



Erfnungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

11

633 370

21 Gesuchsnummer: 9991/77

73 Inhaber:
Mitsubishi Chemical Industries Limited,
Chiyoda-ku/Tokyo (JP)

22 Anmeldungsdatum: 16.08.1977

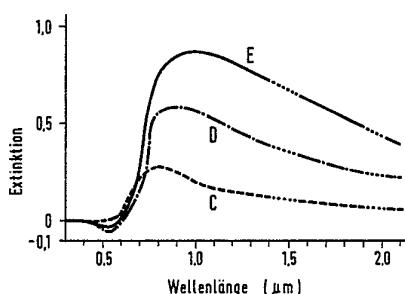
72 Erfinder:
Masanobu Sawai, Yamato-shi/Kanagawa (JP)
Tadamitsu Sudo, Sagamihara-shi/Kanagawa (JP)
Shogo Enomoto, Tokorozawa-shi/Saitama (JP)

24 Patent erteilt: 30.11.1982

74 Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

54 Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und Antikörpern.

57 Ein Antikörper oder Antigen wird an unlöslichen Trägerteilchen mit einem Durchmesser von höchstens 1,6 µm zwecks Sensibilisierung derselben fixiert, der am Trägermaterial fixierte Antikörper oder Antigen wird mit einem entsprechenden Antigen bzw. Antikörper in einem flüssigen Medium umgesetzt und die Reaktionsmischung wird mit Licht einer Wellenlänge zwischen 0,6 und 2,4 µm bestrahlt, welche mindestens 1,5mal länger als der Durchmesser der Träger teilchen ist. Gemessen wird die Extinktion der Reaktionsmischung.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und Antikörpern durch Fixieren eines Antikörpers oder eines Antigens an unlöslichen Trägerteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von nicht mehr als 1,6 µm, um die unlöslichen Trägerteilchen zu sensibilisieren, Umsetzen des auf dem Trägermaterial vorliegenden Antikörpers und/oder Antigens mit einem entsprechenden Antigen oder Antikörper oder einer Mischung davon in einem flüssigen Medium, Bestrahlen der Reaktionsmischung mit Licht und Messung der Extinktion der Reaktionsmischung, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktionsmischung mit Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm, die um einen Faktor von mindestens 1,5 länger ist als der durchschnittliche Durchmesser der Trägerteilchen, bestrahlt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten unlöslichen Trägerteilchen einen durchschnittlichen Durchmesser im Bereich von 0,1 bis 1,0 µm, vorzugsweise von 0,2 bis 0,8 µm, aufweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Trägerteilchen ein feines Pulver aus hochmolekularem Polystyrolatex verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung während einer vorherbestimmten Zeitdauer unter spezifischen Bedingungen durchführt und anschliessend die Extinktion der Reaktionsmischung misst.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zeitdauer bestimmt, die erforderlich ist, dass die Extinktion der Reaktionsmischung einen vorbestimmten Wert erreicht.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,8 µm bis 1,8 µm, vorzugsweise von 1 bis 1,4 µm, anwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Licht mit einer Wellenlänge anwendet, die um einen Faktor von mindestens 2 länger ist als der durchschnittliche Durchmesser der Trägerteilchen.

8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Trägerteilchen in einer solchen Menge verwendet, dass die Konzentration des Trägermaterials in der Reaktionsmischung 0,1 bis 1 Gew.-% beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als flüssiges Medium Wasser oder eine Mischung aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst ein Antigen oder einen Antikörper zu einer zu untersuchenden Flüssigkeit, die den zu bestimmenden Antikörper oder das zu bestimmende Antigen enthält, zusetzt und damit umsetzt und anschliessend eine Suspension der unlöslichen Trägerteilchen, an die ein besonderes Antigen oder ein besonderer Antikörper fixiert ist, zugibt und mit der bei der ersten Reaktion gebildeten Reaktionsmischung umsetzt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und Antikörpern durch Fixieren eines Antikörpers oder eines Antigens an unlöslichen Trägerteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von nicht mehr als 1,6 µm, um die unlöslichen Trägerteilchen zu sensibilisieren, Umsetzen des auf dem Trägermaterial vorliegenden Antikörpers und/oder Antigens mit einem entsprechenden Antigen oder Antikörper oder einer Mischung davon in einem flüssigen Medium, Bestrahen der Reaktionsmischung mit Licht und Messung der Extinktion der Reaktionsmischung.

Es besteht ein ständiges Bedürfnis für ein Verfahren zur schnellen und genauen qualitativen und quantitativen Bestim-

mung von biologisch aktiven Substanzen, beispielsweise Antigenen und Antikörpern, die in extrem geringen Konzentrationen vorliegen. Es besteht außerdem ein starkes Bedürfnis dafür, die Anwesenheit von Drogen oder Arzneimitteln in Körperflüssigkeiten festzustellen. Weiterhin ist es für die medizinische Diagnose häufig wichtig, über die Anwesenheit von verschiedenen Substanzen Bescheid zu wissen, die auf natürlichem Wege von dem Körper synthetisiert werden oder in den Körper eingeführt werden sind.

10 Bislang ist es bereits bekannt, Antikörper oder Antigene halbquantitativ dadurch nachzuweisen, dass man Latexteilchen, an die man einen Antikörper oder ein Antigen fixiert hat, mit einem entsprechenden Antigen oder Antikörper auf einer Glasplatte umsetzt und visuell den Agglutinationszustand beobachtet.

Aus den folgenden Veröffentlichungen ist es bekannt, Antigene und Antikörper unter Verwendung der oben erwähnten Latexteilchen quantitativ zu bestimmen, indem man einen Antikörper oder ein Antigen an den Latexteilchen fixiert, den auf

20 dem Trägermaterial vorliegenden Antikörper oder das auf dem Trägermaterial vorliegende Antigen mit einem entsprechenden Antigen oder Antikörper umsetzt, um die Latexteilchen zu agglutinieren oder zusammenzuballen, und die Geschwindigkeit der Abnahme der Trübung der überstehenden Flüssigkeit des 25 Latex mit Hilfe von sichtbarem Licht zu messen, um das Antigen oder den Antikörper unter Ausnutzung des Agglutinationsphänomens des als Reagens verwendeten Latex zu bestimmen:

- A) Croatica Chemica Acta, 42 (1970) 457–466; und
- B) European Journal of Biochemistry, Vol. 20, Nr. 4 (1971)

30 558–560.

Da die Methode gemäss dem obigen Vorschlag die Messung der Geschwindigkeit der Trübungsabnahme dazu benutzt, das Antigen oder den Antikörper zu bestimmen, ist es erforderlich, einen mit dem Antikörper oder dem Antigen sensibilisierten

35 Latex mit extrem geringer Konzentration, die beispielsweise im Bereich von 0,007 bis 0,028 % liegt, zu verwenden, die Reaktion des Latex und des Antigens und des Antikörpers in einem stationären Zustand durchzuführen, irgendwelche Verunreinigungen, die die Trübung der Probe beeinträchtigen könnten, zu

40 entfernen und ähnliche Massnahmen zu ergreifen. Als Ergebnis davon ist die oben erwähnte Methode nachteilig dadurch, dass die Geschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion unvermeidbar vermindert wird, dass sowohl die Präzision als auch die Reproduzierbarkeit für die Bestimmung von Antigenen oder

45 Antikörpern ungenügend sind und dass die Abtrennung von Verunreinigungen häufig extrem komplizierte Massnahmen erforderlich macht. Demzufolge ist es schwierig, die obige Methode zur Bestimmung von Antigenen, wie Fibrinogen (Fg), Humanchoriongonadotropin (hCG) oder ähnliche Materialien zu verwenden, bei denen komplizierte Massnahmen zur Herstellung des notwendigen Reagens erforderlich sind und bei denen es schwierig ist, eine reproduzierbare Agglutinationsreaktion der Substanz zu erreichen, die in Blut oder Urin enthalten ist, das bzw. der verschiedene andere Substanzen enthält, die die 50 55 Reaktion beeinträchtigen können.

Aus

C) Immunochemistry, Vol. 12 (1975) 349 bis 351 ist es bereits bekannt, Antikörper oder Antigene quantitativ dadurch zu bestimmen, dass man die oben erwähnten agglutinierten Latexteilchen mit einem Laserstrahl und die Änderung der Breite der Spektrallinien des gebeugten Lichts des Laserstrahls misst,

60 um die mittlere Diffusionskonstante (\bar{D}) zu bestimmen, die einen Hinweis auf die Brown'sche Bewegung der agglutinierten Teilchen gibt, die ihrerseits umgekehrt proportional ist der Grösse der agglutinierten Teilchen.

Da bei dieser Methode der den Antikörper oder das Antigen tragende Latex in extrem geringer Konzentration verwendet wird, beispielsweise in einer Konzentration von lediglich

0,001%, wird die Geschwindigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion vermindert, so dass sowohl die Präzision als auch die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu wünschen übrig lassen. Weiterhin besitzt diese Methode den Nachteil, dass komplizierte Berechnungen unter Anwendung von Spektrumanalysenmethoden erforderlich sind, was komplizierte Massnahmen notwendig macht, und dass irgendwelche in der Probe vorhandenen Verunreinigungen vor der Messung entfernt werden müssen. Demzufolge hat sich auch diese Methode in der Praxis nicht durchsetzen können.

Die obige Literaturstelle C beschreibt ferner, dass die Bestimmung mit Hilfe der in der Literaturstelle A angegebenen Trübungsmessmethode extrem ungenaue Ergebnisse liefert (siehe die Fig. 2 auf Seite 350 dieser Veröffentlichung).

Aus der DE-OS 22 04 684 ist weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern bzw. Antigenen in einer Körperflüssigkeit bekannt, bei dem in einem Testgemisch, das neben anderen Stoffen die Körperflüssigkeit, einen Träger und serologisch bestimmende Materialien enthält, Agglutinationskomplexe beobachtet werden, wobei als serologisch bestimmende Materialien Antikörper bzw. Antigene verwendet werden, welche an einem serologisch inerten Latexträger mit einer Teilchengröße von 0,05 bis 0,9 µm gebunden sind, und die Lichtabsorption des Testgemisches nach dessen Aufteilung durch Lufteinschlüsse in Teilströmen automatisch gemessen wird. Dieses Verfahren vermag jedoch in seiner Präzision der Messung nicht vollständig zu befriedigen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein Verfahren der eingangs genannten Gattung anzugeben, mit dem die Antikörper- bzw. Antigene in der zu untersuchenden Probe mit hoher Präzision und mit guter Reproduzierbarkeit schnell bestimmt werden können und ferner schnell nachgewiesen werden kann, ob die Konzentration eines Antikörpers oder eines Antigens in einer Probe oberhalb oder unterhalb eines bestimmten Wertes liegt. Dabei soll eine extrem geringe Menge der Probe ausreichend sein und auch extrem geringe Mengen des Antigens und/oder Antikörpers mit einer Präzision gemessen werden können, die der bei dem Radioimmuntest erreichten entspricht, jedoch wesentlich schneller und sicherer. Das Verfahren soll ferner nicht nur zur Bestimmung von multivalenten oder polyfunktionellen Antigenen sondern auch von unvollständigen Antigenen, beispielsweise Haptenen geeignet sein und nicht nur die Agglutination der Antikörper und/oder Antigene ausnutzen, sondern auch sie inhibierende Wirkungen.

Gelöst wird diese Aufgabe ausgehend von einem Verfahren der eingangs genannten Art dadurch, dass man die Reaktionsmischung mit Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm, die um einen Faktor von mindestens 1,5 länger ist als der Durchmesser der Trägerteilchen, bestrahlt.

Der Grund hierfür ist darin zu sehen, dass das Ausmass der Antigen-Antikörper-Reaktion in Gegenwart der sensibilisierten unlöslichen Trägerteilchen sehr genau proportional ist der Intensität des durch die Mischung geführten Lichtes. Es ist ersichtlich, dass das Ausmass der Antigen-Antikörper-Reaktion auch proportional ist der Menge (oder der Konzentration) des Antikörpers und/oder des Antigens in der Probe, vorausgesetzt, dass die Reaktion unter spezifischen Bedingungen durchgeführt wird.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstands sind in den Unteransprüchen beschrieben.

