



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 65861

C (45) Patentti myönnetty 10.07.1984
Patent meddelat

(51) Kv. Ik. / Int. Cl. ³ G 01 N 33/56

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansöknings	772099
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	05.07.77
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	05.07.77
(41) Tulut julkiseksi — Blivit offentlig	21.02.78
(44) Nähtävöksiäminen ja kuuljulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.03.84
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	20.08.76
Itävalta-österrike(AT) A 6185/76	

(71) "Immuno" Aktiengesellschaft für chemisch-medizinische Produkte,
Industriestrasse 72, 1220 Wien, Itävalta-österrike(AT)

(72) Johann Eibl, Wien, Helmut Aicher, Obersiebenbrunn,
Itävalta-österrike(AT)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Laitteisto radioimmunologisen menetelmän toteuttamiseksi -
Anordning för genomföring av ett radioimmunologiskt förfarande

Keksinnön kohteena on laitteisto radioimmunologisen menetelmän toteuttamiseksi, jossa menetelmässä määritetään antigeenejä tai vasta-aineita, ja jossa käytetään mikrotiitterilevyä, jossa on syvennyksiä tutkittavien näytteiden ottoa varten ja kiinteitä, kompleksinmuodostajalla kuormitettavia kantimia.

Keksinnön mukaisella laitteella määritetään erityisesti hepatitis-B-pinta-antigeenit tai vasta-aineet ihmisen kehon nesteistä, kuten ihmisplasmasta, ihmisseerumista ja niiden jakeista, muodostamalla antigeeni-vasta-ainekompleksi, jossa vasta-aine-komponentti on merkitty radioaktiivisesti.

Radioimmunotestejä - joista käytetään myös nimitystä "radioimmunoassays" - käytettiin aluksi etupäässä hormonien osoittamiseen. Yalow'in ja Bersson'in (j. Clin. Invest. 1157 - 1175, 1960, "Immunoassays of endogenous plasma insulin in man") kuvaama järjestelmä perustuu erittäin spesifisen vasta-aineen kykyyn sitoa radioaktiivisesti merkitty antigeeninsä ja tämän reaktion estämiseen merkitsemättömällä (koe-) antigeenillä, joka on osoitettava. Tämän jälkeen sidottu radioaktiivinen antigeeni poistetaan kvantitatiivisesti testiseoksesta ja sitoutunut aktiivisuus mitataan sopivassa laitteessa. Vaikeutena tällaisia määrittäksiä suoritettaessa on saada kompleksin muodostuksessa reagoimattomat komponentit

kvantitatiivisesti erotetuiksi. Erottamista varten tulevat menetelminä kysymykseen paperisähköforeesi, saostaminen toisella vasta-aineella (kaksoisvasta-ainemenetelmä), antigeeni-vasta-aine -kompleksin saostaminen polyeteeniglykolilla, vapaan antigeenin adsorptio aktiivihillelle tai erottaminen reaktiolla jähmeällä faasilla. Jälkimmäisessä tapauksessa valmistetaan jähmeä faasi joko kovalenttisesti sitomalla reaktiokomponentti aktivoituun selluloosaan, Sephadex'iin tai Sepharose'en (Wide ja Porath, Biochem. Biophys. Acta 130, 257-260, 1966, "Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex Coupled antibodies"), tai jonkin reaktio-osapuolen adsorptiolla sopivalle pinnalle, esim. muoville, (Catt, Niall ja Tregear, Biochem. J., 100, 31C-33C, 1966, "Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone").

Hepatitis-B-pinta-antigeenin (HB_sAG) ja vastaavan vasta-aineen (antiHB_sAB) osoittamiseksi radioimmunotesteillä tunnetaan ennestään seuraavat menetelmät:

1. Ausria I, Ausria II, Ausab (Abbot Laboratories). Nämä toimivat ns. kerrosperiaatteella.

Ausria I-menetelmässä käytetään vasta-aineella kuormitettua pientä putkea, joka täytetään tutkittavalla näytteellä; inkuboinnin jälkeen muodostuu antigeenin läsnäollessa vasta-aine-antigeeni -kompleksi (AB-AG), jolloin vasta-aine -komponentti on kiinnittynyt putkeen. Neste poistetaan sitten, putki pestään ja sekoitetaan radioaktiivisesti merkityn vasta-aineen liuoksen kanssa. Uudelleen inkuboinnin jälkeen muodostuu vasta-aine-antigeeni -merkitty vasta-aine -kompleksi ($\text{AB-AG-AB}^{\text{M}}$); putki pestään jälleen ja $\text{AB-AG-AB}^{\text{M}}$ -kompleksin (kerros-kompleksin) radioaktiivisuus määritetään. Vasta-aineen merkitseminen tapahtuu sisällyttämällä radioaktiivista jodia (^{125}J) tunnetulla tavalla. Ausria II -menetelmässä käytetään pienten putkien asemesta pallomaisia jähmeitä kantimia. Ausab-menetelmä muistuttaa suuresti Ausria-menetelmää. Tässä valitaan kuitenkin päinvastainen kerros-kompleksin rakenne nimittäin $\text{AG-AB-AG}^{\text{M}}$;

