

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 924549 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 924549

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
G01N 33/569
G01N 33/543

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 08.10.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 08.10.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 09.04.1993

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

08.10.1991 US 774019

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eastman Kodak Co, 343 State Street, Rochester, NY 14650, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Boyer, Bradley Porter, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Contestable, Paul Bernard, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Snyder, Brian Anthony, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Pesukoostumus ja testilaitte ja -menetelmä hammassairauksiin liittyvien mikro-organismien määrittämiseksi

Tvättkomposition och testanordning och -metod för bestämning av mikroorganismer förknipade med tandsjukdomar

Pesukoostumus ja testilaite ja -menetelmä hammassairauksiin liittyvien mikro-organismien määrittämiseksi

5 Esillä oleva keksintö koskee vesipohjaista pesukoonpanoa, diagnostista testikäyttöpakkausta ja menetelmää pesukokoonpanon käyttämiseksi periodontaalitauteihin liittyvien mikro-organismien määrittämiseksi. Menetelmä on erikoisen käyttökelpoinen määritettäessä mitä tahansa mikro-organismia Actinobacillus actinomycescomitans, Prevotella intermedia (aiemmin tunnettu nimellä Bacteroides intermedius) tai Porphyromonas gingivalis (aiemmin tunnettu nimellä Bacteroides gingivalis).

15 Terveysthuollossa, tutkimuksessa ja diagnostisissa menetelmissä on olemassa jatkuva tarve nopeista, tarkoista ja kvalitatiivisista tai kvantitatiivisista biologisten aineiden määrittämisestä, jotka biologiset aineet ovat läsnä biologisissa nesteissä matalina konsentraatioina. Esimerkiksi lääkkeiden, huumausaineiden, hormonien, steroidien, polypeptidien, prostaglandiiniinien tai infektiivien organismien läsnäolo veressä, virtsassa, syljessä, emättimen eritteissä, hammasplakissa, ientaskun nesteessä ja muissa biologisissa näytteissä on määritettävä tarkasti ja nopeasti sopivaa diagnoosia tai hoitoa varten.

25 Sellaisten määrittäysten suorittamiseksi on kehitetty monia erilaisia menetelmiä, joissa biologisten aineiden eristämisessä ja tunnistamisessa käytetään hyväksi tunnistettavan aineen (jota joskus kutsutaan nimellä "ligandi") ja sen kanssa spesifisesti reagoivan yhdisteen (jota joskus kutsutaan nimellä "reseptori") välisiä spesifisiä sitoutumisreaktioita.

30 Sen jälkeen, kun spesifinen sitoutumiskompleksi ligandin ja reseptorin välille on muodostettu, on tavallisesti tarpeellista erottaa kompleksi kompleksoitumattomista materiaaleista. Yleisin spesifinen sitoutumisreaktio sisältää antigeenin (tai antigeenin kaltaisen materi-

aalin) ja sen vastaavan vasta-aineen, jotka muodostavat keskenään immunologisen kompleksin. Kompleksoitumaton antigeeni ja vasta-aineet erotetaan yleensä kompleksista käyttäen erilaisia menetelmiä. Erotus voidaan suorittaa
 5 esimerkiksi suodattamalla, sentrifugoimalla tai affiniteettikromatografialla. Kuitenkin useimmissa testeissä kompleksi liuotetaan ja kompleksoitumattomat materiaalit pestään siitä pois. Yleiset pesuliuokset sisältävät ti-
 10 lattua vettä, erilaisia puskureita ja useita erilaisia liuoksia, jotka sisältävät ionittomia, anionisia tai kationisia pinta-aktiivisia aineita.

On kuitenkin havaittu, että kaikki pesuliuokset eivät poista tehokkaasti kompleksoitumattomia materiaaleja kaikissa spesifisen ligandin testityypeissä. Tehokkuudella
 15 tarkoitetaan, että kompleksoitumattomat materiaalit poistetaan siinä määrin, että testitulos osoittaa ainoastaan kompleksoituneiden materiaalien läsnäolon niin, että on olemassa pienin mahdollinen tausta tai ristireaktio ligan-
 20 din ja epäspesifisesti sitoutuvien proteiinien välillä. Näin ollen se, mikä voi olla käyttökelpoinen pesukokoonpanona yhdessä testissä, ei välttämättä ole käyttökelpoinen toisessa. Jos pesukokoonpano on tehoton, voi esiin tulla ei-toivottu tausta, joka hämärtää todellisen testi-
 25 tuloksen. Yksi ei-toivottu tulos voi olla "väärä positiivinen", joka johtuu liian korkeasta taustasta tai ristireaktiosta. Toinen ei-toivottu tulos voi olla todellinen positiivinen, mutta tausta voi hämärtää positiivisen tuloksen suuruuden.

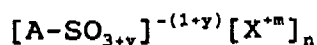
Spesifisten mikro-organismien on osoitettu olevan
 30 indikaattoreita useille ihmisten ja eläinten periodontaalitaudeille, kuten ientulehdukselle ja hammasta ympäröivän kudoksen tulehdukselle. Sellaisten tautien merkitys on kasvamassa ihmispopulaatiossa erikoisesti siksi, että ihmiset elävät kauemmin, ja sellaisten tautien ehkäiseminen
 35 on tulossa melkoisen tärkeäksi hammaslääkäreille, vakuu-

tuksen kantajille ja terveydenhuoltoteollisuudessa ylipää-
tänsä. Lisäksi kulttuurissamme on eläinten oikea hammas-
hoito kasvavan huolen aiheena.