Das obige erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine schnelle Bestimmung eines Antikörpers und/oder eines Antigens in einer Probe mit extrem grosser Präzision unter Anwendung einer Technik, die sich von den herkömmlichen Methoden erheblich unterscheidet, bei denen die Trübung oder die mittlere Diffusionskonstante bestimmt werden.

Das Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm, das erfindungsgemäss angewandt wird, liegt im Be-

reich des nahen Infrarots oder in einem Teil des sichtbaren Bereiches, der sich an das nahe Infrarot anschliesst. Vorzugsweise verwendet man erfindungsgemäß ein Licht, dessen Wellenlänge im nahen Infrarot liegt und 0,8 bis 1,8 µm und vorzugsweise 1 bis 1,4 µm beträgt. Zur Untersuchung von Molekülstrukturen oder Eigenschaften der Moleküle ist es bereits bekannt, Spektralanalysen durchzuführen, bei denen man Licht mit einer im infraroten Bereich liegenden Wellenlänge von mindestens 2,5 µm oder Licht mit einer im ultravioletten Bereich liegenden Wellenlänge von nicht mehr als 0,4 µm verwendet. Das Licht des nahen Infrarots oder des sich daran anschliessenden sichtbaren Bereichs, das erfindungsgemäß angewandt wird, und das der Vereinfachung halber im folgenden als «Licht des nahen Infrarotbereiches» bezeichnet wird, ist bislang nur begrenzt angewandt worden und hat nur geringes Interesse gefunden.

Es wurde nunmehr gefunden, dass das Licht des nahen Infrarotbereiches sehr gut durch wässrige Medien, die im allgemeinen die Grundmedien von Antigene oder Antikörper enthaltenden Proben darstellen, wie Wasser, Sera, Urin, Salzlösungen etc., sowie die Grundmedien der oben erwähnten Latices, hindurchdringt, wobei insbesondere das Licht des nahen Infrarotbereiches mit einer Wellenlänge von 0,8 bis 1,4 µm und von 1,53 bis 1,88 µm von den wässrigen Medien nur in geringem Ausmass absorbiert wird. Es hat sich ferner gezeigt, dass, wenn man die durch Umsetzen der mit dem Antikörper oder dem Antigen sensibilisierten unlöslichen Trägerteilchen, die einen durchschnittlichen Durchmesser von nicht mehr als 1,6 µm, vorzugsweise von 0,1 bis 1 µm, aufweisen, mit dem Antigen und/oder dem Antikörper in der Probe unter Bildung der Agglutination erhaltene Reaktionsmischung mit Licht aus dem oben erwähnten nahen Infrarotbereich mit einer Wellenlänge, die um einen Faktor von mindestens 1,5 und vorzugsweise von mindestens 2 länger ist als der durchschnittliche Durchmesser der Trägerteilchen, bestrahlt, die Intensität des durch die Reaktionsmischung hindurchgeführten Lichtes sehr genau dem bei der Antigen-Antikörper-Reaktion erreichten Agglutinationsgrad entspricht. Die Durchlässigkeit für das oben erwähnte und erfindungsgemäß verwendete Licht entspricht der Extinktion A, die man mit Hilfe von Spektrophotometern bestimmen kann,

beispielsweise jenen Vorrichtungen, wie sie im allgemeinen für die Infrarotspektrometrie verwendet werden, so dass diese Durchlässigkeit im folgenden der Einfachheit halber als Extinktion bezeichnet wird.

Die mit Hilfe des Infrarotspektrometers bestimmte Extinktion A entspricht der folgenden Formel:

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

in der

⁵⁰ I_0 für die Intensität des durch die lediglich das Lösungsmittel enthaltende Absorptionszelle hindurchgeführten Lichtes und

I für die Intensität des durch die eine Lösung einer bestimmten Konzentration enthaltende Zelle hindurchgeführten Lichtes stehen.

⁵⁵ Demzufolge wird die oben angesprochene Durchlässigkeit im folgenden der Einfachheit halber als «Extinktion (A)» bezeichnet.

Erfindungsgemäß kann die Bestimmung der Extinktion A mit Hilfe eines Spektrophotometers erfolgen, das ähnlich den

⁶⁰ Spektrophotometern ist, die man für den nahen Infrarotbereich verwendet, wobei man erfindungsgemäß Licht des oben angesprochenen nahen Infrarotbereiches verwendet und die obige Formel benutzt.

Wenn das Grundmedium der Probe ein transparentes flüssiges Medium ist, kann man die Bestimmung des Wertes von I_0 bequem in der Weise durchführen, dass man die Suspension, die mit dem Antikörper oder dem Antigen sensibilisierten unlöslichen Trägerteilchen enthält, verwendet, welche Suspension

man beispielsweise mit Wasser auf die gleiche Konzentration wie die Mischung verdünnt hat.

Die Erfahrung wird im Folgenden näher erläutert. Dabei ist auf die beigefügten Zeichnungen Bezug genommen. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 das Absorptionsspektrum von Wasser unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 μm , das in einer Absorptionszelle mit einer Dicke von 1 mm aufgenommen wurde;

Fig. 2 anhand einer Kurve die Änderung der Extinktion mit dem Durchmesser der Teilchen eines Polystyrollatex;

Fig. 3 anhand einer Kurve die Änderung der Extinktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit einer Antigen-Antikörper-Reaktion;

Fig. 4 ein schematisches Diagramm, das den Grundaufbau einer zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung wiedergibt;

Fig. 5 eine perspektivische Ansicht einer Absorptionszelle, die sowohl für die Proben als auch für die Kontrollproben oder Blindproben geeignet ist;

Fig. 6 eine schematische Darstellung einer Röhreinrichtung, die verwendet werden kann;

Fig. 7 eine Fibrinogen(Fg)-Eichkurve bei einer Wellenlänge von 1,2 μm , die unter Verwendung von Standard-Fibrinogen-Lösungen und Antifibrinogen-Polystyrollatexteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,481 μm ermittelt wurde;

Fig. 8 eine Extinktionseichkurve, die bei einer Wellenlänge von 1,2 μm unter Verwendung von Antifibrinogen-Silicium-dioxidteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,32 μm und einer Reihe von Standard-Fibrinogenlösungen ermittelt wurde;

Fig. 9 eine Eichkurve für die Zeit, die erforderlich ist, dass die Extinktion bei einer Wellenlänge von 1,2 μm den Wert 0,5 erreicht, wenn man ein mit Antifibrinogen sensibilisiertes Latextreagens mit jeder der Standard-Fibrinogenlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen umsetzt;

Fig. 10 eine Extinktionseichkurve, die bei einer Wellenlänge von 1,2 μm aufgenommen wurde, indem man Oxytocin-Antiserum mit jeder der unterschiedlichen Konzentrationen aufweisenden Standard-Oxytocinlösungen umgesetzt hat und dann die Reaktionsmischung mit Latexteilchen versetzt hat, die mit Oxytocin sensibilisiert worden sind;

Fig. 11 eine bei 1,0 μm bestimmte Extinktions-Eichkurve, die dadurch erhalten wurde, dass man Anti-human-choriongonadotropin-Serum mit Standardlösungen von Humanchoriongonadotropin (hCG) mit unterschiedlichen Konzentrationen umgesetzt hat und die erhaltene Reaktionsmischung mit Humanchoriongonadotropin-sensibilisierten Latexteilchen versetzt hat; und

Fig. 12 anhand einer Kurve die Änderung der Nachweisempfindlichkeit mit der Konzentration des mit Antifibrinogen sensibilisierten Polystyrollatex.

In der Fig. 1 ist durch Auftragen der Wellenlänge des Lichtes auf der Abszisse und der prozentualen Transmission des Lichtes auf der Ordinate das prozentuale Transmissionsspektrum einer Wasserschicht mit einer Dicke von 1 mm in einem Wellenlängenbereich von 0,6 bis 2,4 μm dargestellt. Aus der Fig. 1 ist zu erkennen, dass Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 1,4 μm Wasser, das das für Latices und Proben weitestgehend verwendete Grundmedium darstellt, praktisch ohne merkliche Absorption durchdringt und dass Licht mit einer Wellenlänge von 1,53 bis 1,88 μm Wasser ebenfalls im wesentlichen durchdringt, so dass man Licht mit einer Wellenlänge in diesem Bereich bei dem erfundungsgemäßen Verfahren verwenden kann. Es ist ferner aus der Fig. 1 ersichtlich, dass Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 2,1 bis 2,35 μm für Wasser eine Transmission im Bereich von 20% zeigt, so dass man Licht einer solchen Wellenlänge auch in Kombination mit

einem hochempfindlichen Photometer anwenden kann, wenn gleich dies nicht bevorzugt ist.

Die Fig. 2 zeigt die Beziehung zwischen der Extinktion eines Polystyrollatex (mit einem Feststoffgehalt von 1 Gew.-%), die auf der Ordinate aufgetragen ist, und der Wellenlänge des Lichts, die in μm auf der Abszisse aufgetragen ist, wenn man die Bestimmung in einer Absorptionszelle mit einer Dicke von 2 mm durchführt. In der Fig. 2 gibt die Kurve A die Änderung der Extinktion eines Polystyrollatex wieder, dessen Teilchen einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,481 μm aufweisen, während die Kurve B für einen Polystyrollatex steht, dessen durchschnittlicher Teilchendurchmesser 0,804 μm beträgt. Zur Bestimmung der Extinktion wird der Latex vorzugsweise verdünnt, wonach der durch Multiplizieren des beobachteten Extinktionswertes mit dem Verdünnungsfaktor ermittelte Wert als Extinktion des Latex bezeichnet wird.

Aus der Fig. 2 ist zu erkennen, dass die Extinktion des Latex bei einer Wellenlänge von weniger als 0,6 μm stark zunimmt, so dass es schwierig ist, die Änderungen der Lichttransmission einer Antigen-Antikörper-Reaktionsmischung unter Anwendung von Licht einer solchen Wellenlänge zu bestimmen. Wenn man jedoch Licht mit einer Wellenlänge von mindestens 0,8 μm und insbesondere von mindestens 1 μm verwendet, so ist die Extinktion des Latex als solchem relativ gering, so dass Licht mit einer Wellenlänge von mindestens 0,8 μm und vorzugsweise mindestens 1 μm für die oben erwähnte Messung der Lichttransmission geeignet ist.

Vergleicht man in Fig. 2 die Kurve A mit der dort dargestellten Kurve B, so ist festzustellen, dass die Extinktion des Latex mit zunehmendem durchschnittlichen Durchmesser der Polystyrollatexteilchen zunimmt. Demzufolge ist ersichtlich, dass Latexteilchen mit einem extrem grossen durchschnittlichen Durchmesser erfundungsgemäß nicht geeignet sind. Bei Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die erfundungsgemäß geeigneten unlöslichen Trägerpartikel einen durchschnittlichen oder mittleren Teilchendurchmesser von nicht mehr als 1,6 μm aufweisen müssen und dass Latexteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 1 μm bevorzugter und mit einem Durchmesser von 0,2 bis 0,8 μm am bevorzugtesten sind.

Die Fig. 3 gibt die Beziehung zwischen der Änderung der Extinktion einer Antigen-Antikörper-Reaktionsmischung, die auf der Ordinate aufgetragen ist, mit der Wellenlänge des Lichtes, die in μm auf der Abszisse aufgetragen ist, bei verschiedenen Reaktionszeiten wieder, wenn die Antigen-Antikörper-Reaktion genau in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise durchgeführt wird, mit dem Unterschied, dass man einen Polystyrollatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,234 μm einsetzt. Die in der Fig. 3 dargestellten Kurven C, D und E stehen für die Extinktion der Reaktionsmischung nachdem die Antigen-Antikörper-Reaktion während 3, 10 bzw. 20 Minuten durchgeführt worden ist.