2. Elektro Nucleonics Laboratories'in Riasure -menetelmä.

Tässä menetelmässä muodostetaan samalla tavalla kuin Ausria II -menetelmässä kerros-kompleksi, kuitenkin käytetään pallosten asemesta kiinteinä kantimina lasiosasia;

3. Kombi RIA Biotest -menetelmä.

Tässä antigeenin suhteen testattava näyte sekoitetaan tarkennetun

vasta-aineen kanssa ja seos siirretään antigeenillä päällystettyyn kuppiin. Inkuboinnin ja pesun jälkeen lisätään radioaktiivista antigeeniä, inkuboidaan ja pestään uudelleen.

Myös tässä on siis kysymys eräästä kerrosmenetelmästä, joissa vaaditaan perinpohjaisia pesu- ja erotusvaiheita. Antigeenin pitoisuuden näytteissä ollessa vähäinen, ovat kaikki nämä menetelmät epätarkkoja.

Saksalaisesta hakemusjulkaisusta 2 530 678 tunnetaan laitteisto ja menetelmä, jossa käytetään pallomaisia, pinnoitettuja kantimia, jotka siirretään putkimaisesta kotelosta kanninlevyn syvennyksiin. Tämä tunnettu menetelmä on hankala, koska pallomaisia kantimia joudutaan pesemään yksitellen, eli tarvitaan monimutkaista laitteistoa. Lisäksi pallomaisilla kantimilla on suhteellisen pieni pinta-ala, ja siten pieni kapasiteetti.

Saksalaisesta hakemusjulkaisusta 2 262 479 tunnetaan laitteisto ja menetelmä, jossa käytetään kartiomaisia, vain kädensijan avulla siirrettäviä kantimia. Koska nämä kantimet ja kädensija siirretään pesuvaiheen aikana ja kantimet viedään mittausrakenteeseen kädensijan avulla, on olemassa suuri kontaminaatiovaara.

Tämän keksinnön mukaisella laitteistolla vältetään kuvatut haitat ja vaikeudet, eikä tarvita kalliita erotus- ja pesuvaiheita. Lisäksi määrityksen tarkkuus paranee.

Keksinnön mukaiselle laitteistolle on tunnusomaista, että kannin käsittää pieniä levyjä tai puikkoja, jotka on kiinnitetty kiinnityslistaan ja jotka voidaan upottaa mikroitiitterilevyn syvennyksiin, jolloin kiinnityslistan ja jokaisen yksittäisen levyn väliin on tehty uurre haluttua murtumiskohtaa varten.

Keksinnön mukaista laitetta käytettäessä tapahtuu tulkin radioaktiivisuuden suoralla mittauksella jähmeästä faasista - eikä mittaamalla jäämien radioaktiivisuus, kuten tapahtuu ennestään tunnetuissa radioimmunotesteissä. Ottamatta huomioon työnsäästöä, joka saavutetaan välttämällä linkoaminen ja pipetointi, saadaan suurimmat laskenta-arvot negatiivisten tai erittäin heikosti positiivisten näytteiden alueella, mikä merkitsee oleellista parannusta ja testitulosten varmistusta.

Mikäli tutkittu näyte sisältää antigeeniä, reagoi tämä radioaktiivisesti merkityn vasta-aineen kanssa. Seuraavassa vaiheessa, jossa merkitsemättömällä antigeenillä kuormattu kannin kastetaan reaktionesteeseen, voi vain se osa merkitystä vasta-aineesta reagoida kantimelle adsorboidun antigeenin kanssa, joka ei kulunut näytteen antigeenipitoisuuden vaikutuksesta. Kantimen pesun jälkeen löydetään siis tietty määrä sidottua radioaktiivisuutta, joka on kääntäen verrannollinen näytteen antigeenipitoisuuteen.