Alalla tapahtunut kehitys, joka koskee periodontaa-
litauteihin liittyvien mikro-organismien tunnistamista, on
5 kuvattu ja vaadittu patentissa EP-A-0 439 210. Tämä tapaus
kuvaava näiden mikro-organismien, ja erikoisesti Actinoba-
cillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis ja
Prevotella intermedia -mikro-organismien, samanaikaisen
10 tunnistuksen ja erottamisen immunometrisessä (tunnetaan
myös nimellä kerrostesti) testissä käyttäen veteen liuke-
nemattomia reagensseja, jotka on sijoitettu määritellyille
alueille mikrohuokoiselle suodatinkalvolle. Testin aikana
kompleksoitumattomat materiaalit pestiin kalvon läpi käyt-
15 täen tavallista pesuliuosta, jossa oli natriumdekyylisul-
faattia vedessä (pH 7).

Samalla, kun mainittu yhtäaikaaisesti suoritettava
testi edustaa tärkeätä edistystä alalla mainittujen mikro-
organismien tunnistamiseksi, joissain tapauksissa havait-
20 tiin vääriä positiivisia silloin, kun näyte, joka sisälsi
korkeita määriä yhtä tai useampaa kolmesta organismista,
saatettiin kosketukseen vasta-ainereagenssit sisältävän
kalvosubstraatin eri alueiden kanssa. Ratkaisu tähän on-
gelmaan on kriittinen, koska testin käyttäjälle on erit-
25 täin tärkeätä erottaa mikro-organismit toisistaan taudin
tehokasta diagnoosia ja hoitoa varten ilman, että syntyy
merkittävää ilmeistä ristireaktiota antigeenin ja epäspe-
sifisten vasta-aineiden välillä.

Yllä mainittu ongelma ratkaistiin käyttäen testissä
30 hyvin spesifistä pesukokoonpanoa. Tälle vesipohjaiselle
pesukokoonpanolle on ominaista, että se on puskuroitu
pH:hon, joka on vähemmän tai yhtäsuuri kuin 6 tai suurempi
tai yhtäsuuri kuin 9, että se sisältää ainakin 0,1 paino-
prosenttia anionista pinta-aktiivista ainetta, joka on
35 kaavan:



5 mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on ainakin 180, X^m on vety tai monovalentti tai divalentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai 2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2.

Tämä keksintö esittää myös diagnostisen testikäyttöpakkauksen spesifisesti sitoutuvan ligandin määrittämiseksi, joka sisältää erillisissä pakkauksissa:

- 10 (1) vesipohjaisen pesukokoonpanon, ja
 (2) reseptorin spesifisesti sitoutuvalle kohdeligandille, käyttöpakkaukselle ollessa ominaista, että pesukokoonpano on yllä kuvatun mukainen.

Lisäksi menetelmä periodontaalitauteihin liittyvän mikro-organismin määrittämiseksi sisältää vaiheet, joissa:
 15 A. muodostetaan veteen liukenematon kompleksi periodontaalitautiin liittyvästä mikro-organismista uutetun antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen välille,
 B. erotetaan kompleksoitumattomat materiaalit veteen liukenemattomasta kompleksista pesemällä yllä kuvatulla vesipohjaisella pesukokoonpanolla, ja
 20 C. tunnistetaan veteen liukenematon kompleksi osoituksena mikro-organismin määrittämisestä.

Esillä oleva keksintö koskee tietyn pesukokoonpanon käyttöä, jonka pesukokoonpanon on osoitettu alentavan tai poistavan väärien positiivisten määrää testeissä, erikseen testeissä, joita käytetään periodontaalitauteihin liittyvien mikro-organismien määrittämiseksi. Kuitenkin on ymmärrettävä, että pesukokoonpanon tehokkuus ei ole rajoitettu tässä kuvattuihin spesifisiin suoritustapoihin vaan sitä voidaan käyttää missä tahansa spesifisissä sitoutumistestityypeissä, joissa kompleksoitumattomat materiaalit poistetaan liukenemattomasta kompleksista.

Tämän keksinnön mukaisella pesukokoonpanolla on
 35 mainitut edut johtuen määritellyn anionisen pinta-aktiiv-

visen aineen läsnäolosta ja spesifisestä pH:sta, joka on joko yhtä suuri tai suurempi kuin 9 tai yhtä suuri tai pienempi kuin 6. Kuten alla on osoitettu, tavanomaiset pesukokoonpanot, joilla on neutaali pH (se on 7), eivät ratkaise mainittua ongelmaa. Lisäksi testattiin suuri määrä erilaisia pinta-aktiivisia aineita ja ainoastaan tähän liitetyn kaavan mukaiset aineet ratkaisivat ongelman.

Kuvio 1 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevassa esimerkissä 1 kuvatuissa testeissä verrattuna kontrolleihin A ja B.

Kuvio 2 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevassa esimerkissä 2 kuvatuissa testeissä verrattuna kontrolleihin A, C ja D.

Kuvio 3 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevassa esimerkissä 3 kuvatuissa testeissä verrattuna kontrolleihin A, B ja E - H.

Kuvio 4 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevissa esimerkeissä 4 ja 5 kuvatuissa testeissä verrattuna kontrolleihin A ja I - Q.

Kuvio 5 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevissa esimerkeissä 6 - 8 kuvatuissa testeissä verrattuna kontrolleihin A ja R - U.

Kuvio 6 on pylväsdiagrammi värisignaalituloksista, jotka saatiin alla olevissa esimerkeissä 10 - 16 kuvatuissa testeissä käyttäen tämän keksinnön mukaisia eri pesukokoonpanoja.