Die Fig. 3 lässt erkennen, dass wenn man die Extinktion der Antigen-Antikörper-Reaktionsmischung mit Licht einer Wellenlänge von weniger als 0,6 μm im Wellenlängenbereich von etwa 0,6 bis 0,4 μm bestimmt, das Ausmass der Reaktion (das heisst die Reaktionszeit) der Extinktion nicht entspricht und dass bei Anwendung einer Wellenlänge im Bereich von nicht mehr als etwa 0,4 μm die Extinktion sich in Abhängigkeit von dem Reaktionsfortschritt nicht merklich ändert. Andererseits zeigt bei Anwendung von Licht mit einer Wellenlänge von mindestens etwa 0,75 μm die Extinktion der Reaktionsmischung eine sehr gute Korrelation zwischen der Reaktionszeit oder dem Reaktionsablauf oder Reaktionsgrad. Die in den Kurven C, D und E der Fig. 3 gestrichelt angegebenen Bereiche deuten darauf hin, dass die Extinktion in diesen Wellenlängenbereichen selbst bei erhöhter Schlitzbreite nicht genau bestimmt werden kann, da die Absorption von Wasser in diesen Bereichen sehr hoch ist.

Wie aus dem weiter unten angegebenen Beispiel 4 zu ersehen ist, erzielt man bei Verwendung eines Polystyrolatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,804 µm eine gute Korrelation zwischen der Extinktion der Antigen-Antikörper-Reaktionsmischung und der Konzentration des Antigens, wenn man Licht mit einer Wellenlänge verwendet, die um einen Faktor von mindestens etwa 1,5 grösser ist, als der durchschnittliche Durchmesser der Teilchen, beispielsweise wenn man Licht mit einer Wellenlänge von etwa 1,2 µm verwendet, vorausgesetzt, dass die Konzentration des Antigens in der Probe nicht grösser ist als 0,6 µg/ml. In diesem Fall kann daher die erfundungsgemässe quantitative Bestimmung durch Bestrahlen mit Licht mit einer Wellenlänge von 1,2 µm oder mehr durchgeführt werden.

Wenn man Latexteilchen mit einem relativ geringen durchschnittlichen Durchmesser verwendet, ist es vorteilhaft, wie es aus der Fig. 3 zu ersehen ist, Licht des nahen Infrarotbereiches mit einer Wellenlänge im Bereich von etwa 0,8 bis 1,4 µm und vorzugsweise 1 bis 1,4 µm und mehr, welche Wellenlänge mindestens um den Faktor 2 grösser ist als der durchschnittliche Durchmesser der Trägerteilchen, zu verwenden.

Gemäss einer Ausführungsform der Erfahrung ist es erwünscht, eine Reaktionsmischung aus einem Trägermaterial spezifischer Teilchengrösse, auf dem ein bestimmter Antikörper oder ein bestimmtes Antigen vorliegt und einem bestimmten Antigen oder Antikörper oder einer Mischung davon in einer zu untersuchenden Flüssigkeit mit Licht mit einer geeigneten Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm zu bestrahlen, um zunächst einen Wellenlängenbereich zu ermitteln, in dem eine quantitative Beziehung zwischen der Änderung der Konzentration des besonderen Antigens, des Antikörpers oder der Mischung davon (einschliesslich des Reaktionsproduktes) in der zu untersuchenden Flüssigkeit und der Extinktion der Reaktionsmischung besteht, und anschliessend Licht mit einer innerhalb dieses Wellenlängenbereiches liegenden spezifischen Wellenlänge zur Bestimmung der Extinktion zu verwenden.

Somit ist es erfundungsgemäss möglich, die Menge oder die Konzentration eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer Probe zu bestimmen, indem man unlösliche Trägerteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von nicht mehr als 1,6 µm, der vorteilhafterweise im Bereich von 0,1 bis 1,0 µm, noch bevorzugter im Bereich von 0,2 bis 0,8 µm und am bevorzugtesten im Bereich von 0,3 bis 0,6 µm liegt, verwendet, einen Antikörper oder ein Antigen auf dem Trägermaterial fixiert (das heisst das Trägermaterial mit dem Antikörper oder dem Antigen sensibilisiert), das sensibilisierte Trägermaterial mit dem in der Probe vorliegenden Antigen und/oder Antikörper umsetzt und die Extinktion der Reaktionsmischung unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm, vorzugsweise im Bereich von 0,6 bis 1,8 µm, noch bevorzugter im Bereich von 0,8 bis 1,4 µm und am bevorzugtesten im Bereich von 1 bis 1,4 µm misst. Wie bereits erwähnt sollte das verwendete Licht eine Wellenlänge besitzen, die mindestens um den Faktor 1,5, vorzugsweise mindestens um den Faktor 2 und noch bevorzugter mindestens um den Faktor 2,5 grösser ist als der durchschnittliche Durchmesser der unlöslichen Trägerteilchen.

Als unlösliche Trägerteilchen werden bevorzugt Mikroteilchen aus organischen Polymeren verwendet, die im wesentlichen in dem für die Bestimmung verwendeten flüssigen Medium unlöslich sind und die einen durchschnittlichen Durchmesser innerhalb des oben angegebenen Bereiches aufweisen, beispielsweise Latices von organischen Polymeren, wie Polystyrol und Styrol-Butadien-Copolymere, die man durch Emulsionspolymerisation erhält. Es können aber auch dispergierte Kokkenbakterien, wie Staphylokokken und Streptokokken, Bacillus prodigiosus, Rickettsia, Zellmembranfragmente etc., sowie Mikroteilchen von anorganischen Oxiden, wie Siliciumdioxid, Sili-

ciumdioxid-Aluminiumoxid und Aluminiumoxid und feinpulverisierte Mineralien, Metalle und dergleichen, verwendet werden.

Zur Sensibilisierung der Trägerteilchen kann der Antikörper oder das Antigen physikalisch und/oder chemisch an dem Träger adsorbiert werden. Bei den Antikörpern handelt es sich um Proteine, während die Antigene einer Gruppe von verschiedenartigen Substanzen angehören, beispielsweise Proteine, Polypeptide, Steroide, Polysaccharide, Lipide, Pollen, Staub und dergleichen. Es wurde bereits eine Reihe von Verfahren beschrieben, um diese Antikörper oder Antigene, insbesondere Antikörper auf unlösliche Trägerteilchen, zu fixieren. Um ein unvollständiges Antigen, insbesondere ein Hapten, an unlöslichen Trägermaterialien zu fixieren, ist es vorteilhaft, die Trägermaterialien chemisch zu modifizieren, beispielsweise mit Hilfe eines Kupplungsmittels, und anschliessend das Antigen chemisch an das modifizierte Trägermaterial zu binden.

Die unlöslichen Trägerteilchen, beispielsweise Latexteilchen, die mit einem Antikörper oder einem Antigen sensibilisiert sind (und die im folgenden als «sensibilisierte Trägerteilchen» bezeichnet werden) werden in Form einer Suspension verwendet, die eine Konzentration von nicht weniger als 0,05 Gew.-% und vorzugsweise eine Konzentration im Bereich von 0,1 bis 1 Gew.-% und noch bevorzugter im Bereich von 0,2 bis 0,6 Gew.-% aufweist. Wenn die Konzentration der sensibilisierten Trägerteilchen zu hoch ist, wie es aus der Fig. 2 zu ersehen ist, wird die Durchlässigkeit der Suspension derart vermindert, dass die Messung der Extinktion erschwert wird. Innerhalb des Konzentrationsbereiches, in dem die Messung der Extinktion möglich ist, sind jedoch höhere Konzentrationen der sensibilisierten Trägerteilchen in der Suspension bevorzugt, da es hierdurch möglich wird, die Empfindlichkeit der quantitativen Bestimmung der Antigene und der Antikörper zu steigern.

Die Reaktion kann mit Vorteil unter Bewegung der Reaktionsmischung durchgeführt werden. Da die Reaktion im allgemeinen in einer dünnen Zelle durchgeführt wird, erreicht man das Bewegen der Reaktionsmischung bequemerweise zum Beispiel dadurch, dass man einen Stab vertikal oder transversal durch die Zelle bewegt. Natürlich kann man die sensibilisierten Trägerteilchen und die Probe ausserhalb der Zelle während einer bestimmten Zeitspanne unter genau bestimmten Bedingungen umsetzen und dann die Reaktionsmischung zur Messung der Extinktion in die Zelle einbringen. Um die Reaktionsbedingungen jedoch bei sämtlichen Messungen reproduzierbar zu halten, insbesondere hinsichtlich der Reaktionszeit, kann man die sensibilisierten Trägerteilchen unter speziellen Bedingungen direkt in einer Zelle umsetzen, die in ein Spektrophotometer eingebracht ist, wodurch eine genauere Bestimmung möglich wird, indem man die Extinktion unmittelbar nach Ablauf einer vorbestimmten Reaktionszeit bestimmt oder indem man die Zeit bestimmt, die notwendig ist, bis die Extinktion einen vorherbestimmten Wert erreicht, wenn man die Reaktion unter genau bestimmten Bedingungen durchführt.

Zur Bestimmung eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer Probe, die eine unbekannte Menge des Antigens und/oder Antikörpers enthält, bereitet man bevorzugt eine Reihe von verdünnten Eichproben unter Verwendung einer Standardprobe, die eine definierte Menge des entsprechenden Antigens und/oder Antikörpers enthält, indem man sie unter Anwendung verschiedener Faktoren verdünnt. Dann kann man jede der verdünnten und unverdünnten Eichproben oder Standardproben unter vorbestimmten Bedingungen mit unlöslichen Trägerteilchen umsetzen, die mit einer definierten Menge eines entsprechenden Antikörpers oder Antigens sensibilisiert sind, worauf man die Extinktion einer jeden Reaktionsmischung bestimmt und eine Eichkurve für die besondere Kombination aus dem Antigen und/oder Antikörper mit den sensibilisierten Trägerteilchen ermittelt, die die Beziehung zwischen der Menge

(Konzentration) des Antigens oder des Antikörpers und der Extinktion wiedergibt (wobei diese Art von Eichkurve im folgenden der Einfachheit halber als «Eichkurve A» bezeichnet wird). Anschliessend wird eine zu bestimmende unbekannte Probe mit den gleichen sensibilisierten Trägerteilchen, die zur Ermittlung der Eichkurve angewandt wurden, unter im wesentlichen den gleichen Bedingungen wie den bei der Ermittlung der Eichkurve angewandten umgesetzt, worauf man die Extinktion der Reaktionsmischung misst. Die Menge (oder Konzentration) des betreffenden Antigens und/oder Antikörpers in der unbekannten Probe kann dann dadurch ermittelt werden, dass man den in dieser Weise gemessenen Extinktionswert mit der Eichkurve A vergleicht. Alternativ kann man bei der oben beschriebenen Ermittlung der Eichkurve eine Eichkurve erstellen, die die Beziehung zwischen der Menge (oder Konzentration) des Antigens oder des Antikörpers in der verwendeten Eichprobe und der Reaktionszeit wiedergibt, die erforderlich ist, bis ein vorbestimmter Extinktionswert erreicht ist (wobei diese Art von Eichkurve im folgenden der Bequemlichkeit halber als «Eichkurve B» bezeichnet wird). Auch in diesem Fall kann man durch Umsetzen einer unbekannten Probe mit den gleichen sensibilisierten Trägerteilchen unter im wesentlichen den gleichen Bedingungen, wie sie für die Herstellung der Eichkurve A angewandt wurden, die Menge (oder Konzentration) des Antigens und/oder Antikörpers in der unbekannten Probe bestimmen, indem man die Zeit misst, die bis zum Erreichen des vorbestimmten Extinktionswertes abläuft.