Tapauksessa, jossa tutkittava näyte ei sisällä antigeeniä, vaan vasta-ainetta, kasvaa vasta-ainepitoisuus koenesteessä. Ensimmäisen inkuboinnin aikana ei siis tapahdu ollenkaan reaktiota. Jos sitten seuraavassa vaiheessa merkitsemättömällä antigeenillä kuormattu kiinteä kannin saatetaan kosketuksiin tutkittavan nesteen kanssa, syntyy merkitsemättömän ja merkityn vasta-aineen välinen kilpailu reaktiossa kantimella olevan adsorboidun antigeenin kanssa, mikä tarkoittaa, että myös tässä tapauksessa tietty määrä radioaktiivisuutta todetaan pestyssä kantimessa, joka määrä jälleen on kääntäen verrannollinen tutkitun näytteen vasta-ainepitoisuuteen. Jos näytteiden sarja-tutkimuksessa todetaan vähentynyt radioaktiivisuus verrattuna vertailunäytteeseen, joka sisältää joko antigeeniä tai vasta-ainetta, niin tosin tiedetään, että ko. näyte on sisältänyt joko antigeeniä tai vasta-ainetta, mutta vielä ei tiedetä kumpaa; tämän selvittämiseksi suoritetaan ns. erotusdiagnoosi, jossa samanlainen toinen näyte saatetaan kosketukseen toisen kantimen kanssa ja inkuboidaan. Kannin pestään ja saatetaan seuraavassa vaiheessa kosketukseen radioaktiivisesti merkityn vasta-aineen kanssa ja inkuboidaan. Jos tässä mittauksessa todetaan radioaktiivisuuden suurempi lukuarvo, merkitsee tämä sitä, että näytteessä ei ollut vasta-ainetta vaan antigeeniä, koska kaikki adsorboitunut antigeeni kului antigeeni-vasta-ainekompleksin muodostamiseen. Jos sen sijaan todetaan alentunut lukuarvo, tarkoittaa tämä sitä, että inkuboinnissa näytteen vasta-aine adsorboidun antigeenin kanssa kului antigeeni-vasta-ainekompleksin muodostamiseen ja vielä joitakin sitoutumiskohtia merkitylle vasta-aineelle oli vapaina antigeenillä kuormatulla kantimella.

Edullisesti käytetään hepariinilla stabiloitua, radioaktiivisesti merkittyä vasta-ainetta.

Tarkoituksenmukaisesti suoritetaan inkuboinnit lämpötilassa $18 - 45^{\circ}\text{C}$ kestoajan ollessa 30 minuutista 15 tuntiin, edullisesti 45°C :ssa 60 minuutissa.

Keksinnön mukainen laitteisto sopii erityisesti $\text{HB}_s\text{AG:n}$ ja $\text{anti-HB}_s\text{AB:n}$ määrittämiseen. Sitä voidaan periaatteessa kuitenkin käyttää kaikkien antigeenien osoittamiseen, joita vastaan voidaan kehittää spesifisiä vasta-aineita. Samoin laitteisto sopii vasta-aineiden osoittamiseen, joiden antigeenit ovat proteiineja tai polypeptidejä ja joita voidaan valmistaa puhdistetussa muodossa. Sitä voidaan käyttää myös, kuten systeemi $\text{HB}_s\text{AG/anti-HB}_s\text{AB}$ osoittaa, suhteellisen harvinaisessa tapauksessa, että potilaan seerumit sisältävät sekä antigeeniä että myös vasta-ainetta. Muita keksinnön mukaisen menetelmän käyttömahdollisuuksia ovat virus-antigeenien määrittäminen ja veren hyytymistekijöiden, erityisesti tekijä-VIII-proteiinin määrittäminen.

Kantimen kuormitus voi tapahtua siten, että sitä käsitellään upottamalla antigeeniliuokseen 24 - 60 tunnin ajaksi.

Piirroksessa on esitetty keksinnön mukaista laitteistoa, jolloin kuva 1 on kaavamainen perspektiivikuva ja kuva 2 on yhden kantimen pystyleikkaus.

Laitteisto käsittää mikrotiitterilevyn 1, jossa on useampia sarjoja, joissa on esim. 12 syvennystä 2, 2', 2"... näytteen tutkimiseksi. Lisäksi laitteistoon kuuluu kiinnityslistoja 3, joihin kuhunkin on järjestetty sarja numeroituja pieniä levyjä 4, 4', 4"... , jotka vastaavat mikrotiitterin yhden sarjan syvennyksien lukumäärää. Levyt 4, 4', 4"... on kiinnitetty kiinnityslistaan 3 kaulakappaleiden 5, 5', 5"... avulla, joiden poikkileikkaus on pienempi kuin levyjen poikkileikkaus. Nämä kaulakappaleet muodostavat halutut murtumiskohdat. Sen jälkeen, kun levyt kuvatun menetelmän mukaisesti ovat reagoineet mikrotiitterilevyn syvennyksissä tutkittavan nesteen kanssa, katkaistaan levyjen kaulat ja levyjen annetaan pudota laskentaputkeen 6, kuten kuvassa 2 on esitetty.