Esillä oleva keksintö esittää pesukokoonpanon ja diagnostisen testikäyttöpakkauksen, jota voidaan käyttää missä tahansa spesifisessä sitoutumistestissä, jossa tutkittava ligandi kompleksoituu sen vastaavan reseptorin kanssa ja jossa kompleksoitumattomat materiaalit poistetaan pesemällä ennen kompleksin tunnistusta. Ligandit, jotka voidaan kompleksoida tällä tavoin, ovat alalla hyvin tunnettuja ja sisältävät antigeeniset proteiinit ja hiilihydraatit, toksiinit, lektiinit, lääkkeet, entsyymit, ste-

roidit, vitamiinit, polysakkaridit, glykolipidit, alkaloidit, mikro-organismit, virukset, alkueläimet, hapteenit, vasta-aineet, avidiinin ja sen johdannaiset, biotiinin ja sen johdannaiset, nukleiinihapot, aminohapot, peptidit, 5 polypeptidit, glykopeptidit ja kaikki edellä mainittujen materiaalien osat. Tätä keksintöä käytetään suositeltavasti immunologisten materiaalien tunnistamiseksi.

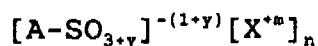
Menetelmää tutkittavan ligandin tunnistamiseksi voidaan käyttää testattaessa ihmisen tai eläimen biologista nestettä tai tutkittavaa näytettä, jotka sisältävät, 10 mutta eivät ole rajoittuneet, kokoveren, plasman, seerumin, imunesteen, sappinesteen, virtsan, selkäydinnesteen, siemennesteen, emättimen eritteet, ysköksen, hien, ulostenäytteet, kudosten nestevalmisteet, hammasta ympäröivän kudoksen, hammasplakin, ientaskun nesteen ja syljen. 15

Tämän keksinnön mukainen pesukokoonpano on vesipohjainen puskuroitu liuos, joka pitää taustan matalana erikoisesti silloin, kun useita ligandeja tunnistetaan yhtäaikaan samassa testilaitteessa.

20 Pesukokoonpano on puskuroitu mihin tahansa sopivaan pH:hon, vaikka on suositeltavaa, että pH on suhteellisen korkea, joka on 9 tai yli, tai suhteellisen matala, joka on 6 tai alle. Suositeltavammin korkeammalla pH-alueella kokoonpanon pH on 9,5 - 11 niin, että pH 10 on suositel- 25 tavin. Jos pH on alle 6, sen on suositeltavaa olla välillä 4 - 6.

Sopiva pH voidaan saada aikaan käyttämällä sopivaa määrää yhtä tai useampaa sopivaa puskuria. Kunkin puskurin määrä riippuu sen puskurikapasiteetista ja siitä, mikä on 30 haluttu pH. Yleensä se on ainakin 0,05 molaarinen. Glysiini on suositeltava puskuri korkealle pH-alueelle ja meripihkahappo tai 2-(4-morfolino)etaanisulfonihappo on suositeltava puskuri matalalle pH-alueelle.

35 Pesukokoonpanossa on keskeisenä osana anioninen pinta-aktiivinen aine, joka on kaavan:



5 mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on ainakin 180, X^m on vety tai monovalentti tai divalentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai 2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2.

Erikoisemmin mainitussa kaavassa A on lineaarinen, haarautunut tai syklinen hiilivety, jossa on 13 - 18 hiiliatomia ja näin ollen molekyylipaino on välillä noin 10 180 - 250. Sellaiset hiilivetyryhmät sisältävät lineaarisen tai haarautuneen alkyylin (esimerkiksi tridekyyli, tetradekyyli ja haarautuneet ekvivalentit), sykloalkyylin, jossa on yksi tai useampi alkyyli substituentti (esimerkiksi sykloheksyyli, joka on substituoitu lineaarisella tai haarautuneella C^7 -ryhmällä tai korkeammilla alkyyleillä 15 tai useilla alemmilla alkyyleillä) ja aromaattiset hiilirengaat, joissa on yksi tai useampi alkyyli substituentti (esimerkiksi fenyyli, joka on substituoitu C_7 -ryhmällä tai korkeammilla alkyyleillä). Kun A:ssa on enemmän kuin 16 20 hiiliatomia, se on alkyyli syklyyli, suositeltavasti alkyyli fenyyli. Lisäksi sellaisissa tapauksissa syklyyli ryhmä voi olla substituoitu useammalla kuin yhdellä alkyyllillä. On tärkeätä, että hiilivety ei ole niin iso, että pinta-aktiivinen aine menettää vesiliukoisuutensa tai veteen 25 dispersoituvuutensa.

Yhdessä suositeltavassa suoritustavassa mainitun kaavan A on alkyyli tai alkyyllillä substituoitu fenyyli, jonka molekyylipaino on 180 - 250. Alkyyliissä on 7 - 12 hiiliatomia ja se on lineaarinen tai haarautunut. Käyttökelpoisia alkyyli ryhmiä ovat esimerkiksi n-oktyyli, iso-oktyyli, n-dekyyli, 2,2-dietyylibutyyli, 2-etyylidekyyli ja dodekyyli. Tämän suoritustavan mukainen käyttökelpoinen anioninen pinta-aktiivinen aine on kaupallisesti saatavissa ARCO'ltä tuotemerkillä ULTRAWET 60L. 30

Toisessa ja vielä suositeltavammassa suoritustavassa anionisella pinta-aktiivisella aineella on mainittu kaava, jossa A on lineaarinen tai haarautunut alkyyli, jossa on 14 - 16 hiiliatomia (esimerkiksi tetradekyyli, heksadekyyli, 2-etyylitetradekyyli ja 2,2-dimetyylitetradekyyli). A on suositeltavasti tetradekyyli. Eräs käyttökelpoinen anioninen pinta-aktiivinen aine, tetradekyylinatriumsulfaatti, on kaupallisesti saatavissa Union Carbide Corp.'lta tuotemerkillä TERGITOL 4.