Somit kann man die Menge oder die Konzentration eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer unbekannten Probe dadurch bestimmen, dass man entweder

A) die Extinktion der unbekannten Probe misst (wobei man zu Eichzwecken die Eichkurve A verwendet) oder

B) die Reaktionsgeschwindigkeit oder die bis zum Erreichen eines vorgeschriebenen Extinktionswertes erforderliche Reaktionszeit bestimmt (wobei man zum Eichen die Eichkurve B verwendet).

Wie bereits beschrieben, ist die obige Methode A als Bestimmungssystem mit sehr grosser Präzision nicht nur dann geeignet, wenn die Konzentration eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer unbekannten Probe relativ hoch ist, sondern selbst dann, wenn sie so gering ist, dass sie bislang nur mit Hilfe eines Radioimmuntests (RIA) bestimmt werden konnte. Andererseits ist die obige Methode B, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wird, dazu geeignet, eine relativ grosse Menge (oder Konzentration) eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer unbekannten Probe zu bestimmen und ist dadurch besonders vorteilhaft, dass die Messung ziemlich einfach ist. Wie sich gezeigt hat, besitzt die oben angesprochene Eichkurve A eine schwache S-Form statt einer geraden Linie, was jedoch auf die Präzision der Bestimmung keinen nachteiligen Einfluss hat. Der Grund dafür, dass die Eichkurve eine S-Form hat, wie es oben beschrieben wurde, scheint offenbar der zu sein, dass die Reaktionsgeschwindigkeit die Form der Kurve bei niedrigeren Konzentrationen des Antigens und/oder des Antikörpers beeinflusst, während bei höheren Konzentrationen eine Sättigung der aktiven Stellen des Trägermaterials eintritt. Es ist natürlich möglich, den linearen Abschnitt der S-förmigen Kurve zu vergrössern, indem man die Bedingungen der Ermittlung der Eichkurve besonders auswählt, und bei der Bestimmung unbekannter Proben im wesentlichen innerhalb dieses Bereiches arbeitet.

Da man wie bereits ausgeführt wurde, die sensibilisierten Trägerteilchen in einer möglichst hohen Konzentration mit der Probe in Kontakt bringt und mit ihr umsetzt, sollte die zur Bestimmung der Extinktion der Reaktionsmischung verwendete Zelle eine Dicke besitzen, die geringer ist als die einer Zelle, wie sie für die Analyse eines Spektrums im sichtbaren Bereich angewandt wird, so dass Zellen mit einer Dicke im Bereich von 0,5

bis 4 mm und insbesondere von 1 bis 2,5 mm bevorzugt sind. Wenn man Spurenmengen eines Antigens oder eines Antikörpers mit möglichst grosser Genauigkeit bestimmen will, was bislang durch den Radioimmuntest (RIA) erreicht wurde, ist es besonders vorteilhaft:

- a) ein Antigen oder einen Antikörper mit einer möglichst hohen Gleichgewichtskonstanten einzusetzen,
- b) Latexteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,3 bis 0,6 μm zu verwenden, deren Teilchengrösseverteilung möglichst eng ist,
- c) die Extinktion mit Licht mit einer Wellenlänge von 1,2 bis 1,4 μm zu bestimmen,
- d) eine relativ lange Reaktionszeit anzuwenden, die beispielsweise im Bereich von 1 bis 3 Stunden liegt, und
- e) die Konzentration des sensibilisierten Latexträgermaterials zu erhöhen, vorausgesetzt, dass die Extinktion sich messen lässt.

Wenn man auf der anderen Seite durch Messen der Reaktionsgeschwindigkeit (unter Verwendung der Eichkurve B) eine unbekannte Probe in relativ kurzer Zeit bestimmen will, ist es von Vorteil:

- f) Latexteilchen mit einem relativ grossen durchschnittlichen Durchmesser zu verwenden,
- g) die Konzentration der Trägerteilchen in dem Latex zu erhöhen, vorausgesetzt, dass die Messung der Extinktion möglich ist, und
- h) die Reaktionszeit möglichst kurz zu halten und beispielsweise eine Reaktionszeit im Bereich von 5 Sekunden bis 10 Minuten und vorzugsweise im Bereich von 10 Sekunden bis 30 Minuten anzuwenden.

Wenn man in diesem Fall die Zeit, die zum Erreichen eines vorbestimmten Extinktionswertes erforderlich ist, auf der Ordinate und die Konzentration auf der Abszisse aufträgt, und zwar jeweils in logarithmischem Massstab, erhält man die Eichkurve B in Form einer vorteilhaften geraden Linie.

Die Erfindung wurde im Vorstehenden erläutert anhand der Bestimmung eines Antigens und/oder eines Antikörpers in einer Probe, die darauf beruht, dass man das in der Probe enthaltene Antigen und/oder den in der Probe enthaltenen Antikörper mit sensibilisierten Trägerteilchen agglutiniert (das heisst ein LA-System anwendet). Das erfindungsgemäss Verfahren ist jedoch auch für eine Bestimmung geeignet, bei der die inhibierende Wirkung gegen die oben erwähnte Agglutination angewendet wird (LI-System).

- 45 Z.B. kann man unvollständige Antigene, beispielsweise Haptene, dadurch bestimmen, dass man das LI-System anwendet. In diesem Fall kann man beispielsweise ein Antigen auf den unlöslichen Trägerteilchen fixieren, die in dieser Weise sensibilisierten Trägerteilchen nach einer kompetitiven Reaktion mit einer gegebenen Menge eines Antikörpers, der mit einem Antigen einer vorbestimmten Konzentration (beispielsweise einer Standard-Antigenlösung) umgesetzt worden ist, reagieren lassen, und dann die Extinktion der erhaltenen Reaktionsmischung bestimmen. Diese Massnahmen werden bei verschiedenen Konzentrationen der Standard-Antigenlösung wiederholt, wodurch man schliesslich die Eichkurve C erhält. Anschliessend setzt man eine unbekannte Probe mit dem gleichen Antikörper einer bestimmten Konzentration um, wonach man die erhaltene Reaktionsmischung mit dem sensibilisierten Trägermaterial zur Reaktion bringt. Diese Reaktionen sollten unter im wesentlichen den gleichen Bedingungen durchgeführt werden, wie sie zur Ermittlung der Eichkurve C angewandt wurden. Die Extinktion der letztendlich mit den sensibilisierten Trägerteilchen erhaltenen Reaktionsmischung wird dann bestimmt und mit der Eichkurve C verglichen, wodurch man die Menge (oder Konzentration) des Antikörpers in der unbekannten Probe bestimmen kann.

Nach der Verfahrensweise gemäss dem oben erwähnten LI-

System kann man auch einen Antikörper in einer unbekannten Probe bestimmen, indem man einen bestimmten Antikörper auf den unlöslichen Trägerteilchen fixiert. Weiterhin ist es gewünschtenfalls möglich, gleichzeitig ein Antigen und einen Antikörper unterschiedlicher Art auf den unlöslichen Trägerteilchen zu fixieren und dann ein Antigen und einen Antikörper in einer unbekannten Probe zu bestimmen.

Somit gelingt es erfindungsgemäß, quantitativ eine grosse Vielzahl von Antigenen und/oder Antikörpern zu bestimmen, beispielsweise

1. bei der Blutuntersuchung von Patienten oder Blutspendern, was für Notmassnahmen unerlässlich ist; beispielsweise kann man die Blutgruppensubstanzen, das Au- oder HB-Antigen oder andere Verunreinigungen im Blut oder Fibrin/Fibringen-Abbauprodukte (FDP) bestimmen, was sich in jüngster Zeit als nützlich erwiesen hat bei der Überwachung der Genesung von Patienten mit Nierentransplantation oder mit Nierenversagen;

2. zur Bestimmung von Humanchoriongonadotropin (hCG), das eine wichtige Rolle spielt bei der Schwangerschaftsdiagnose oder bei der Überwachung der Genesung von Chorionepitheliomen;

3. zur Bestimmung von Humanchoriongonadotropin oder von Östriolglucuronid, das ein Stoffwechselprodukt des Follikelhormons darstellt, im Urin, welche Bestimmung für die Überwachung der Schwangerschaft von Bedeutung ist;

4. zur Bestimmung von Oxytocin im Blut, von welcher Substanz man annimmt, dass sie Uteruskontraktionen verursacht;

5. zur Bestimmung bestimmter Nebennierenrindenhormone, wie Corticoiden und Aldosteron oder adrenocorticotropen Hormonen (ACTH);

6. zur Bestimmung des Insulins bei Diabetikern oder zur Bestimmung des Follikel-anregenden Hormons, des luteinisierenden Hormons, von Östrogenen, des Gelbkörperhormons (corpus luteum hormon) etc;

7. zur Bestimmung von Gastrin oder Sekretin, bei dem es sich um ein Magen-Darm-Hormon handelt; und

8. zum Nachweis und zur Bestimmung eines Antikörpers in Körperflüssigkeiten von Patienten, die an Allergien, Syphilis, hämolytischer Streptokokzidiose, Röteln, Autoimmunkrankheiten, wie Kollagenose, und anderen Infektionskrankheiten und dergleichen leiden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann natürlich auch zur qualitativen oder halbquantitativen Bestimmung dieser Antigene und/oder Antikörper angewandt werden.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann in einer Vorrichtung erfolgen, die eine Absorptionszelle mit einer Dicke von 0,5 bis 4 mm zur Aufnahme der durch Umsetzen des auf dem unlöslichen Träger fixierten Antikörpers oder Antigens mit dem entsprechenden Antigen oder Antikörper oder einer Mischung davon in einem flüssigen Medium erhältlichen Reaktionsmischung und ein Photometer mit einer Bestrahlungseinrichtung zum Bestrahlen mit Licht mit einer im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm liegenden Wellenlänge aufweist.

Diese Messvorrichtung kann neben den obigen Vorrichtungsmerkmalen ähnliche Merkmale aufweisen wie herkömmliche Photometervorrichtungen.

Wie aus der Fig. 4 zu erkennen ist, umfasst der Grundaufbau der Vorrichtung eine Bestrahlungseinrichtung mit einer Lichtquelle 1 und einem Filter oder Prisma 2; eine Probenzelle 3 zur Aufnahme der Probe zur Messung der Antigen-Antikörper-Reaktion und eine Vergleichszelle 4 zur Aufnahme einer zur Kompensation dienenden Blindprobe; Photozelle 5 und 6 zur Messung des durch die entsprechenden Zellen hindurchgetretenen Lichtes unter Bildung von elektrischen Signalen; einen Verstärker 7 zur Verstärkung der elektrischen Signale und eine Anzeige oder Aufzeichnungseinrichtung 8 zur Anzeige oder zur Aufzeichnung der verstärkten elektrischen Signale.

Bei der Lichtquelle 1 kann es sich um eine übliche Wolframlampe handeln, deren Licht mit Hilfe des Filters oder Prismas 2 monochromatisiert wird, um einen Lichtstrahl mit einer bestimmten Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm und insbesondere von 0,8 bis 1,4 µm und noch bevorzugter im Bereich von 1,0 bis 1,4 µm zu bilden, der durch die Zellen 4 und 5 geführt wird. Das Filter oder Prisma 2 kann man daher unter jenen Produkten auswählen, die dazu geeignet sind, das Licht unter Bildung einer innerhalb der oben angegebenen Wellenlängenbereiche liegenden Wellenlänge zu monochromatisieren. Beispielsweise kann man ein Interferenzfilter, das eine Wellenlänge von $1200 \pm 50 \text{ } \mu\text{m}$ ergibt, als Filter oder man kann Quarzprismen oder Glasprismen verwenden.