HB_s AG:n ja anti-HB_s AB:n määrittäminen keksinnön mukaisella laitteistolla

Tässä tutkimuksessa voi jokin ihmiskehon nesteen tutkittava näyte sisältää joko HB_s AG tai anti-HB_s AB tai ei kumpaakaan näistä kahdesta aineesta. Ensimmäisessä tutkimuserässä inkuboidaan 0,2 ml tutkittavaa ainetta n. 60 minuuttia 45°C:ssa hautomakaapissa puhdistetun ¹²⁵J:llä merkityn anti-HB_s AB:n (0,1 ml, sisältää noin 0,1 mCi) kanssa mikrotiitterilevyssä, jolloin mukaan tuodaan kaksi HB_s AG-positiivista, kolme HB_s AB/anti-HB_s AB-negatiivista ja seitsemän HB_s AG-heikosti positiivista vertailunäytettä. Tämän inkuboinnin loputtua HB_s AG:llä päällystetyt kampamaiset kantimet upotetaan ennalta inkuboituihin seoksiin ja inkuboidaan edelleen 45°C:ssa 90 - 120 minuuttia. Sen jälkeen kampamaiset kantimet poistetaan testiliuoksista ja pestään altaassa vesijohtovedellä. Yksittäiset testilevyt kampamaisilla kantimilla siirretään katkaisemalla ennalta määrätyiltä kohdilta koeputkiin ja määritetään yksittäisestä levystä gamma-spektrometrillä sitoutunut radioaktiivisuus. Mukana olleilla vertailunäytteillä 1 - 12 ja testattavilla näytteillä 13 - 24 saatiin seuraavat arvot.

Näyte	Aika minuuteissa	cpm (impulsseja/min.)
1	1.00	684
2	1.00	672
3	1.00	4 644
4	1.00	4 148
5	1.00	4 087
6	1.00	1 974
7	1.00	1 997
8	1.00	1 846
9	1.00	2 035
10	1.00	1 942
11	1.00	2 455
12	1.00	1 598
13	1.00	433 positiivinen
14	1.00	340 positiivinen
15	1.00	4 996
16	1.00	4 020
17	1.00	2 946
18	1.00	2 673
19	1.00	2 445
20	1.00	2 822
21	1.00	1 317 positiivinen
22	1.00	1 550 positiivinen
23	1.00	3 991
24	1.00	4 052

Näytteet 1 ja 2 ovat voimakkaasti HB_sAG-positiivista vertailuseerumia, näytteet 3-5 HB_sAG/antiHB_sAB-negatiivista vertailuseerumia; näytteet 6-12 ovat heikosti HB_sAG-positiivista vertailuseerumia. Näistä kolmesta ryhmästä määritettiin keskiarvot ja seitsemällä HB_sAG-heikosti positiivisella vertailuseerumilla lisätään 20 % keskiarvoon tai vähennetään siitä. Nyt vaaditaan, että vähintään kuusi näistä seitsemästä näytteestä ovat määritetyissä rajoissa. Jos yksi näyte on näiden raja-arvojen ulkopuolella (tässä esiintyvässä sarjassa näytenumero 11), niin sen arvoa ei arvosteta.

telussa oteta huomioon. Jäljelle jäävän kuuden näytteen keskiarvo + 20 % pätee raja-arvona. Jokainen näyte, jonka laskenta-arvo on tätä raja-arvoa pienempi, on katsottava positiiviseksi ja on taulukossa merkitty positiiviseksi (näytteet 13, 14, 21, 22).

Tämän ensimmäisen testisarjan jälkeen on erotettava, onko kysymyksessä HB_sAG :n vai antiHB_sAB :n positiivinen reaktio. Erotusmääritystä varten suoritetaan nyt toinen testisarja seuraavalla tavalla:

0,2 ml:n näytteitä pannaan mikrotiitterilevylle ja inkuboidaan HB_sAG :llä päällystettyjen kampamaisten kantimien kanssa 60 minuuttia 45°C :ssa. Kantimet poistetaan sen jälkeen näyteliuoksista, ja kuten edellä kuvattiin, pestään ja inkuboidaan vielä 60-120 minuuttia 0,2 ml:ssa 1 + 1 laimennettua ^{125}J :llä merkittyä antiHB_sAB fysiologisessa suolaliuoksessa. Sen jälkeen kampamaiset kantimet pestään toisen kerran ja tutkitaan, kuten edellä gamma-spektrometrissä. Tällöin on otettava huomioon, että ensimmäisessä testisarjassa, kun näytteessä on läsnä HB_sAG ensimmäisessä inkuboinnissa tapahtuu radioaktiivisesti merkityn vasta-aineen spesifinen esytyminen, ja kun näytteessä on läsnä antiHB_sAB tapahtuu kuitenkin ainoastaan vasta-aineen kokonaismäärän lisääntyminen reaktioseoksessa. Kampamaisten kantimien upottamisen jälkeen sitoutuu näyteantigeeniin sitoutumaton radioaktiivisesti merkitty vasta-aine testilevyn pinnalle, ja HB_sAB :n läsnäollessa sekä osa näytteen vasta-aineesta että myös osa radioaktiivisesti merkitystä vasta-aineesta kiinnittyy kampamaisten kantimien pinnalle. Verrattuna $\text{HB}_s\text{AG}/\text{antiHB}_s\text{AB}$ -negatiivisiin vertailunäytteisiin, tapahtuu sekä näytteen sisältäessä HB_sAG että myös näytteen sisältäessä HB_sAB testilevyillä laskenta-arvojen aleneminen. Erotusmäärityksessä inkuboitaessa kampamaisia kantimia näytteiden kanssa, kun näytteissä on läsnä HB_sAG tai kun näytteet ovat $\text{HB}_s\text{AG}/\text{antiHB}_s\text{AB}$ -negatiivisia, ei tapahtu immunologista reaktiota. Jos antiHB_sAB on näytteessä, niin se voi täyttää antigeenisitoutumispaikat kampamaisella kantimella.

Jos nyt kampamaiset kantimet pestään ja vielä uudelleen, tällä kertaa ^{125}J :llä merkityn antiHB_sAB :n kanssa inkuboidaan, niin voi radioaktiivinen aine täyttää ainoastaan vielä vapaat antigeenisitoutumispaikat jähmeällä faasilla. Tapahtuu siis, kun näytteessä on läsnä antiHB_sAB , laskenta-arvojen pieneneminen. HB_sAG :n tai $\text{HB}_s\text{AG}/\text{antiHB}_s\text{AB}$ -negatiivisten näytteiden läsnäollessa pysyvät laskenta-arvot korkeina.

Saadut tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

Näyte	Aika minuuteissa	opm (impulsseja/min.)
1	1.00	3 866
2	1.00	3 716
3	1.00	3 949
4	1.00	3 799
5	1.00	3 964
6	1.00	1 435
7	1.00	1 504
8	1.00	1 605
9	1.00	1 627
10	1.00	1 482
11	1.00	1 449
12	1.00	1 448
13	1.00	3 951 positiivinen HB _s AG
14	1.00	4 026 positiivinen HB _s AG
15	1.00	3 910
16	1.00	3 996
17	1.00	3 884
18	1.00	3 843
19	1.00	3 917
20	1.00	3 871
21	1.00	363 positiivinen antiHB _s AB
22	1.00	1 335 positiivinen antiHB _s AB
23	1.00	3 776
24	1.00	3 778

Vertailuseerumina numero 1 ja 2 HB_s AG käytettiin heikosti positiivista seerumia; numerot 3-5 ovat HB_s AG/antiHB_s AB-negatiivisia seerumeja ja vertailunäytteet numero 6-12 ovat antiHB_s AB-positiivisia seerumeja. Jälleen määritettiin näiden kolmen ryhmän keskiarvo sekä antiHB_s AB-positiivisen ryhmän raja-arvo kuten edellä. Jokainen näyte, jonka laskenta-arvo on tämän laskenta-arvon alapuolella, on katsottava positiiviseksi, mitä antiHB_s AB:hen tulee (näytteet 21, 22). Näytteet 13 ja 14 antoivat suuret laskenta-arvot ja ne on tulkittava HB_s AG-positiivisiksi. Kaikki muut näytteet, jotka molemmissa reaktioissa antoivat suuria laskenta-arvoja, ovat HB_s AG- ja antiHB_s AB-negatiivisia.

Alfa-fetoproteiinin määrittäminen

Alfa-fetoproteiinia, joka on puhdistettu geelikromatografiaa käyttäen, käytetään kampamaisten kantimien päällystämiseen. Anti-Alfa-fetoproteiini -vasta-ainetta puhdistetaan immuunisorboivalla aineella (BRCN-Sepharose'lla) ja merkitään ^{125}J :llä. Normaalimäärät ovat väliltä 0-40 ng/ml seerumia. Tietyissä maksasairauksissa ja syöpäsairauksissa ovat arvot nousseet välille 100 - 1 000 ng/ml.