Myöskin, aiemmassa kaavassa kaikissa suositeltavissa suoritustavoissa m ja y ovat molemmat 1 ja n on 2.

X^m on yleensä vety tai jaksollisen järjestelmän taulukon ryhmien IA tai IIA mukainen monovalentti tai divalentti kationi, kuten alkalimetalli-ioni (esimerkiksi natrium, kalium ja rubidium) ja alkalimaametalli-ioni (esimerkiksi magnesium, kalsium ja strontium). Alkalimetalli-ionit, kuten natrium ja kalium, ovat suositeltavia. Kuitenkin, kationi voi olla myös ammonium- tai orgaaninen kationi, kuten trialkyyli- tai tetraalkyyliammoniumioni, esimerkiksi ionit, jotka muodostuvat di- ja trietanoli-amiineista, kuten di- ja tri(2-hydroksietyyli)ammonium, ja trialkyyliamiineista, tetrametyyliammoniumista ja muista, jotka ovat ilmeisiä alan asiantuntijalle, ja ariyliammoniumkationi, kuten trimetyylifenyyliammonium- ja sykliset sipulikationit, kuten 1-metyylipyridinium ja 3-metyyliimidatsolium.

Anioninen pinta-aktiivinen aine voi olla läsnä pesukokoonpanossa minä tahansa määränä, joka suo tehokkaasti pesun annetussa testissä. Tämä määrä voi vaihdella laajasti riippuen määritettävän ligandin konsentraatiosta, testimuodosta ja tunnistuskeinojen herkkyydestä. Näin ollen silloin, kun ligandi on läsnä korkeana konsentraationa ja tunnistuskeinot ovat erittäin herkkiä, pesu ei ehkä ole niin kriittinen ja anionisen pinta-aktiivisen aineen konsentraation ei tarvitse olla korkea. Päinvastaisissa olo-

suhteissa halutun pinta-aktiivisen aineen määrä voi olla korkeampi. Yleensä määrä voi olla ainakin 0,1 prosenttia perustuen kokoonpanon painoon niin, että 1 - 5 painoprosenttia on suositeltavampi.

5 Suositeltavat pesukokoonpanot sisältävät myös yhden tai useamman immunogeenisesti reagoimattoman proteiinin, kuten seerumin proteiineja (kuten naudan sikiön seerumia, härän seerumialbumiinia), kaseiinia ja muita maidon proteiineja, fibrinogeenia ja muita proteiineja, jotka ovat
10 ilmeisiä alan asiantuntijalle. Näitä proteiineja kutsutaan "immunogeenisesti reagoimattomiksi", koska ne eivät ota osaa testin spesifisiin sitoutumisreaktioihin. Ne voivat olla läsnä määränä, joka on ainakin 0,1 painoprosenttia, ja suositeltavasti 0,4 - 0,6 painoprosenttia.

15 Käyttöpakkaukset voivat sisältää erillisissä pakkauksissa tai säiliöissä pesukokoonpanon ja reseptorin, joka sitoutuu spesifisesti tutkittavan ligandin kanssa. Reseptori voi olla veteen liukeneva ja tunnistettavasti leimattu (esimerkiksi entsyymillä tai muulla leimauskeinolla) tai immobilisoitu sopivaan substraattiin. Muut
20 käyttöpakkauksen osat voivat sisältää tunnistuskeinot, kuten väriä muodostavat kokoonpanot, testilaitteet, uutokokoonpanot, liukenemattomaksi tekevät reagenssit (kuvattu alla), ohjeet, pipetit ja muut tyypillisessä testissä tarvittavat kojeet.

Erikoisesti Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis ja Prevotella intermedia -mikro-
organismit määritetään joko erillään tai samanaikaisesti käyttäen esillä olevaa keksintöä. Kuitenkin muut mikro-
30 organismit, joiden epäillään olevan liittyneinä periodontaalitauteihin, voidaan myös tunnistaa tai erottaa toisistaan tämän keksinnön mukaisesti. Sellaiset muut mikro-
organismit sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, Wolinella recta, Bacteroides forsythus, Eikenella corrodens,
35 Fusobacterium nucleatum ja Troponema denticola -lajit.

Joissain suoritustavoissa on samantekevää, mitkä serotyy-
pit mistä tahansa näistä mikro-organismeista ovat läsnä.
Toisissa suoritustavoissa keksintöä voidaan käyttää yhden
lajin eri serotyyppien erottamiseksi toisistaan kuin myös
5 lajien välillä.

Samalla, kun määritettävät ligandit voivat olla
koskemattomia mikro-organismeja, on suositeltavaa uuttaa
tutkittava ligandi (esimerkiksi lipopolysakkaridi, kapse-
liantigeeni tai muu membraaniproteiini) isäntäorganis-
10 ta. Periodontaalitauteihin liittyvien mikro-organismien
määrittäytösteissä sellaiset antigeenit voidaan uuttaa syl-
jestä, kurkun tai suun limasta, ihmisen tai eläimen kud-
osteista, hammasplakista tai ientaskun nesteestä.

Tämän keksinnön suorituksessa käyttökelpoiset vas-
15 ta-aineet voivat olla monoklonaalisia tai polyklonaalisia.
Monoklonaaliset vasta-aineet voidaan valmistaa käyttäen
standardeja menetelmiä. Polyklonaaliset vasta-aineet voi-
daan myös tuottaa käyttäen standardeja menetelmiä. Suosi-
teltava menetelmä erittäin spesifisten polyklonaalisten
20 vasta-aineiden saamiseksi yleensä vaatii vaiheet, joissa
nisäkäsi injektoidaan immunisoivalla määrällä antigeeniä
ensimmäisellä kerralla, nisäkäsi injektoidaan toisen kerran
2 - 14 vuorokautta ensimmäisen injektion jälkeen antigeen-
in tehostavalla annoksella ja aloittaen 15 vuorokautta
25 ensimmäisen injektion jälkeen nisäkäsi injektoidaan ainakin
kolme kertaa seitsemän vuorokauden aikana antigeenin te-
hostavalla annoksella niin, että käytetään ainakin neljää
seitsemän vuorokauden ajanjaksoa. Alan asiantuntija voi
helpsti määrittää immunisoivan ja tehostavan määrän. Vii-
30 meisen tehostavan injektion jälkeen nisäkkäästä poistetaan
antiseerumi.

