °C en 3 uur bij 0 °C wordt de oplossing overgebracht in een dialyse slang en gedurende de nacht gedialyseerd tegen stromend leidingwater. Het dialysaat wordt,
20 eventueel na centrifugeren over een Sephadex G25 kolom geleid en de eiwitfractie wordt opgevangen en droog-gevroren.

4.3. Bereiding van antisera voor Testeron

Konijnen werden geïmmuniseerd door inspuiting
25 met 1,25 mg testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA, opgelost in 2,5 ml fysiologisch zout en 2,5 ml compleet Freund's adjuvans (1 ml i.m. 3 x tussentijd 1 week). Hierna werden ze i.v. ingespoten met 1 ml van een oplossing van 1,25 mg testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA in 5 ml
30 fysiologisch zout.

Dit spuit-schema werd herhaald tot de titer van het antiserum voldoende was. De konijnen werden ontbloed en de sera opgeslagen bij -20 °C tot gebruik.



4.4. Bereiding van polystyreen buisjes gecoat met konijne immuunglobulinen tegen testosteron

Een konijne anti testosteron immuunglobuline-oplossing wordt gemaakt door uitzouten met 18% w/v Na_2SO_4 zoals beschreven in voorbeeld I punt 2.

De gedialyseerde immuunglobuline-oplossing wordt verdund (tot een concentratie van 1 μg immuunglobuline/ml) met een buffer bestaande uit 0,1 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6% w/v sucrose op pH = 7,4 gebracht met 4 mol/l NaOH.

In iedere polystyreen buis van 3 ml wordt 1 ml van de immuunglobuline-oplossing gepipetteerd en overnacht geïncubeerd bij kamertemperatuur. Daarna worden de buizen leeggezogen en gevuld met 1 ml 1% w/v BSA oplossing in bovengenoemde buffer. Na twee uur worden de buizen leeggezogen en 3 x gewassen met 3 ml gedestilleerd water. De buizen worden goed drooggezogen en overnacht verder gedroogd boven silicagel. Hierna worden de buizen verpakt in porties van 25 stuks en een zakje silicagel in een aluminiumfolie en opgeslagen bij 4 °C.

4.5. Bereiding van zilverdeeltje-testosteron-11 α -hemi-succinyl-BSA-conjugaat

20 ml van het zilversol, bereid zoals beschreven in 4.1., werd verdund met 80 ml 0,03% w/v NaCl en op pH = 7,0 gebracht met 0,01 mol/l NaOH-oplossing in gedestilleerd water. $A_{421 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,08$.

Aan 15 ml van dit sol wordt onder goed roeren met een magnetische roerder, druppelsgewijs toegevoegd 3 ml van een oplossing van 175 μg testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA per ml in 0,03% w/v NaCl op pH = 7,0 met 0,01 mol/l NaOH.

Men laat ca. 10 minuten incuberen waarna er 2 ml 1% w/v Carbowax 20M-oplossing in 0,03% w/v NaCl op pH = 7,0 met 0,01 mol/l NaOH aan wordt toegevoegd. Het ruwe conjugaat wordt vervolgens gewassen door 10 ml te centrifugeren bij 25.000 N/kg gedurende 20 minuten.

78 07 532

9 ml supernatant wordt nu afgezogen en vervangen door 9 ml wasvloeistof bestaande uit een 1^o/oo w/v Carbowax 20M-oplossing in 0,03% w/v NaCl op pH = 7,0 gebracht met 0,01 mol/l NaOH opgelost in gedestilleerd water.