Das in dieser Weise monochromatisierte Licht wird mit Hilfe eines Spalts oder einer Linse gebündelt, bevor es durch die Probenzelle 3 und die Vergleichszelle 4 geführt wird. Die Probenzelle 3 und die Vergleichszelle 4 können aus durchsichtigem Glas oder einem durchsichtigen synthetischen Harz (beispielsweise einem Acrylharz) bestehen und können einen schachtartigen Aufbau mit rechteckigem oder länglichem Querschnitt besitzen (wie es in der Fig. 5 gezeigt ist). Die Dicke der Zelle, das heißt der Abstand 1 zwischen den Wänden a und b (durch die das Licht geführt wird) bzw. zwischen der dem Licht zugewandten Wand und der ihr gegenüberliegenden Wand kann im Bereich von 0,5 bis 4 mm und vorzugsweise im Bereich von 1 bis 2,5 mm liegen. Die lichtdurchlässigen Wände besitzen vorteilhafterweise einen Transmissionsgrad von mindestens 30% und vorzugsweise von 80% oder mehr für Licht mit einer Wellenlänge im Bereich von 0,6 bis 2,4 µm.

In die Probenzelle 3 bringt man eine Reaktionsmischung ein, die man dadurch erhalten hat, dass man ein Antigen und/oder einen Antikörper oder eine Mischung davon mit einem entsprechenden Antikörper oder Antigen, das auf unlöslichen Trägerteilchen vorliegt, in einem flüssigen Medium in der oben beschriebenen Weise umsetzt. In die Vergleichszelle 4 bringt man eine Vergleichsprobe ein, die lediglich eine Dispersion des Antikörpers oder des Antigens, der bzw. das auf den unlöslichen Trägerteilchen fixiert ist, in dem flüssigen Medium ein. Die durch die Zellen 3 bzw. 4 geführten Lichtstrahlen werden von den Photozellen 5 bzw. 6 aufgenommen und in elektrische Signale umgewandelt, deren Stärke proportional ist der Intensität des von der entsprechenden Photozelle aufgenommenen Lichts. Man kann irgendwelche Photozellen 5 und 6 verwenden, vorausgesetzt, dass sie dazu geeignet sind, das aufgefangene Licht in ein elektrisches Signal umzuwandeln, dessen Stärke proportional der Lichtintensität ist. Beispielsweise kann man mit Verteil Bleisulfid-Photoleiterelemente verwenden. Die in dieser Weise durch die Photozellen gebildeten elektrischen Signale können mit Hilfe des Verstärkers 7 in üblicher Weise verstärkt und in einer Anzeigevorrichtung bzw. Aufzeichnungsvorrichtung 8 aufgezeichnet oder visuell angezeigt werden.

Wenn man einen Zeitmechanismus in das Anzeigegerät oder Aufzeichnungsgerät 8 einbaut, ist es möglich, die Extinktion automatisch nach Ablauf einer vorbestimmten Reaktionszeit zu messen oder die Zeit zu bestimmen, die erforderlich ist, dass die Extinktion einen vorherbestimmten Wert erreicht.

Vorzugsweise ist die verwendete Probenzelle 3 mit einer Bewegungseinrichtung versehen, beispielsweise einem in der Zelle bewegbaren Mischstab.

Die Fig. 6 gibt eine besonders geeignete Form des Bewegungsmechanismus zur Bewegung der Mischung 9 aus einer Probe und sensibilisierten Trägerteilchen (beispielsweise einem sensibilisierten Latex) wieder, die in der Probenzelle 3 der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorliegt.

Wie aus der Fig. 6 zu erkennen ist, kann man zur Bewegung der Mischung 9 in der Zelle 3 den L-förmigen Mischstab 11 auf- und abwärts bewegen, indem man die T-förmige Verbindungsstange 14 auf- und abbewegt, wobei die Verbindungsstange 14

über ihre obere flache Platte 14' mit einer sich drehenden Scheibe 12 im Eingriff steht, die von einer Exzenterwelle 13 angetrieben wird. Mit der Bezugsziffer 17 ist ein Lichtabschirmungsdeckel bezeichnet, durch den die Verbindungsstange 14 über ein Rohr 15 geführt ist, das an und in dem Deckel 17 befestigt ist. Die Verbindungsstange 14 wird durch die Drehung der Exzenter scheibe 12 nach unten gedrückt und dann durch die Ausdehnungskraft der Feder 16, die zwischen dem Deckel 17 und der oberen flachen Platte 14' der Verbindungsstange 14 angeordnet ist, wieder nach oben bewegt.

Wenn die in der Fig. 4 dargestellten Vorrichtung dargestellte Probenzelle 3 den Aufbau besitzt, wie er beispielsweise in der Fig. 6 dargestellt ist, kann man die Zelle 3 ins Dunkle, das von dem Sonnenlicht abgeschirmt ist, einbringen und eine Mischung aus einer zu bestimmenden Probe und sensibilisierten Trägerteilchen (einem sensibilisierten Latex) in der Zelle 3 mit Hilfe des L-förmigen Mischstabes 11 durchmischen, während die Zelle mit Licht einer ausgewählten Wellenlänge innerhalb des nahen Infrarotbereichs bestrahlt wird, so dass es möglich ist, die Mischung zu bewegen, ohne den Lichtstrahl zu unterbrechen. Somit kann man durch die Anwendung der oben beschriebenen Vorrichtung die Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen der Probe und den sensibilisierten Trägerteilchen beschleunigen, wobei es weiterhin möglich ist, die Reaktion unmittelbar nach Ablauf einer vorbestimmten Reaktionszeit zu unterbrechen und die Reaktionszeit genau zu bestimmen, nach der der Extinktionswert einen vorbestimmten Wert erreicht hat, und dergleichen mehr.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1

1. Herstellung eines mit Antifibrinogen-Antikörper sensibilisierten Latexreagens (Antifibrinogen-Latexreagens, Anti-Fg-Latexreagens)

Zu 10 ml einer Lösung von Anti-Humanfibrinogen (Fg)-Antikörper (mit einer Konzentration von 2 mg/ml) in einem Glycinpuffer gibt man 1 ml eines Polystyrollates mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,481 µm (der einen Feststoffgehalt von 10 Gew.-% aufweist), röhrt die Mischung während 30 Minuten bei Raumtemperatur, erwärmt auf 40 °C und röhrt während weiterer 30 Minuten bei dieser Temperatur und zentrifugiert schliesslich unter Kühlen auf 2 bis 4 °C während 50 Minuten (bei 12 000 min⁻¹). Den Niederschlag trennt man durch Dekantieren ab und suspendiert die erhaltenen Latexteilchen, die mit dem Antifibrinogen-Antikörper sensibilisiert sind, in einer Rinderserumalbuminlösung (mit einer Konzentration von 0,2 Gew.-%) unter Bildung eines Antifibrinogen-sensibilisierten Latexreagens, das die sensibilisierten Latexteilchen in einer Konzentration von 1 Gew.-% enthält.

2. Aufnahme einer Eichkurve

Man beschickt ein Kunststoffreagensglas (mit einem Innen durchmesser von 7 mm und einer Länge von 70 ml) mit einem aliquoten Anteil von 0,1 ml des gemäss Abschnitt 1 hergestellten Antifibrinogen-Latexreagens und 0,3 ml einer Standard-Fibrinogenlösung (in einer isotonischen Natriumchloridlösung, die 0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin enthält), die Fibrinogen

in der in der folgenden Tabelle I angegebenen Konzentration enthält und schüttelt die Mischung während 20 Minuten auf einer hin- und hergehenden Schüttleinrichtung mit 200 Schüttelvorgängen pro Minute, um die Antigen-Antikörper-Reaktion ablaufen zu lassen. Unmittelbar darauf wird die in dem Reagensglas enthaltene Reaktionsflüssigkeit in eine Glasabsorptionszelle mit einer Dicke von 2 mm überführt und es wird die Extinktion bei einer Wellenlänge des angewandten Lichtes von 1,2 µm mit Hilfe eines automatischen Spektrophotographen bestimmt (wozu man als Vergleichslösung eine Suspension von 0,1 ml des Antifibrinogen-Latexreagens verwendet, das mit 0,3 ml der isotonischen Natriumchloridlösung verdünnt ist, die 0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin enthält). Die Messung wird mit jeder Standard-Fibrinogenlösung zweimal durchgeführt.

15 Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

| Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung (µg/ml) | Extinktion bei 1,2 µm | | |
|--|-----------------------|-----------|------------|
| | 1. Mesung | 2. Mesung | Mittelwert |
| 0,1 | 0,336 | 0,363 | 0,350 |
| 0,2 | 0,836 | 0,778 | 0,807 |
| 0,3 | 1,083 | 1,167 | 1,125 |
| 0,4 | 1,330 | 1,333 | 1,332 |
| 0,5 | 1,403 | 1,430 | 1,417 |

Wenn man die obigen Werte graphisch aufträgt, und zwar die Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung auf der Abszisse und die Extinktion (Mittelwert) bei 1,2 µm (der Wellenlänge des angewandten Lichts) auf der Ordinate, so erhält man 35 die in der Fig. 7 dargestellte Eichkurve.

3. Quantitative Bestimmung von Fibrinogen in unbekannten Proben.

Man entnimmt einem Patienten eine Probe Blut, Urin oder der Flüssigkeit aus dem Brustkorb (aus dem Brustfellraum) und trennt Serum oder Plasma davon ab, wenn es sich bei der Probe 40 um eine Blutprobe handelt. Dann verdünnt man einen aliquoten Anteil von 0,3 ml der Probe oder der verdünnten Probe mit 0,1 ml des gemäss Abschnitt 1 bereiteten Antifibrinogen-Latexreagens genau nach der in dem Abschnitt 2 beschriebenen Weise und bestimmt die Extinktion in der Weise, die in dem Abschnitt 2 angegeben ist. Unter Verwendung der nach der in Abschnitt 2 angegebenen Methode ermittelten Eichkurve liest man die Fibrinogen-Konzentration entsprechend dem ermittelten Extinktionswert ab. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind 50 in der folgenden Tabelle II angegeben.

Zu Vergleichszwecken sind in der folgenden Tabelle II auch die Werte aufgeführt, die man mit Hilfe des üblichen Radioimmuntests (RIA-Methode) (S.M. Ratkey et al., Brit. J. Haematol. 30 (1975) 145 bis 149) und der üblichen Objektträgermethode 55 (Fujimaki, Tamura und Takahashi, Rinsho Kagaku (Clinical Science), Vol. 12 (1976) 507; und Fujimaki, Ikematsu, Takeuchi und Kato, Rinsho Byori (Japanese Journal of Clinical Pathology) 21 (1973) 973) ermittelt hat.

Tabelle II

| Patient Nr. | Unbekannte Probe | | | Fibrinogenkonzentration in der unbekannten Probe (µg/ml) | | |
|-------------|------------------|--------------------|--|--|-------------|-----------------------|
| | Material | Verdünnungs faktor | Ermittelter Extinktionswert gemäss Methode | Erfindungs- methode | RIA-Methode | Objektträger- Methode |
| 1 | Urin | x2 | 0,764 | 0,402 | 0,359 | 0,5 |
| 2 | do. | x 16 | 1,162 | 5,178 | 5,117 | 8,0 |

| Patient Nr. | Unbekannte Probe | | | Fibrinogenkonzentration in der unbekannten Probe ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | |
|----------------|---|------------------------|---|---|-------------|--------------------------|
| | Material | Verdünnungs- faktor | Ermittelter Extinktionswert gemäss Me- thode | Erfindungs- Extinktionswert gemäss Me- thode | RIA-Methode | Objektträger- Methode |
| 3 | do. | x 1 | 1,233 | 0,347 | 0,368 | 0,5 |
| 4 | do. | do. | 0,090 | 0,021 | 0,024 | weniger als 0,5 |
| 5 | do. | do. | 0,011 | 0,003 | 0,006 | do. |
| 6 | do. | do. | 0,175 | 0,042 | 0,037 | do. |
| 7 | do. | do. | 0,066 | 0,016 | 0,011 | do. |
| 8 | do. | do. | 0,171 | 0,041 | 0,008 | do. |
| 9 | do. | do. | 0,020 | 0,005 | 0,007 | do. |
| 10 | do. | do. | 0,199 | 0,048 | 0,072 | do. |
| 11 | Serum | x 10 | 0,310 | 0,760 | 0,800 | 1,0 |
| 12 | do. | do. | 0,330 | 0,812 | 0,863 | 0,9 |
| 13 | do. | do. | 0,520 | 1,317 | 1,335 | 1,25 |
| 14 | do. | do. | 0,348 | 0,858 | 0,892 | 1,0 |
| 15 | Fibrino- genfreies Plasma | do. | 0,550 | 1,400 | 1,520 | 2,0 |
| 16 | Canceröse Brustfell- raumflüs- sigkeit | x 640 | 1,210 | 217,12 | 197,4 | 320 |

Aus den obigen Ergebnissen ist zu ersehen, dass die mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens ermittelten Werte der Fibrinogen-Konzentration im wesentlichen gut übereinstimmen mit den Werten, die man nach der Radioimmuntestmethode erzielt, die als die genaueste der herkömmlichen Bestimmungsmethoden gilt. Der Korrelationskoeffizient zwischen der erfindungsgemässen Methode und der Radioimmuntestmethode beträgt 0,999.