Kun antigeeni on uutettu ja sille antigeenille spe-
sifiset vasta-aineet on tuotettu, tämän keksinnön mukainen
menetelmä suoritetaan muodostamalla antigeenin ja vasta-
35 aineen välinen tunnistettava veteen liukenematon immuno-

loginen kompleksi. Tämä kompleksin muodostus voidaan saada aikaan useilla menetelmillä ja esillä oleva keksintö ei ole rajoittunut mihinkään spesifiseen menetelmään vaikkakin alla yksityiskohtaisemmin kuvatut "kerrostestit" ovat suositeltavimpia.

Tämän keksinnön mukainen suositeltava suoritustapa on immunometrinen tai kerrostesti, jossa uutetun antigeenin annetaan reagoida eri epitooppien välityksellä kahden vasta-aineen kanssa, joista vasta-aineista toinen on leimattu tunnistettavasti ja toinen on immobilisoitu (tai joka kykenee immobiloitumaan esimerkiksi avidiini-biotiinin kompleksoitumisen tai muiden spesifisten sitoutumisreaktioiden välityksellä). Sopivat substraatit, joihin toinen vasta-aine immobilisoidaan, sisältävät ne, jotka on mainittu yllä suorille sitoutumistesteille. Suositeltavasti käytetään partikkelimaisia kantajamateriaaleja, jotka on valmistettu organismeista, luonnollisia tai synteettisiä polymeerejä, lasia, keraamisia aineita, piimaata tai magneettipartikkeleita. Nämä partikkelit ovat suositeltavammin polymeerisiä, muodoltaan pyöreitä ja niiden keski-
 koko on 0,01 - 10 μm .

Vasta-aineet voidaan kiinnittää partikkelimaisiin kantajamateriaaleihin niin, että muodostetaan veteen liukenemattomat immunologiset reagenssit fysikaalisin tai kemiallisin menetelmin, jotka sisältävät adsorption tai kovalenttisen reaktion materiaalien pinnalla olevien reaktiivisten ryhmien kanssa. Kovalenttinen kiinnitys on suositeltava parempaa testiherkkyyttä varten.

Erikoisen käyttökelpoisia partikkelimaisia kantajamateriaaleja ovat polymeerihelmet, jotka on kuvattu esimerkiksi patentissa EP-A-0 323 692, jotka valmistetaan yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymerisoituvasta monomeerista, joissa on aktiivinen haloatomi, aktivoitunut 2-substituoidut etyyli-sulfonyyli- tai vinyylisulfonyyliryhmät. Muissa erikoisen käyttökelpoisissa-

sa partikkeleissa on reaktiiviset karboksiryhmät ja ne on kuvattu haettavassa patentissa EP-A-0 466 220.

5 Vielä suositeltavammin yllä kuvatut immunologiset reagenssit päällystetään tai sijoitetaan mikrohuokoiseen suodatinkalvoon, joka on inertti kemiallisille tai biologisille reaktioille. Erikoisen käyttökelpoisia materiaaleja ovat käsitellyt tai käsittelemättömät mikrohuukoiset polyamidikalvot, kuten ne, joita on kaupallisesti saatavissa Pall Corp.'lta tuotemerkeillä LOPRODYNE™ ja BIODYNE™.

10 Kalvojen keskimääräinen huokoskoko on yleensä suurimmalta ulottuvuudeltaan 0,5 - 5 µm.

 Veteen liukenemattomat immunologiset reagenssit, joissa on sopivat vasta-aineet, voidaan kiinnittää kalvoon
15 koko sen pinnan laajuisesti tai sen määritellyille alueille.

 Kalvo voi testissä olla käsissä pidettävä niin, että siinä on kohdat uutetun antigeenin ja sen vasta-aineiden kompleksointia varten. Kuitenkin suositeltavasti
20 kalvo on sijoitettu tai kiinnitetty kertakäyttöiseen testilaitteeseen tai -kappaleeseen, jossa on sopiva kehys ja rakenne kalvon kiinnitystä ja sen läpi virtautettavaa nestettä varten. Alalla tunnetaan monia sellaisia testilaitteita. Erikoisen käyttökelpoisia testilaitteita ovat ne,
25 joita Eastman Kodak Company myy tuotemerkillä SURECELL.

 Suositeltavissa testilaitteissa on kolme testikuoppaa, jotka on suunniteltu negatiivisen ja positiivisen kontrollituloksen kuin myös näytetuloksen muodostusta varten. Kukin testikuoppa sisältää yllä kuvatun kalvon.

30 Kun antigeenin ja vasta-aineiden välinen veteen liukenematon kompleksi on muodostunut (suositeltavasti kalvolle), kompleksi pestään tämän keksinnön mukaisella pesukokoonpanolla niin, että poistetaan kompleksoitumattomat materiaalit ennen kompleksin tunnistamista. Jos
35 kompleksi on substraatilla, joka ei salli nesteen läpivir-

tausta, kompleksoitumattomat materiaalit ja neste voidaan kaataa pois tai poistaa muulla tavalla. Kun käytetään kalvoa tai suodatinta, neste ja kompleksoitumattomat materiaalit kulkevat kalvon tai suodattimen läpi ja tutkittava 5 kompleksi jää sille.