- 5 Na 3 x wassen wordt nogmaals gecentrifugeerd waarna de bovenstaande vloeistof wordt afgezogen. Het residu wordt geredispergeerd in 0,02 mol/l fosfaatbuffer pH = 7,4. De conjugaatoplossing heeft nu een pH van 7,4 en $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,08$. De gewassen conjugaten opslaan bij 4 °C tot gebruik.
- 10

4.6. Testprotocol voor de bepaling van testosteron met het zilverdeeltje-testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA-conjugaat

1. Pipetteer 1 ml monster een met konijne anti-testosteron immuunglobulinen gecoate polystyreen buis en laat 2 uur incuberen bij kamertemperatuur.
- 15 2. Zuig de buis leeg en was 3 x met 2 ml 0,02 mol/l fosfaatbuffer pH = 7,0.
3. Pipetteer in de buis 1 ml van het zilverdeeltje testosteron-11 α -hemisuccinyl-BSA-conjugaat
- 20 $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 1,08$ en incubeer gedurende 16 uur.
4. Zuig de buis nu leeg en was met 2 ml 0,02 mol/l fosfaatbuffer pH = 7.
5. Pipetteer in de buis 1 ml 0,1 mol/l HCl-oplossing
- 25 in gedestilleerd water en laat dit gedurende een half uur inwerken.
6. Meet hierna van de vloeistof in de buis $A_{421\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$.

4.7. Resultaten

- Met behulp van een standaardcurve werden test-media colorimetrisch bepaald, waarbij hoeveelheden testosteron konden worden aangetoond van 0,5 ng/ml en hoger.
- 30

78 07 532



Voorbeeld V

Bepaling van de titer van menselijke anti Rubella sera

5.1. Bereiding van het Rubella antigeen.

200 ml van een gastheercel (BHK 21C3 van 't Rijks
5 Instituut voor Volksgezondheid RIV) suspensie in kweek-
medium (concentratie 10^5 levende cellen per ml) wordt
in een rolflask (oppervlakte 490 cm^2) gebracht. De cel-
kweek wordt 16 tot 20 uur bewaard bij 37°C . Hierna
wordt het kweekmedium verwijderd en wordt de cellaag
10 2 maal gewassen met 20 ml fosfaat gebufferde NaCl-
oplossing (PBS). Hierna wordt 10 ml virus-suspensie
(virustype M33 RIV) 1:100 verdund met PBS in de fles
gebracht, waarna ca. $2\frac{1}{2}$ uur bij 37°C wordt geïncubeerd.

Nu wordt 100 ml onderhoudsmedium toegevoegd waarna
15 de kweek wordt bewaard bij 37°C . Na minimaal 64 uur
en maximaal 136 uur, afhankelijk van de beoordeling van
het cytopathologisch effect, wordt de geïncubeerde
monolayer geïnfecteerde cellen geoogst. Het onderhouds-
medium wordt verwijderd en de monolaag cellen wordt
20 1 maal gewassen met 20 ml PBS. De cellen worden van
de wand los gemaakt d.m.v. steriele glasparels, opge-
nomen in 90 ml PBS en ingevroren bij -20°C .

Na ontdooien wordt aan 90 ml celsuspensie 10 ml
1 mol/l glycine-oplossing, op pH = 9,0 gebracht met
25 vast NaOH, toegevoegd en wordt het geheel gedurende
6 uur bij 37°C goed gemengd. De celsuspensie wordt
nu gedurende 30 minuten geultrasoneerd onder koelen
met ijs en vervolgens gecentrifugeerd bij 4°C ,
30.000 N/kg gedurende 30 minuten. De Rubella virus
30 bevattende supernatant wordt verzameld en geïnactiveerd
door achtereenvolgens toe te voegen:
1 op 100 volumedelen 1 mol/l NaOH-oplossing in gedest. water
1 op 100 volumedelen vers bereide 10% β -propiolacton-
oplossing in gedest. water.

35 Men laat de vloeistof 48 uur staan bij 4°C , waarna ze
wordt gecentrifugeerd gedurende 30 minuten bij 30.000 N/kg

7807532

en 4 °C. De supernatant is de Rubella virus bevattende vloeistof, welke zonodig bij -20 °C kan worden opgeslagen tot gebruik.

5.2. Coaten van Microelisa^(R)-platen met Rubella antigeen

5 De Rubella antigeenoplossing, bereid zoals beschreven in 5.1., wordt 1:100 verdund met een 0,05 mol/l carbonaatbuffer pH = 9.6. In ieder putje van de Microelisa-plaat wordt 100 µl van deze verdunde Rubella antigeen-oplossing gepipetteerd en men laat dit gedurende
10 16 uur incuberen bij 4 °C. De putjes van de Microelisa^(R)-plaat worden nu leeg gezogen en 3 maal gewassen met 300 µl 0,05 mol/l fosfaatbuffer pH = 7,4, waaraan is toegevoegd 0,9% (w/v) NaCl en 0,05% (w/v) Tween 20.