Antigeenien tai vasta-aineiden kvantitatiivinen määrittäminen suoritetaan seuraavalla tavalla:

Vertailuseerumien asemesta käytetään määritettävän antigeenin laimennussarjaa. Laimennussarjat kalibrointikäyrän aikaansaamiseksi muodostetaan seuraavasti: Valitaan edullisesti standardin geometrisiä laimennuksia negatiivisessa vertailuseerumissa ja käytetään vertailunäytteinä lisäksi negatiivista vertailuseerumia ja merkittyä vasta-ainetta pelkästään. Näytteet, joissa on pelkkää vasta-ainetta, antavat arvoja panoksen enimmäis-sitomiskyvylle. Näytteet, joissa on negatiivista vertailuseerumia, antavat arvoja enimmäissitoutumista varten negatiivisten näytteiden läsnäollessa. Standardiantigeenin nousevan pitoisuuden mukana kalibroimiskäyrällä alenee sitoutunut aktiivisuus pitoisuuteen verrannollisesti. Kaikki vertailunäytteet arvioidaan vähintään kaksoismäärittäyksellä, edullisesti kolmoismäärittäyksellä.

Seuraavista yksittäisarvoista saatu kalibrointikäyrä on esitetty oheisessa graafisessa kaaviossa (kuva 3) ja nimetty AFP-standardiksi:

<u>Yksittäisarvot</u>	<u>Kalibrointikäyrä</u>
10 ng AFP	$c_1 = 2516$ $c_2 = 2488$ $c_3 = 2376$ $\bar{c} = 2460 \text{ cpm}$
20 ng	$c_1 = 2276$ $c_2 = 2360$ $c_3 = 2225$ $\bar{c} = 2287 \text{ cpm}$
40 ng	$c_1 = 2100$ $c_2 = 2045$ $c_3 = 2156$ $\bar{c} = 2100 \text{ cpm}$

65861

YksittäisarvotKalibrointikäyrä

80 ng	$c_1 = 1673$ $c_2 = 1515$ $c_3 = 1555$	$\bar{c} = 1581$ cpm
160 ng	$c_1 = 983$ $c_2 = 875$ $c_3 = 1006$	$\bar{c} = 955$ cpm
320 ng AFP	$c_1 = 614$ $c_2 = 588$ $c_3 = 499$	$\bar{c} = 567$ cpm
640 ng AFP	$c_1 = 143$ $c_2 = 205$ $c_3 = 166$	$\bar{c} = 171$ cpm
1280 ng	$c_1 = 122$ $c_2 = 166$ $c_3 = 89$	$\bar{c} = 126$ cpm

Negatiivinen vertailuseerumi

$c_1 = 2625$ $c_2 = 2783$ $c_3 = 2712$	$\bar{c} = 2707$ cpm
--	----------------------

Enimmäissitoutuminen ^{125}J -vasta-aineella

$c_1 = 3540$ $c_2 = 3236$ $c_3 = 3245$	$\bar{c} = 3340$ cpm
--	----------------------

Jatkomenettely on nyt samanlainen kuin edellä kuvatussa HB_s AG-testissä.

Tutkittavia näytteitä inkuboidaan merkityn vastaseerumin kanssa ja upotetaan sen jälkeen kampamaiset kantimet, jotka on päällystetty AFP:llä, mikrotiitterilevyihin. Uudelleen inkuboinnin jälkeen pestään kampamaiset kantimet ja aktiivisuus yksittäisillä testilevyillä määritetään gamma-spektrometrissä. Saadut laskenta-arvot olivat seuraavat:

Näyte

1	$c_1 = 2525$ $c_2 = 2481$ $c_3 = 2411$	$\bar{c} = 2472$ cpm
2	$c_1 = 1142$ $c_2 = 1276$ $c_3 = 1217$	$\bar{c} = 1212$ cpm
3	$c_1 = 475$ $c_2 = 512$ $c_3 = 489$	$\bar{c} = 492$ cpm

Näyte

4	$c_1 = 146$ $c_2 = 135$ $c_3 = 104$	$\bar{c} = 128$ cpm
5	$c_1 = 2017$ $c_2 = 1965$ $c_3 = 2034$	$\bar{c} = 2005$ cpm

Nämä arvot vietiin kalibrointikäyrälle ja saatiin seuraava tulos:

Koe

1	negatiivinen
2	140-145 ng
3	380 ng
4	n. 1 000 ng
5	48 ng

HCG:n (Human Chorionic Gonadotropin) määrittäminen

HCG:tä glykoproteiinihormonia, käytetään kampamaisten kantimien pölylystämiseen; antiHCG AB merkitään radioaktiivisesti ^{125}J :llä. Normaaliarvot ovat noin 2 mIU/ml; syöpäsairauksien esiintyessä kohoavat arvot 100 mIU/ml:aan asti; HCG:n määrittäminen on erityisesti seurattaessa kemo-terapiaa tärkeää.