Kuitenkin suositeltavasti, riippumatta siitä, onko testimuoto suora sitoutumistesti vai immunometrinen testi, immunologinen kompleksi tunnistetaan tunnistettavan leiman avulla, joka on veteen liukenevassa reseptorissa (kuten 10 vasta-aineessa). Sellaiset leimat voivat sisältää, mutta eivät ole rajoittuneet, entsyymit, avidiinin, biotiinin, radioaktiiviset isotoopit, fluorogeenit ja kromogeenit. Entsyymit ovat suositeltavia ja niitä voidaan käyttää muodostamaan kolorimetriset, fluorometriset tai kemiluminesoivat signaalit. 15

Suosittelavassa immunometrisessä testissä antigeeni saatetaan jossain vaiheessa kosketukseen tunnistettavasti leimatun veteen liukenevan vasta-aineen kanssa. Tämä voi tapahtua ennen immunologisen kompleksin muodostusta, yhtäaikaan sen kanssa tai sen muodostumisen jälkeen, mutta yleensä ennen pesua tämän keksinnön mukaisella pesukokoonpanolla. Näin ollen antigeenin ja kahden vasta-aineen muodostama kompleksi jää suositeltavalle kalvolle, kun kompleksoitumattomat materiaalit peseytyvät läpi. Tämän 20 kerroskompleksin muodostuksen ja pesun jälkeen tunnistus suoritetaan käyttäen reagensseja ja menetelmiä, jotka on yleisesti kuvattu yllä.

Positiiviset tai negatiiviset kontrollit voidaan suorittaa yhtäaikaan näytteen testauksen kanssa. Riippuen 30 tunnistusta varten tuotetusta signaalista voidaan sopivia reagensseja lisätä signaalin muodostuksen lopettamiseksi lisäämällä esimerkiksi reagensseja värin muodostuksen tai kemiluminisenssissa valon muodostuksen lopettamiseksi.

Suositteltava menetelmä periodontaalitautiin liittyvän mikro-organismin määrittämiseksi sisältää vaiheet, joissa:

- 5 A. saatetaan vesipohjainen näyte, jonka epäillään sisältävän periodontaalitautiin liittyvän mikro-organismin uutettua antigeenia, kosketukseen mikrohuokoisen suodatin-kalvon kanssa, jossa on erillisenä alueena kalvon pinnalla veteen liukenematon reagenssi, joka sisältää veteen liu-
- 10 kenemattomat partikkelit, joihin on kiinnitetty antigeenille spesifiset vasta-aineet,
muodostamaan alueelle veteen liukenematon vasta-
aaineen ja antigeenin välinen kompleksi,
- B. saatetaan veteen liukenematon kompleksi kosketukseen tunnistettavasti leimatun toisen vasta-aineen kanssa, joka
- 15 on spesifinen antigeenille, muodostamaan tunnistettavasti leimattu veteen liukenematon kerroskompleksi alueelle,
- C. vaiheen B kanssa yhtäaikaan tai sen jälkeen erotetaan kompleksoitumattomat materiaalit leimatusta veteen liuke-
- 20 nemattomasta kerroskompleksista pesemällä kompleksoitumat-
tomat materiaalit kalvon läpi tässä kuvatulla vesipohjaisella pesukokoonpanolla,
niin, että erotetaan kompleksoitumattomat materiaa-
lit leimatusta veteen liukenemattomasta kerroskompleksis-
ta, ja
- 25 D. tunnistetaan leimattu veteen liukenematon kerroskompleksi osoitukseksi näytteessä olevasta mikro-organismista.

Suosittelavammin juuri kuvattu menetelmä on käytökelpoinen useiden sellaisien mikro-organismien yhtäaikaiseen määrittämiseen tai erotukseen, jossa menetelmässä

30 kalvolla on useita erillisiä ja toisistaan riippumattomia alueita, jotka sisältävät erilaisia veteen liukenemattomia reagensseja kullekin tutkittavalle spesifiselle mikro-organismille. Mikä tahansa tai kaikki mikro-organismeista Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotella inter-

media ja Porphyromonas gingivalis voidaan määrittää tällä tavoin.

Seuraavat esimerkit on sisällytetty kuvaamaan tämän keksinnön suoritusta eikä niiden ole tarkoitettu olevan millään tavalla rajoittavia. Kaikki prosentit ovat paino-
 5 prosentteja ellei toisin ole ilmoitettu.

Kaikissa kuvioissa pylväsdiagrammit edustavat värisignaaleja, jotka syntyivät, kun uutettu antigeeni reagoi immunologisesti kolmen läsnäolevan vasta-ainereagenssin
 10 kanssa. Hyväksyttävää testiä varten antigeenin tulee reagoida ainoastaan sitä vastaavan vasta-aineen kanssa, mutta jos on olemassa ristireaktioita johtuen antigeenin epäspesifisestä sitoutumisesta vasta-aineisiin, tuloksena syntyy ei-toivottuja värisignaaleja.

15 **Esimerkkien materiaalit ja menetelmät:**

Käytettiin kertakäyttöisiä SURECELL™-testilaitteita, jotka sisälsivät mikrohuokoiset LOPRODYNE™-nailonsuodatinkalvot (keskimääräinen huokoskoko 1,2 µm) kiinnitettynä kolmeen testikuoppaan. Kalvoa käytettiin ilman mitään lisäkäsittelyä.
 20

Väriä muodostava kokoonpano A valmistettiin niin, että se sisälsi 4,5-bis(4-metoksifenyyli)-2-(3,5-dimetoksi-4-hydroksifenyyli)imidatsoli-leukoväriä (0,008 %), polyvinyylipyrrolidonia (1 %), natriumfosfaattipuskuria
 25 (10 mmolaarinen, pH 6,8), vetyperoksidia (10 mmolaarinen), 4'-hydroksiasetaniliidia (0,5 mmolaarinen) ja dietyleenitriamiinipentaetikkahappoa (10 µmolaarinen). Väriä muodostava kokoonpano B oli sama, mutta se sisälsi 5 mmolaarisen 4'-hydroksiasetaniliidin.