5.3. Bereiding van schape-anti-menselijk-immuunglobuline-oplossingen

15 Normaal menselijk serum wordt uitgezouten met 14% (w/v) Na₂SO₄, hetwelk in kleine porties in vaste vorm wordt toegevoegd. Na 1 uur staan bij kamertemperatuur wordt de troebele vloeistof gecentrifugeerd bij
20 25.000 N/kg gedurende 10 minuten. De bovenstaande vloeistof wordt afgezogen, waarna het residu wordt gewassen met een 14% (w/v) Na₂SO₄-oplossing in gedestilleerd water. Na centrifugeren en afzuigen van de bovenstaande vloeistof wordt het residu opgelost in 0,9% (w/v) NaCl,
25 waarna de immuunglobuline-oplossing 48 uur wordt gedialyseerd tegen 0,9% (w/v) NaCl bij 4 °C. Hierna wordt het immuunglobuline-gehalte bepaald via de $A_{260}^{1\text{ cm}}$, $A_{280}^{1\text{ cm}}$ methode.

Schapen werden geïmmuniseerd met een verdunde oplossing
30 van deze menselijk immuunglobuline-oplossing, volgens onderstaand schema:

7807532

- dag 1 0,5 mg menselijk immuunglobuline opgelost in
0,5 ml fysiologische zoutoplossing, waaraan
is toegevoegd 0,5 ml compleet Freunds adjuvans.
Injectie: intramusculair.
- 5 dag 14 1,0 mg menselijk immuunglobuline opgelost in
0,5 ml fysiologische zoutoplossing, waaraan is
toegevoegd 0,5 ml incompleet Freunds adjuvans.
Injectie: intramusculair.
- 10 dag 28 2,0 mg menselijk immuunglobuline opgelost in
0,5 ml fysiologische zoutoplossing, waaraan is
toegevoegd incompleet Freunds adjuvans.
Injectie: intramusculair.
- dag 42 1,0 mg menselijk immuunglobuline opgelost in
1,0 ml fysiologische zoutoplossing.
- 15 Injectie: intraveneus.
- dag 56 Bloedafname.

De immuunglobuline-frakties werden uit de schape-
anti-menselijk-immuunglobulinesera uitgezouten met
20 behulp van de boven beschreven 14% (w/v) Na_2SO_4 methode.
Na de derde maal wassen werd het residu opgelost in
0,9% w/v NaCl waarna de immuunglobuline-oplossing werd
gedialyseerd tegen een 0,03% w/v NaCl-oplossing in
gedestilleerd water op pH = 7,0 gebracht met 0,2 mol/l
25 K_2CO_3 opgelost in gedestilleerd water.

Na centrifugering van deze gedialyseerde schape-
anti-menselijk-immuunglobuline-oplossing gedurende
15 minuten bij 160.000 N/kg, werd het immuunglobuline-
gehalte bepaald met de $A_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$, $A_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ methode.

30 5.4. Bereiding van het gouddeeltje-schape-anti-menselijk
immuunglobuline-conjugaat

Het goudsol werd bereid volgens de methode be-
schreven in 1.1. en het conjugaat werd bereid analoog
aan de methode beschreven onder 1.4., waarbij in dit
35 geval de onder 5.3. bereide schape-immuunglobuline-
oplossing werd gebruikt, met een immuunglobuline-gehalte

7807532

van 125 µg per ml.

5.5. Testprotokol

Het monster menselijk serum wordt 1:25 verdund met 0,2 mol/l Trometamol/HCl/NaCl buffer pH = 7,4

5 waaraan is toegevoegd 0,05% (w/v) Tween 20.

1. Per putje wordt 100 µl verdund menselijk serum gepipetteerd en gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd.