Gastriinin määrittäminen

Gastriinia käytetään kampamaisten kantimien pölylystämiseen. Vastaineliuoksena käytetään valmiiksi tehtyä ^{125}J :llä merkittyä antigastriini-AB-liuosta.

Gastriinin määrittämisellä on yhä kasvava merkitys, koska sitä tuotetaan suoraan kasvaimista. Lisäksi esiintyy kohonneita gastriinimääriä mahan puutteellisessa hapon erityyksessä.

IgE:n määrittäminen

IgE on spesifinen immunoglobuliini, jonka läsnäolo voi antaa osoituksen luontaisten allergioiden läsnäolosta. Tässä tapauksessa kampamaisiin kantimiin sidotaan anti-IgE, joka vaikuttaa antigeeninä. Jos näytteitä, joissa on merkittyä IgE, esi-inkuboidaan ja sen jälkeen upotetaan kantimet, niin on sidottu aktiivisuus kantimilla kääntäen verrannollinen IgE-pitoisuuteen tutkittavassa aineessa.

Allergeenin määrittäminen

Jos anti-IgE:n asemesta kampamaisiin kantimiin kytketään spesifinen allergeeni (esim. penisilliini), niin voidaan merkittyjen vasta-aineiden avulla tätä allergeenia vastaan toteuttaa sama testimenetelmä allergeeni-spesifisenä.

Tetanus-vasta-aineen määrittäminen

Tetanus-vasta-aineita sidotaan kampamaisiin kantimiin. Näytteet esi-inkuboidaan ^{125}J -merkityllä tetanusoksiinilla ja sen jälkeen upotetaan kampamaiset kantimet. Tetanus-vasta-aineiden läsnäolo näytteessä todetaan laskenta-arvojen pienentymisestä verrattuna vertailunäytteisiin.

DNS-vasta-aineiden määrittäminen

Anti-DNS-vasta-ainetiittereiden määrittäminen tarjoaa herkän menetelmän Lupus erythematosus visceraliksien toteamiseksi ja tekee mahdolliseksi erotusmäärittäksen muulla tavalla syntyneistä kollagenooseista. Kampamaiset kantimet päällystetään anti-DNS -vasta-aineella. ^{125}J -merkittyä DNS inkuboidaan näytteen kanssa ja upotetaan sen jälkeen kampamaiset kantimet. Anti-DNS -vasta-aineiden läsnäolo käy ilmi pienentyneistä laskenta-arvoista testilevyillä.

Immuunikompleksien määrittäminen

Menetelmä a) Kampamaiset kantimet päällystetään kuuma-aggregoidulla IgC:lla; (IgC aggregoidaan inkuboimalla 60°C :ssa 20 minuutin jälkeen). Tämä aine käyttäytyy immunologisesti kuten immuunikompleksit. ^{125}J -merkittyä reumatekijää esi-inkuboidaan yhdessä näytteen kanssa ja se sitoutuu immuunikompleksiin. Sen jälkeen upotetaan kampamaiset kantimet. Käyttämätön merkkiaine sitoutuu testilevyihin. Pienemmät laskenta-arvot testilevyillä ilmaisevat immuunikompleksien läsnäolon näytteessä.

Menetelmä b) ^{125}J -merkitty reumatekijä voidaan korvata ^{125}J -merkityllä Clg (komplementtisysteemin ensimmäinen komponentti). Reaktiomekanismi pysyy samana.

Antigeeni-vasta-ainekompleksien määrittäminen saavuttaa yhä lisääntyvää merkitystä, koska nämä kompleksit voidaan saattaa yhteyteen joukon taudinkuvia synnyn kanssa, kuten niveltaudin, systemaattisen Lupus erythematosuksen, munuaistaudin, maksatulehduksen ja mahdollisesti syövän taudinkuvan synnyn kanssa.

Antigeenin ja vasta-aineen samanaikainen määrittäminen

Vasta-aineiden esiintyminen tutkittavaa antigeenia vastaan on tähän astisissa radioimmunotutkimuksissa epätavallista, koska useimmiten määritetään hyvin pieniä antigeenejä (esim. hormoneja), jotka itsessään eivät vaikuta antigeenisesti tai oman kehon aineina eivät tuota vasta-aineita. Koska lisääntyvässä määrin kuitenkin myös suurmolekyylisiä tautiasynnyttä-

viä aineita näillä menetelmillä tutkitaan, on tällaisissa tapauksissa otettava lukuun satunnainen vasta-aineiden esiintyminen näitä aineita vastaan yksittäisissä näytteissä.