30 Värin muodostuksen lopetusliuos sisälsi natriumat-sidia (0,1 %) fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa.

Useita pesukokoonpanoja kokeiltiin, kuten alla on kuvattu.

Kutakin kolmea mikro-organismia Actinobacillus
 35 actinomycetemcomitans, Bacteroides intermedius ja Bacte-

roides gingivalis vastaan suunnatut polyklonaaliset vasta-
aineet valmistettiin injektoimalla kanit laskimonsisäi-
sesti. IgG-fraktiot valmistettiin ammoniumsulfaattisaos-
tuksella ja säilytettiin 4 °C:ssa fosfaatilla puskuroidus-
sa suolaliuoksessa (0,3 - 0,4 % liuos). Antiseerumien
5 tuottamiseen käytetyt bakteerikannat saatiin elävinä
viljelminä H.S. Reynolds'ltä (SUNY, Buffalo School of
Dentistry). Eristettyjä kantoja jatkoviljeltiin anaero-
bisilla maljoilla. Mikro-organismit olivat ne, jotka tun-
nistetaan tallennenumeroilla ATCC 43717, ATCC 43718 ja
10 ATCC 43719 Actinobacillus actinomycescomitans -kannalle
(A.a.) (serotyypit A, B ja C, vastaavassa järjestykses-
sä), ATCC 25611, NCTC 9336 ja ATCC 49046 Prevotella inter-
media -kannalle (P.i.) (serotyypit A, B ja C, vastaavassa
15 järjestyksessä) ja ATCC 33277, ATCC 53978 ja ATCC 53977
Porphyromonas gingivalis -kannalle (P.g.) (serotyypit A, B
ja C, vastaavassa järjestyksessä). ATCC on American Type
Culture Collection -kokoelma Rockvillessa, Marylandissa ja
NCTC on National Collection of Type Cultures -kokoelma
20 Lontoossa, Englannissa.

Veteen liukenemattomat reagenssit valmistettiin
sitomalla vasta-aineet kovalenttisesti poly[styreeni-ko-
4-(2-kloorietyyllisulfonyylimetyyli)styreeni]-polymeeripar-
tikkeleihin (keskimääräinen halkaisija 1 µm)(molaarinen
25 suhde 95,5:4,5), jotka valmistettiin käyttäen patentin
EP-A-0 323 692 (mainittu yllä) kuvaamia menetelmiä. Kova-
lenttinen kiinnitys suoritettiin lisäämällä vasta-aineet
boraattipuskuriliuokseen (0,05 molaarinen, pH 8,5) koepu-
kessa ja sekoittaen hyvin. Käytetyn A.a.:n määrä oli 0,52
30 mg/ml (kaikki serotyypit) niin, että kutakin serotyyppiä
oli 0,17 mg/ml. Käytetyt P.i.:n ja P.g.:n määrät olivat
0,75 mg/ml kumpaakin niin, että kunkin mikro-organismin
kutakin serotyyppiä oli 0,25 mg/ml. Polymeeripartikkelit
(3 % kiinteätä ainetta) lisättiin puskuroituun seokseen ja
35 tuloksena syntynyttä suspensiota pyöritettiin putken päi-

den suhteen ympäri 4 tuntia huoneenlämpötilassa niin, että sallittiin vasta-aineiden kovalenttinen kiinnittyminen partikkeleihin. Sitten suspensio sentrifugoitiin 2800 kierrosta minuutissa 10 minuutin ajan. Supernatantti kaadettiin pois ja pelletti suspendoitiin glysiinipuskuriin (0,1 %, pH 8,5), joka sisälsi ionitonta pinta-aktiivista ainetta TWEEN™ 20 (0,1 %, ICI Americas) ja mertiolaattia (0,01 %).

Yllä kuvatun reagenssin päällystysuspensio (0,35 % kiiteästä ainetta) valmistettiin niin, että se sisälsi polyakryyliamidi-sitojaa (5 %), ionitonta pinta-aktiivista ainetta TWEEN™ 20:ta (0,1 %), mertiolaattia (0,01 %) ja optista kirkastinta UVITEX™:ia (0,0005 %, Ciba-Geigy) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 8,5). Kukin erillistä antigeenia vastaan suunnattu reagenssi päällystettiin yllä kuvattujen testilaitteiden kalvojen määritellyille alueille.

Entsyymi-vasta-aine-konjugaatit valmistettiin käyttäen vasta-aineita, jotka oli suunnattu kutakin mikro-organismia vastaan, konjugoiden ne piparjuuriperoksidasiiniin käyttäen menetelmää, jonka ovat kuvanneet Yoshitake et al., Eur. J. Biochem., 101, 395, 1979. Kukin konjugaattikokoonpano sisälsi konjugaatit (7,5 - 15 µg kutakin/ml) lisättynä kaseiiniliuokseen [0,5 %, 1 %:sesta liuoksesta, joka oli 0,1 molaarisessa 3-(N-morfolino)propaanisulfonihappopuskurissa, pH 7,5], jossa oli ionitonta pinta-aktiivista ainetta TWEEN™ 20:ta (0,3 %), mertiolaattia (0,01 %) ja 4'-hydroksiasetaniliidia (10 mmolaarinen) puskurissa (0,1 molaarinen, pH 7,5). Liuos suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi.