10 2. Het putje wordt leeg gezogen en 3 maal gewassen met 300 µl 0,2 mol/l Trometamol/HCl/NaCl buffer pH = 7,4 waaraan is toegevoegd 0,05% (w/v) Tween 20.

3. In de put wordt nu 100 µl gouddeeltje-schape-anti-menselijk immuunglobuline conjugaat ($A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 1,00$) gepipetteerd en men laat gedurende 16 uur incuberen
15 bij kamertemperatuur.

4. Het putje wordt leeg gezogen en 3 maal gewassen met 300 µl 0,01 mol/l Trometamol/HCl/NaCl buffer pH = 7,4 waaraan is toegevoegd 0,05% (w/v) Tween 20.

5. Pipetteer in de put 100 µl 0,1 mol/l HCl opgelost
20 in gedestilleerd water en laat dit gedurende een half uur op een schudapparaat inwerken.

6. Meet hierna met een klein volume spectrophotometer de lichtabsorptie bij 536 nm.

5.6. Resultaten

25 Voor sera met een HAI titer van 512 werd een $A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ gemeten van ca. 0,230, terwijl er verder een redelijke lineaire correlatie gevonden werd tussen de HAI titer van de onderzochte menselijke sera en de $A_{536 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ -waarden, verkregen volgens de boven be-
30 schreven test.

7807532

Conclusies

1. Werkwijze voor de bepaling van een immunologische component, zoals een hapteen, antigeen of antilichaam, in een waterig testmonster onder gebruikmaking van de immunologische reactiviteit van dergelijke componenten t.o.v. elkaar, met het kenmerk, dat bij de immuno-chemische reactie tussen de te bepalen en aan het testmonster toegevoegde immunologische componenten een gemerkte component wordt toegepast, verkregen door deeltjes van een sol van een metaal of metaal-verbinding direct of indirect te koppelen of te adsorberen aan de gewenste immunologische component, waarbij na afloop van de reactie, eventueel na scheiding van de gebonden en de vrije gemerkte component, in één dezer fracties de aard en/of de hoeveelheid van het metaal wordt bepaald met de daarvoor bekende methoden, welke bepaling een kwalitatieve respectievelijk een kwantitatieve aanduiding geeft van de te bepalen immunologische component.
2. Werkwijze volgens conclusie 1 met het kenmerk, dat de gemerkte component wordt verkregen door aan een metaalsol toe te voegen een bepaalde hoeveelheid van de te merken immunologische component, welke laatste de soldeeltjes geheel of gedeeltelijk omhult, waarna desgewenst een verdere omhulling kan plaats vinden met een immunologisch inert polair macromolecuul.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 met het kenmerk, dat de gemerkte component wordt verkregen door aan een metaalsol toe te voegen één of meer immunologisch inerte hydrophiele macromoleculen, die de metaaldeeltjes omhullen, waarna door adsorptie of via covalente bindingen de immunologische component wordt gekoppeld aan het omhullende materiaal.



78 07 532

4. Werkwijze volgens conclusie 1 met het kenmerk, dat de gemerkte component wordt verkregen door een metaalsol te brengen in een milieu van monomeren, deze laatsten in situ te laten polymeriseren, resp. co-polymeriseren, waardoor omhulling van de metaaldeeltjes volgt, en vervolgens de immunologische component te adsorberen of covalent te koppelen aan het polymere materiaal.
5. Werkwijze volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de metaalsol deeltjes eerst worden beschermd door een hydrophiel macromolecuul, waarna (co-)polymerisatie onder invloed van een anorganische initiator plaats vindt.
6. Werkwijze volgens één of meer der voorafgaande conclusies, met het kenmerk, dat als soldeeltjes worden toegepast goud, zilver of platina of een verbinding van deze metalen.
7. Testkit, te gebruiken bij de bepaling van een immuno-component in een waterig medium, bevattende:
 - a) een metaal-gelabelde immunocomponent, bestaande uit een metaalsol, waarvan de deeltjes ofwel direct omhuld zijn door de gewenste immunocomponent, ofwel door een inert polymeer, waaraan de immuno-component is gekoppeld;
 - b) overige reagentia.

78 07 532