Beispiel 2

Nach der in Beispiel 1, Abschnitt 1, beschriebenen Weise bereitet man ein Antifibrinogen-sensibilisiertes Latexreagens (das 1 Gew.-% Latexteilchen enthält) mit dem Unterschied, dass man einen anderen Polystyrolatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von $0,234 \mu\text{m}$ verwendet (der einen Feststoffgehalt von 10 Gew.-% aufweist).

Dann vermischt man einen aliquoten Anteil von 0,1 ml des in dieser Weise erhaltenen Antifibrinogen-sensibilisierten Latexreagens mit 0,3 ml einer Standard-Fibrinogenlösung (die $0,5 \mu\text{g}$ Fibrinogen pro Liter enthält) und schüttelt während 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einer hin- und hergehenden Schüttleinrichtung bei 250 Schüttelbewegungen pro Minute, um die Antigen-Antikörper-Reaktion ablaufen zu lassen. Anschliessend bestimmt man die Extinktion der Reaktionsmischung unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge von $1,2 \mu\text{m}$ in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise. Zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit der Messung wiederholt man die Massnahmen drei weitere Male. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle III angegeben.

Weiterhin wiederholt man die obige Bestimmungsmethode, mit dem Unterschied, dass man anstelle der Standard-Fibrinogenlösungen Seren verwendet, die man aus von Patienten gewonnenen Blutproben isoliert hat. Man wiederholt dabei die gleiche Bestimmungsmethode viermal an verschiedenen Tagen, um die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Körperflüssigkeit zu bestätigen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in der Tabelle III angegeben.

30 Tabelle III

| Messung Nr. | Extinktion |
|---------------------------|--|
| 35 1 | Standard-Fibrinogenlösung Serum 0,582 0,294 |
| 2 | 0,565 0,280 |
| 3 | 0,562 0,306 |
| 4 | 0,545 0,287 |
| Durchschnitts- 40 wert | $0,564 \pm 0,010$ $0,292 \pm 0,010$ |
| Varianz- Koeffizient | 1,8% 3,4% |

Wie aus den in der obigen Tabelle III angegebenen Werten zu ersehen ist, ist das erfindungsgemäss Verfahren hervorragend reproduzierbar sowohl bei der Bestimmung der Standard-Fibrinogenproben als auch bei der Bestimmung von tatsächlichen Proben von Körperflüssigkeiten (Seren).

50

Beispiel 3

Zu 5 ml einer Glycinpufferlösung gibt man 100 mg Siliciumdioxid in Form von Mikroteilchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $0,32 \mu\text{m}$ (obwohl 15 % dieser Teilchen einen Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ oder mehr aufweisen) und unterzieht die Mischung Ultraschallschwingungen mit einer Frequenz von 28 kHz während 1 Stunde, um eine Suspension der Siliciumdioxid-Mikroteilchen zu erreichen. Dann bereitet man nach der in Beispiel 1, Abschnitt 1, beschriebenen Weise ein Reagens in

60 Form einer Suspension von mit Antifibrinogen-Antikörpern sensibilisiertem Siliciumdioxid, mit dem Unterschied, dass man anstelle des in Beispiel 1, Abschnitt 1, verwendeten Polystyrolatex mit einer Teilchengrösse von $0,481 \mu\text{m}$ die in dieser Weise hergestellte Suspension der Siliciumdioxid-Mikroteilchen verwendet und mit dem Unterschied, dass man eine Rinderserumalbumin-Lösung mit einer anderen Konzentration (0,05 Gew.-%) verwendet. Dann bestimmt man unter Verwendung des Antifibrinogen-sensibilisierten Siliciumdioxid-Suspensions-

65

reagens die Extinktion von Standard-Fibrinogenlösungen in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle IV angegeben.

Tabelle IV

| Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | Extinktion bei 1,2 μm |
|---|----------------------------------|
| 0,2 | 0,028 |
| 0,4 | 0,126 |
| 0,6 | 0,287 |
| 0,8 | 0,460 |
| 1,0 | 0,631 |

Tabelle V

| Patient Nr. | Material | Unbekannte Probe | | Fibrinogen-Konzentration in der unbekannten Probe ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | |
|-------------|------------------------------------|-------------------|----------------------|---|-------------|
| | | Verdünnungsfaktor | Gemessene Extinktion | Erfindungsgemässes Verfahren | RIA-Methode |
| 1 | Urin | $\times 1$ | 0,125 | 0,400 | 0,359 |
| 2 | do. | $\times 10$ | 0,210 | 5,000 | 5,117 |
| 3 | do. | $\times 1$ | 0,110 | 0,380 | 0,368 |
| 4 | Serum | $\times 1$ | 0,440 | 0,770 | 0,800 |
| 5 | do. | $\times 1$ | 0,490 | 0,830 | 0,892 |
| 6 | Canceröse Brustfellraumflüssigkeit | $\times 400$ | 0,211 | 200 | 197,4 |

Beispiel 4

Man bestimmt die Extinktion bei Wellenlängen des angewandten Lichts von 1,2 und 1,7 μm nach der in Beispiel 1, Abschnitt 1 und 2, beschriebenen Weise, mit dem Unterschied, dass man anstelle des Polystyrollatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,481 μm einen Polystyrollatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,804 μm mit einem Feststoffgehalt von 10 Gew.-% und einer anderen Konzentration des Rinderserumalbumins (0,1 Gew.-%) anwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle VI angegeben.

Tabelle VI

| Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung | Extinktion bei | |
|---|-------------------|-------------------|
| | 1,2 μm | 1,7 μm |
| 0,2 | 0,127 | 0,083 |
| 0,4 | 0,258 | 0,198 |
| 0,6 | 0,418 | 0,452 |
| 0,8 | 0,388 | 0,592 |
| 1,0 | 0,258 | 0,622 |

Aus den in der obigen Tabelle VI angegebenen Zahlenwerten ist zu ersehen, dass eine deutliche Korrelation zwischen der Fibrinogen-Konzentration und der Extinktion besteht, wenn die Wellenlänge des angewandten Lichtes um einen Faktor von mehr als 2 grösser ist als der durchschnittliche Durchmesser des festen teilchenförmigen Trägermaterials (Polystyrollatexteilchen).

Beispiel 5

Nach der in Beispiel 1, Abschnitt 1, angegebenen Weise bereitet man ein mit Antihumanchoriongonadotropin sensibilisiertes Latexreagens, mit dem Unterschied, dass man anstelle

Wie in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschrieben, bildet man durch Auftragen der obigen Werte eine Eichkurve, die in der Fig. 8 dargestellt ist. Aus der Fig. 8 ist zu ersehen, dass eine deutliche geradlinige Beziehung zwischen der Fibrinogen-Konzentration und der Extinktion dann besteht, wenn die Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder mehr beträgt.

Dann unterwirft man unbekannte Proben (Urin, Serum und Brustfellraumflüssigkeit), die man von Patienten gewonnen hat, der in Beispiel 1, Abschnitt 3, angegebenen Bestimmungsweise, um den Fibrinogengehalt der unbekannten Proben zu ermitteln. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle V zusammengestellt.

15

des Antihumanfibrinogen-Antikörpers Antihumanchoriongonadotropin-Antikörper (Anti-hCG) verwendet und den Polystyrollatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,481 μm durch einen anderen Polystyrollatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,234 μm ersetzt.

Unter Verwendung des in dieser Weise erhaltenen, mit Antihumanchoriongonadotropin sensibilisierten Latexreagens bestimmt man die Extinktion nach der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge von 1,2 μm , mit dem Unterschied, dass man anstelle der Standard-Fibrinogenlösung eine Standard-Humanchoriongonadotropinlösung einsetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle VII angegeben.

Tabelle VII

| Konzentration der Standard-Humanchoriongonadotropinlösung (IE/ml) | Extinktion bei 1,2 μm |
|---|----------------------------------|
| 0,1 | 0,048 |
| 0,2 | 0,130 |
| 0,3 | 0,168 |
| 0,4 | 0,261 |
| 0,5 | 0,360 |
| 0,7 | 0,630 |
| 1,0 | 0,972 |

Unter Anwendung der obigen Zahlenwerte bereitet man in der oben beschriebenen Weise eine Eichkurve. Andererseits gewinnt man von verschiedenen Patienten Urinproben, die man zur Bestimmung des im Urin vorhandenen Humanchoriongonadotropins verwendet, wozu man nach der in Beispiel 1, Abschnitt 3, beschriebenen Weise vorgeht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle VIII angegeben.

Tabelle VIII

| Patient Nr. | Material | Verdünnungsfaktor | Gemessene Extinktion | Humanchoriongonadotropin-Konzentration in den unbekannten Proben (IE/ml) | RIA-Methode |
|-------------|----------|-------------------|----------------------|--|-------------|
| 1 | Urin | × 1 | 0,400 | 0,564 | 0,482 |
| 2 | do. | do. | 1,122 | 0,966 | 1,120 |
| 3 | do. | do. | 0,955 | 0,944 | 0,857 |
| 4 | do. | do. | 0,990 | 0,952 | 0,925 |

Beispiel 6

Man beschickt eine gläserne Absorptionszelle mit einer Dicke von 2 mm, die mit einem L-förmigen Rührstab ausgerüstet ist, mit 0,1 ml des gemäss Beispiel 2 bereiteten, mit Antifibrinogen sensibilisierten Latexreagens und 0,3 ml einer der Standard-Fibrinogenlösungen mit der in der folgenden Tabelle IX angegebenen Fibrinogen-Konzentration und überwacht die Extinktion der Reaktionsmischung kontinuierlich bei einer Wellenlänge des angewandten Lichtes von 1,2 µm nach der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise, um die Zeit zu ermitteln, die erforderlich ist, dass die Extinktion einen Wert von 0,5 erreicht, wobei man den Rührstab mit einer definierten Geschwindigkeit von 200 Vibrationen pro Minute vertikal auf- und abbewegt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle IX angegeben.

Tabelle IX

| Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung (mg/ml) | Zeit bis zum Erreichen eines Extinktionswertes von 0,5 (s) |
|---|--|
| 2 | 26,9 |
| 4 | 11,3 |
| 6 | 6,4 |
| 8 | 4,7 |
| 10 | 2,9 |

15

Die obigen Werte trägt man auf doppelt logarithmischem Papier auf, wobei man die Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung auf der Abszisse und die Zeit bis zum Erreichen eines Extinktionswertes von 0,5 auf der Ordinate aufträgt, und erhält eine Eichkurve. Die Eichkurve ist, wie es aus der Fig. 9 zu ersehen ist, eine gerade Linie.

25

Dann beschickt man eine Glasabsorptionszelle mit einer Dicke von 2 mm, die mit einem L-förmigen Rührstab ausgerüstet ist, mit 0,3 ml irgendeiner unbekannten Probe (Urin, Serum und Brustfellraumflüssigkeit), die man von verschiedenen Patienten gewonnen hat, und dann mit 0,1 ml des oben erwähnten Antifibrinogen-sensibilisierten Latexreagens und misst in der oben beschriebenen Weise unter Verwendung von Licht mit einer Wellenlänge von 1,2 µm die Zeit, die erforderlich ist, dass die Extinktion einen Wert von 0,5 erreicht, worauf man den Wert der Fibrinogen-Konzentration, der dieser Zeit entspricht, von der in der obigen Weise ermittelten Eichkurve abliest. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle X angegeben.