Patenttivaatimukset

1. Laitteisto radioimmunologisen menetelmän toteuttamiseksi, jossa menetelmässä määritetään antigeenejä tai vasta-aineita, ja jossa käytetään mikrotiiterilevyä, jossa on syvennyksiä tutkittavien näytteiden ottoa varten ja kiinteitä, kompleksinmuodostajalla kuormitettavia kantimia, t u n n e t t u siitä, että kannin käsittää pieniä levyjä (4, 4', 4"...) tai puikkoja, jotka on kiinnitetty kiinnityslistaan (3) ja jotka voidaan upottaa mikrotiitterilevyn (1) syvennyksiin (2, 2', 2"...), jolloin kiinnityslistan (3) ja jokaisen yksittäisen levyn (4, 4', 4"...) väliin on tehty uurre haluttua murtumiskohtaa varten.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että kanninlevyt (4, 4', 4"...) ovat muovia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen laitteisto, t u n n e t t u siitä, että kannin on kuormitettu antigeenillä upottamalla se antigeeni-liuokseen 24 - 60 tunnin ajaksi.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen laitteiston käyttö määriteltäessä antigeenejä tai vasta-aineita ihmisen plasmasta, ihmisen seerumista tai näiden fraktioista.

Patentkrav

1. Anordning för genomföring av ett radioimmunologiskt förfarande, vid vilket bestämmes antigener eller antikroppar, och vid vilket användes en mikrotiterplatta med urtagningar för upptagande av för undersökning avsedda prov och med fasta, av komplexbildare beskiktningsbara bärare, k ä n n e t e c k n a d därav, att bäraren består av plattor (4, 4', 4"...) eller stift, vilka är fästa på en hållarlist (3) och är insättbara i urtagningarna (2, 2', 2"...) i mikrotiterplattan (1), varvid mellan hållarlistan (3) och varje enskild platta (4, 4', 4"...) är anordnat ett spår för bildning av en brottanvisning.

2. Anordning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att bärarplattorna (4, 4', 4"...) består av plast.

3. Anordning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att bäraren besiktas med antigenet genom neddoppning i en antigenlösning under en tid av 24 - 60 timmar.

4. Användning av en anordning enligt patentkravet 1 för bestämning av antigener eller antikroppar i humanplasma, humanserum, eller deras fraktioner.

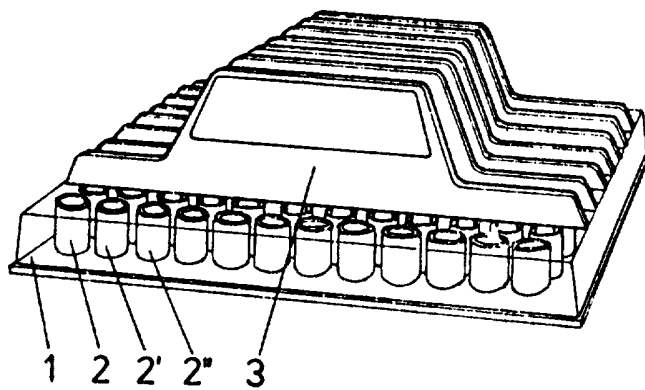
Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 262 479 (G 01 n 33/16), 2 530 678 (G 01 N 33/16).

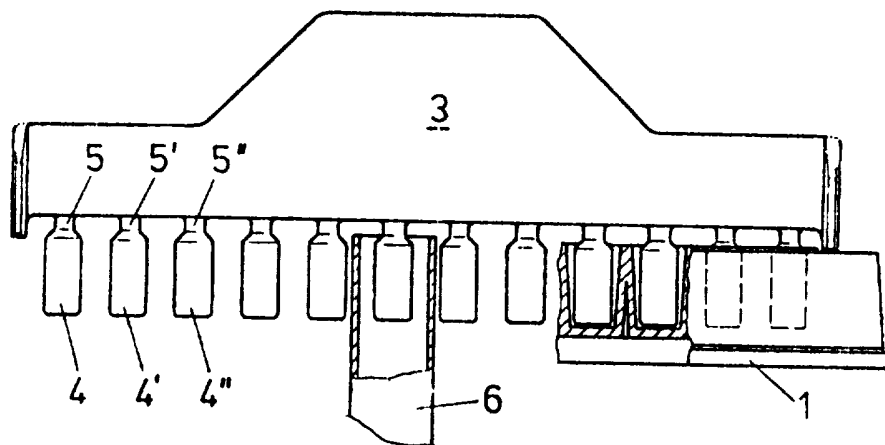
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 4 067 959.

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Kirkham and Hunter: Ria Methods, Livingston, London, 1971, p. 447-460.

KUVA 1



KUVA 2



KUVA 3