40

Tabelle X

| Patient Nr. | Material | Verdünnungsfaktor | Zeit bis zum Erreichen eines Extinktionswertes von 0,5 (s) | Fibrinogen-Konzentration in der unbekannten Probe (µg/ml) | RIA-Methode |
|-------------|--------------------------------------|-------------------|--|---|-------------|
| 1 | Urin | × 1 | 9,2 | 4,5 | 5,117 |
| 2 | Canceröse Brustfell-raumflüs-sigkeit | × 50 | 11 | 195 | 197,4 |
| 3 | Serum | × 1 | 25 | 2,1 | 2,210 |
| 4 | do. | × 1 | 20 | 2,5 | 2,302 |
| 5 | do. | × 1 | 3,8 | 8,6 | 9,020 |
| 6 | do. | × 1 | 12 | 3,7 | 3,723 |

Beispiel 7

1. Herstellung eines mit Oxytocin sensibilisierten Latexreagens.

Man vermischt 1,0 ml einer Oxytocinlösung mit einer Konzentration von 220 IE/ml in einer wässrigen 0,1n Essigsäurelösung mit 0,5 ml eines Polystyrolatex mit einem durchschnittli-

chen Teilchendurchmesser von 0,481 µm (Dow-Chemical Company, der einen Feststoffgehalt von 10 Gew.-% aufweist)

65 und röhrt die Mischung bei Raumtemperatur während 2 Stunden, wonach man sie während 20 Minuten unter Kühlung auf 2 bis 4 °C (bei 12 000 min⁻¹) zentrifugiert. Die Niederschläge trennt man durch Dekantieren ab und dispergiert die erhaltenen

Oxytocin-sensibilisierten Latexteilchen in 4 ml einer Äthylen-diamintetraessigsäure-Glycin-Pufferlösung, die 0,2 Gew.-% Rinderserumalbumin enthält, unter Bildung eines Oxytocin-sensibilisierten Latexreagens, das die Latexteilchen in einer Konzentration von 1 Gew.-% enthält.

2. Bestimmung der optimalen Konzentration von Oxytocin-Antiserum

Man vermischt einen aliquoten Anteil von 0,1 ml des gemäss Abschnitt 1 bereiteten Oxytocin-sensibilisierten Latexreagens mit 0,1 ml einer isotonischen Natriumchloridlösung und 0,2 ml Oxytocin-Antiserum, das man mit einer isotonischen Natriumchloridlösung um den in der folgenden Tabelle XI angegebenen Faktor verdünnt hat. Dann schüttelt man die Mischung auf einer sich hin- und herbewegenden Schüttleinrichtung, die bei 200 Schüttelvorgängen pro Minute betrieben wird, während 12 Minuten und bestimmt dann die Extinktion bei einer Wellenlänge des angewandten Lichtes von 1,2 μm in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XI angegeben.

Tabelle XI

| Verdünnungsfaktor des Oxytocin-Antiserums | Extinktion bei 1,2 μm |
|---|----------------------------------|
| $\times 20$ | 1,175 |
| $\times 30$ | 0,618 |
| $\times 40$ | 0,393 |
| $\times 50$ | 0,327 |
| $\times 80$ | 0,220 |
| $\times 100$ | 0,162 |

Aus den obigen Zahlenwerten ist ersichtlich, dass die optimale Konzentration des Oxytocin-Antiserums bei einem Verdünnungsfaktor von etwa 30 liegt.

3. Erstellung einer Eichkurve

Man beschickt ein Kunststoffreagenglas mit 0,2 ml einer Lösung, die man durch Verdünnen des in Abschnitt 2 verwendeten Oxytocin-Antiserums um einen Faktor von 30 erhalten hat, und 0,1 ml einer Standard-Oxytocinlösung (in wässriger 0,1n Essigsäure) mit der in der folgenden Tabelle XII angegebenen Konzentration und mischt gut durch. Nachdem man die Mischung während 30 Minuten bei Raumtemperatur hat stehenlassen, gibt man 0,1 ml des gemäss Abschnitt 1 bereiteten Oxytocin-sensibilisierten Latexreagens in das Reagenglas und schüttelt die erhaltene Mischung während 12 Minuten auf einer hin- und herbewegten Schüttleinrichtung bei 200 Schüttelvorgängen pro Minute. Die in dieser Weise erhaltene Flüssigkeit überführt man in eine gläserne Absorptionszelle mit einer Dicke von 2 mm und bestimmt die Extinktion bei einer Wellenlänge des angewandten Lichtes von 1,2 μm in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XII zusammengestellt.

Tabelle XII

| Konzentration der Standard-Oxytocinlösung ($\mu\text{IE}/\text{ml}$) | Extinktion bei 1,2 μm | ΔD^* |
|--|----------------------------------|--------------|
| 2 000 | 0,395 | 0,183 |
| 1 500 | 0,450 | 0,128 |
| 1 000 | 0,483 | 0,095 |
| 500 | 0,525 | 0,053 |
| 300 | 0,550 | 0,028 |
| 0 | 0,578 | — |

* ΔD = (Extinktion bei einer Konzentration der Standard-Oxy-

tocinlösung von Null)minus(Extinktion bei der angegebenen Konzentration)

Wenn man die in der obigen Tabelle angegebenen Zahlenwerte graphisch aufträgt, und zwar die Konzentration der Standard-Oxytocinlösung auf der Abszisse und den ΔD -Wert auf der Ordinate, so erhält man eine geradlinige Beziehung wie aus der Fig. 10 zu ersehen ist. Unter Anwendung der in dieser Weise ermittelten Eichkurve ist es möglich, die Bestimmung von Oxytocin in dem Serum von schwangeren Frauen zu erreichen.

Beispiel 8

15 1. Bereitung eines Humanchoriongonadotropin-sensibilisierten Latexreagens
In 5 ml 0,05n Chlorwasserstoffsäure löst man 7 900 IE/ml Humanchoriongonadotropin (hCG) und hydrolysiert das Material während 1 Stunde bei 80 °C. Nachdem man die Lösung 20 dialysiert und durch Absaugen filtriert hat, löst man das hydrolysierte Humanchoriongonadotropin in 2 ml einer 0,05m Boratpufferlösung (mit einem pH-Wert von 8,7) und verdünnt auf ein Gesamtvolumen von 10 ml. Dann gibt man nach und nach unter Rühren einen aliquoten Anteil von 5 ml einer 2%igen Lösung 25 eines Polystyrollatex mit einem Feststoffgehalt von 10 Gew.-% und einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,481 zu der Lösung des hydrolysierten Humanchoriongonadotropins. Die erhaltenen Humanchoriongonadotropin-sensibilisierten Latexteilchen werden während 20 Minuten bei 13 000 min⁻¹ 30 zentrifugiert, wonach die abzentrifugierten sensibilisierten Latexteilchen abgetrennt und in 10 ml einer 0,2%igen Lösung von Rinderserumalbumin in der Boratpufferlösung suspendiert werden. Die Suspension wird dann zentrifugiert, worauf der Niederschlag durch Zentrifugieren mit der Boratpufferlösung ge- 35 waschen und schliesslich in 10 ml der Pufferlösung suspendiert wird, so dass man ein Humanchoriongonadotropin-sensibilisiertes Latexreagens erhält, das 1 Gew.-% Latexteilchen enthält.

2. Ermittlung einer Eichkurve

Die optimale Konzentration des Antihumanchoriongonadotropinserums wird in der in Beispiel 7, Abschnitt 2, beschriebenen Weise ermittelt (die in diesem Fall einer Verdünnung um den Faktor 300 entspricht). Dann beschickt man ein Kunststoffreagenglas mit 0,2 ml einer Antihumanchoriongonadotropin-Serumlösung, die man durch Verdünnen des Serums mit einer 40 isotonischen Natriumchloridlösung um einen Faktor von 300 erhalten hat, und mit 0,1 ml einer Standard-Humanchoriongonadotropin-Lösung in der in der folgenden Tabelle XIII angegebenen Konzentration und schüttelt während 10 Minuten. Anschliessend gibt man 0,1 ml des entsprechend dem obigen Ab- 45 schnitt 1 bereiteten Humanchoriongonadotropin-sensibilisierten Latexreagens zu und schüttelt die Mischung während 10 Minuten auf einer hin- und hergehenden Schüttleinrichtung bei 200 Schüttelvorgängen pro Minute. Die erhaltene Flüssigkeit wird in eine gläserne Absorptionszelle mit einer Dicke von 50 2 mm überführt, worauf man die Extinktion bei einer Wellenlänge des angewandten Lichtes von 1,0 μm in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XIII angegeben.

60 *Tabelle XIII*

| Konzentration der Standard-Humanchoriongonadotropin-Lösung (IE/ml) | Extinktion bei 1,0 μm |
|--|----------------------------------|
| 10 | 0,140 |
| 1 | 0,208 |
| 0,1 | 0,271 |

Wenn man die obigen Zahlenwerte graphisch aufträgt, und zwar den Logarithmus der Konzentration der Standard-Humanchoriongonadotropin-Lösung auf der Abszisse und die Extinktion auf der Ordinate, so erhält man eine Eichkurve, die, wie in der Fig. 11 dargestellt ist, in den Konzentrationsbereichen, in denen die Messung tatsächlich ausgeführt wird, einen geradlinigen Verlauf zeigt.

Somit ist es möglich, unter Verwendung dieser Eichkurve Humanchoriongonadotropin im Serum von schwangeren Frauen zu bestimmen.

Beispiel 9

In einem Kunststoffreagenzglas vermischt man 0,1 ml des gemäss Beispiel 1, Abschnitt 1, bereiteten Antifibrinogen-sensibilisierten Latexreagens (wobei der durchschnittliche Durchmesser der Polystyrollatexteilchen 0,481 µm beträgt und die sensibilisierten Latexteilchen in einer Konzentration von 1 Gew.-% vorliegen) und 0,3 ml einer Standard-Fibrinogenlösung (die in einer isotischen Natriumchloridlösung, die 0,5 Gew.-% Rinderserumalbumin enthält) in der in der folgenden Tabelle XIV angegebenen Konzentration und schüttelt dann während 3 Stunden auf einer hin- und hergehenden Schüttelleinrichtung bei 200 Schüttelvorgängen pro Minute. Anschliessend bestimmt man die Extinktion bei einer Wellenlänge des angewandten Lichts von 1,2 µm in der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle XIV zusammengestellt.

Tabelle XIV

| Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung (ng/ml) | Extinktion bei 1,2 µm |
|---|-----------------------|
| 5 10 | 0,048 |
| 20 | 0,125 |
| 40 | 0,324 |
| 60 | 0,540 |
| 80 | 0,718 |
| 10 100 | 0,802 |

Wenn man auf der Grundlage der obigen Zahlenwerte eine Eichkurve erstellt, so findet man eine eindeutige Korrelation zwischen der Konzentration der Standard-Fibrinogenlösung und der Extinktion. Somit ist es erfindungsgemäss möglich, extrem geringe Fibrinogenmengen im Bereich von Nanogram/Milliliter zu bestimmen und dies mit einer Empfindlichkeit, die vergleichbar ist der Radioimmunttestmethode (RIA-Methode).

Beispiel 10

Nach der in Beispiel 1, Abschnitt 1, beschriebenen Weise bereitet man Antifibrinogen-sensibilisierte Latexreagenzien, die die Antifibrinogen-sensibilisierten Latexteilchen in Konzentrationen von 0,75 Gew.-%, 1,0 Gew.-% bzw. 2,0 Gew.-% enthalten, mit dem Unterschied, dass man einen anderen Polystyrolatex mit einem durchschnittlichen Teilchendurchmesser von 0,35 µm verwendet. Für jedes in dieser Weise bereitete Antifibrinogen-sensibilisierte Latexreagens nimmt man nach der in Beispiel 1, Abschnitt 2, beschriebenen Weise eine Eichkurve auf (bei einer Wellenlänge des angewandten Lichts von 1,2 µm und bei einer Schüttelzeit von 10 Minuten). Diese Eichkurven sind in der Fig. 12 dargestellt. Wie aus der Fig. 12 zu ersehen ist, nimmt die Nachweisempfindlichkeit für Fibrinogen mit der Konzentration der sensibilisierten Latexteilchen in dem Antifibrinogen-sensibilisierten Latexreagens zu.

Fig. 1

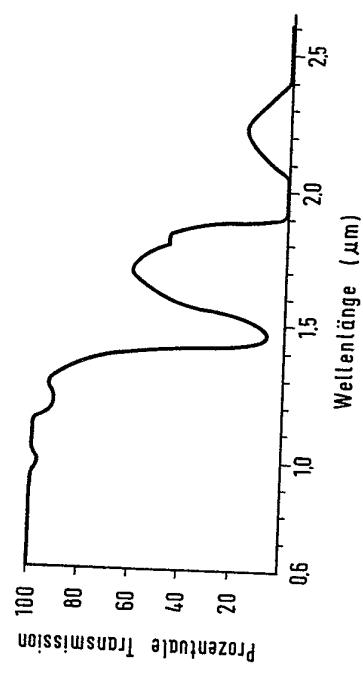


Fig. 3

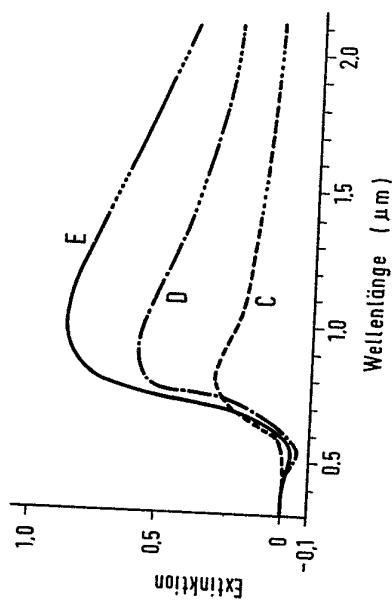


Fig. 2

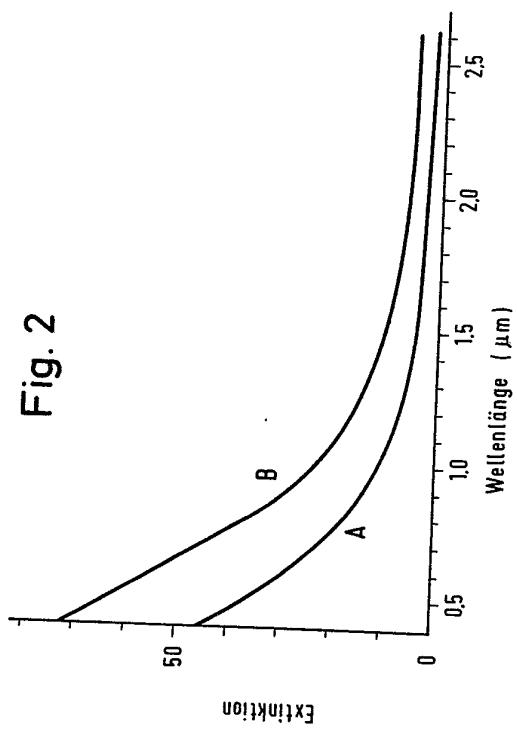
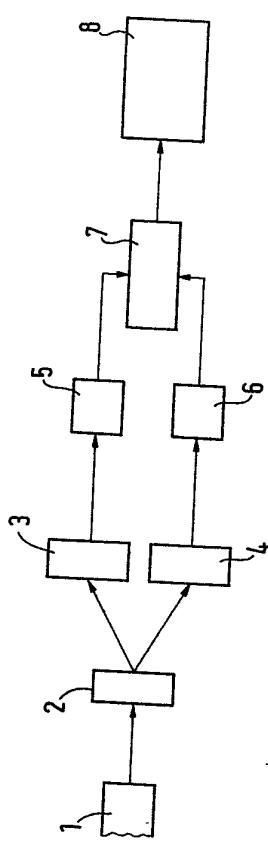
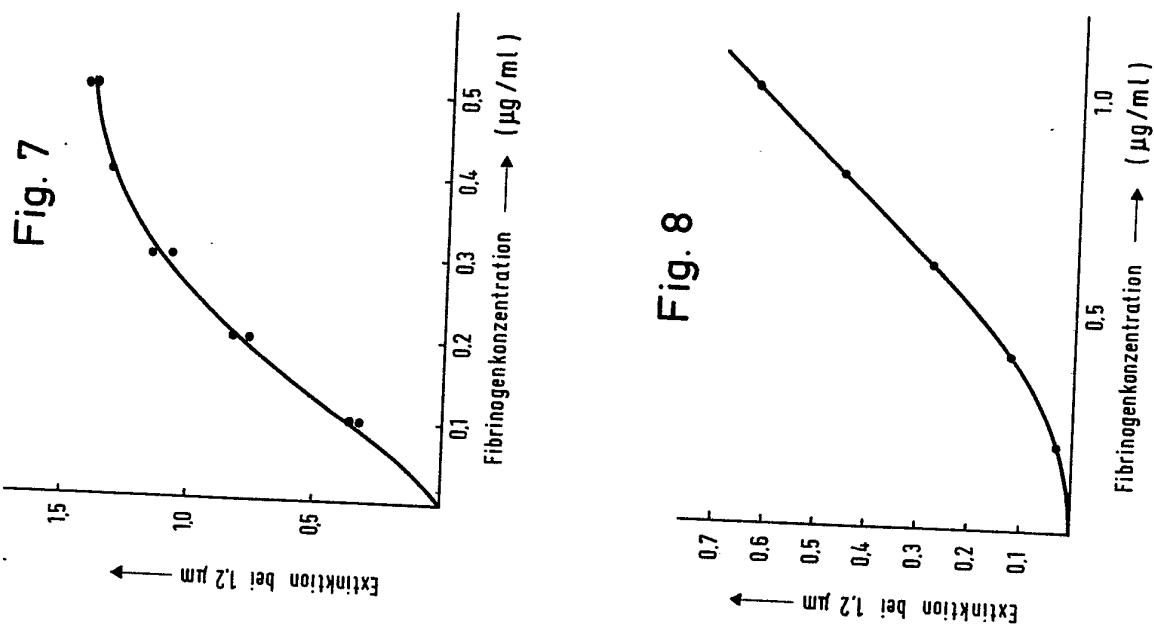
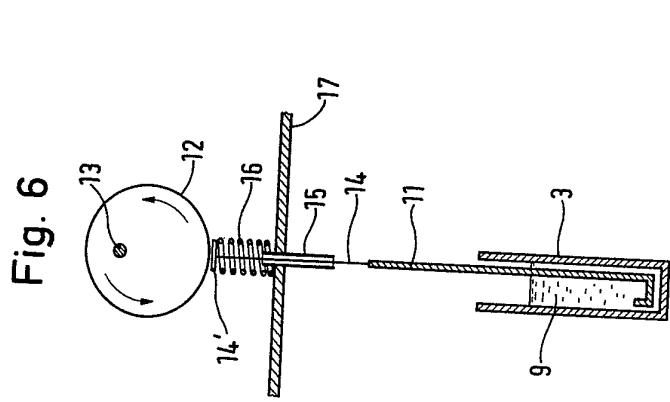
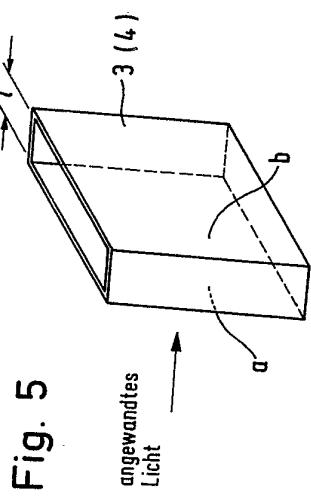


Fig. 4





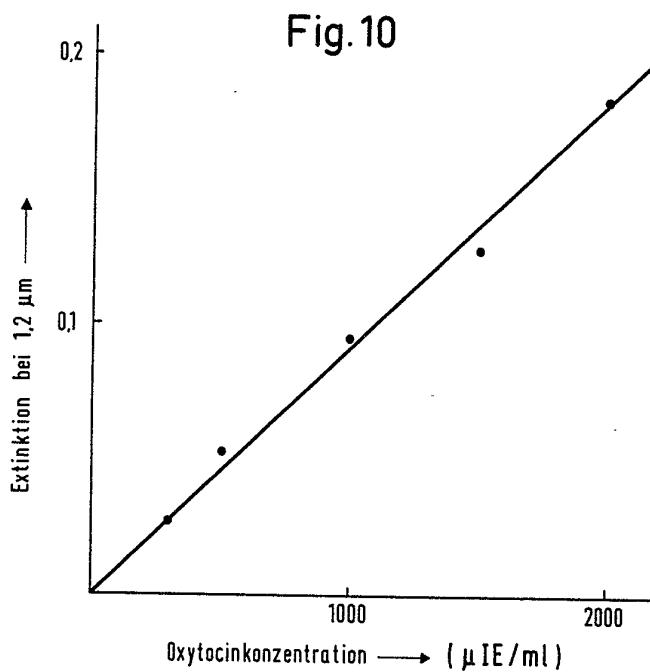
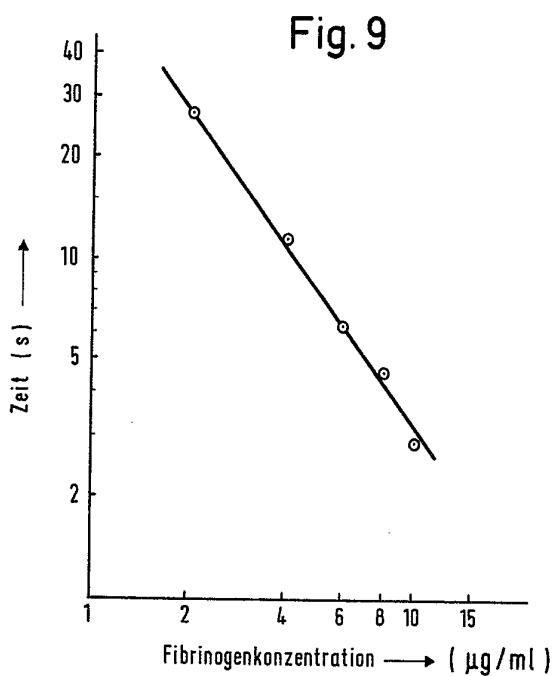


Fig. 11

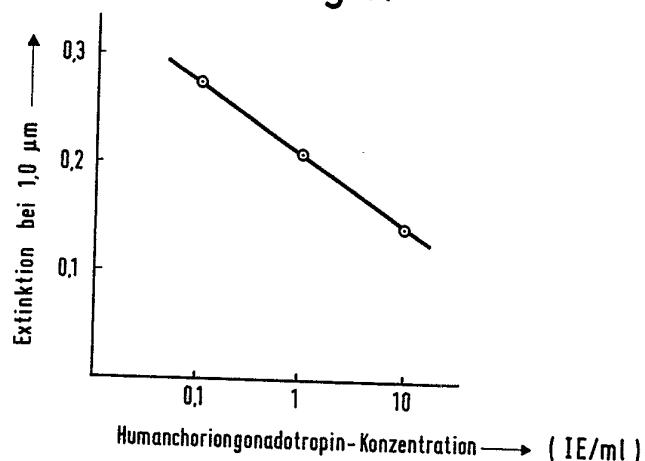


Fig. 12