Kokoonpano antigeenin uuttamiseksi mikro-organismeista sisälsi kationista pinta-aktiivista ainetta EMCOL™ CC-9:ää (5 %, Witco Corp.) ja natriumdodekyylisulfaattia (5 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 8,5).

Alla olevassa pesukokoonpanojen vertailussa käytetyt eri pinta-aktiiviset aineet olivat seuraavat:

TERGITOL™ 4 anioninen pinta-aktiivinen alkyylinatriumsulfaatti, jota myy Union Carbide Corp.

5 EMPHOS™ CS1361 fosfaattiesteri, jota myy Witco Corp.

AVANEL™ S-70 anioninen pinta-aktiivinen natriumalkyylietterisulfonaatti, jota myy PPG/Mazer.

10 DUPONOL™ WAQE anioninen pinta-aktiivinen natriumlauryylisulfaatti ja ZONYL™ anioninen pinta-aktiivinen fluorikemikaali, joita myy E.I. DuPont de Nemours & Co.

ULTRAWET™ 60L anioninen pinta-aktiivinen lineaarinen orgaaninen alkylaattisulfonaattisuola, jota myy ARCO.

15 MONAWET™ MM80 anioninen pinta-aktiivinen diheksyylinatriumsulfosukkinaatti, jota myy Mona Industries.

SARKOSYL™ NL anioninen pinta-aktiivinen natriumlauryylisarkosinaatti, jota myy Ciba-Geigy Corp.

20 AEROSOL™ AY100 anioninen pinta-aktiivinen natriumsulfomeripihkahapon diamyyliesteri, jota myy American Cyanamide.

TRITON™ 770 anioninen pinta-aktiivinen alkyyliaaryylipolyeetterisulfaatin natriumsuola ja TRITON™ OS44 anioninen pinta-aktiivinen fosfaatti, joita myy Rohm ja Haas.

25 HOSTAPAL™ BV anioninen pinta-aktiivinen alkyyliaaryylipolyglykolieetterisulfaatin natriumsuola, jota myy American Hoechst Corp.

POLYSTEP™ B12 anioninen pinta-aktiivinen natriumlauryylieetterisulfaatti, jota myy Stepan Co.

30 SULFOBETAINE™ DCH zwitterioninen pinta-aktiivinen alkyyliammoniumsulfonaatin sisäsuola, jota myy Textilana Corp.

Esimerkki 1**Kerrostesti keksinnön mukaista pesukokoonpanoa käyttäen**

Tämä esimerkki osoittaa tämän keksinnön mukaisen
 5 menetelmän alentavan merkittävästi taustaa kerrostes-
 teissä, joissa määritetään periodontaalitauteihin liit-
 tyviä mikro-organismeja. Se osoittaa myös pesukokoonpanon
 pH:n tärkeyden verrattuna kontrollitesteihin, joissa käy-
 tettiin pesukokoonpanoja, joiden pH oli noin 7.

10 Pesukokoonpanot:

Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetty
 pesukokoonpano koostui fosfaattipuskurissa (0,1 molaari-
 nen, pH 10) olevasta anionisesta pinta-aktiivisesta ai-
 neesta TERGITOL™ 4 (2,7 %). Kontrollitesti A suoritettiin
 15 käyttäen pesuliuksena natriumfosfaattipuskurissa (0,1
 molaarinen, pH 7,3) olevaa natriumdekyylisulfaattiliuosta
 (1,8 %). Kontrollitesti B suoritettiin käyttäen fosfaatti-
 puskurissa, jonka pH oli 7,2, olevaa anionista pinta-ak-
 tiivista ainetta TERGITOL™ 4 (2,7 %).

20 Testimenetelmä:

Tätä testimenetelmää käytettiin yleisesti kaikissa
 tämän patenttihakemuksen esimerkeissä mainituin modifika-
 tioin.

Antigeeni mikro-organismista ATCC 53978 (serotyyppi
 25 B, P.g.) uutettiin altistamalla solut yllä kuvatun mukai-
 selle uutokokoonpanolle alle minuutin ajaksi huoneenläm-
 pötilassa niin, että saatiin lopulliseksi konsentraatioksi
 $1,25 \times 10^8$ kokonaissolua/ml.

Uutos (450 µl) suodatettiin 1,2 µm kalvon läpi ja
 30 lisättiin yhteen yllä kuvatun testilaitteen testikuoppaan.
 Testilaitteen kalvossa oli määritellyt alueet reagensseil-
 le, jotka olivat spesifisiä kullekin mikro-organismille
A.a., P.g. ja P.i.. Nesteen annettiin valua testikuopassa
 olevan kalvon läpi. Heti tämän jälkeen kuhunkin testikuop-
 35 paan lisättiin vasta-aine-konjugaattikokoonpano (80 µl),

jonka jälkeen inkuboitiin 2 minuuttia huoneenlämpötilassa (noin 20 - 25 °C). Sitten kuhunkin testikuoppaan lisättiin pesuliuos (500 µl) ja sen annettiin valua läpi, jonka jälkeen suoritettiin toinen pesu (500 µl).

5 Yllä kuvatun mukainen väriä muodostava kokoonpano A (80 µl) lisättiin kuhunkin testikuoppaan, jota seurasi minuutin inkubointi huoneenlämpötilassa. Sitten värisignaali arvioitiin silmin ja sitä verrattiin kalibroituun värikarttaan, joka sisälsi heijastustiheysarvot. Sitten
10 heijastustiheydet muutettiin transmissiivitehtyysarvoiksi (D_r) käyttäen Williams-Clapper-muunnosta [katso J. Optical Soc. Am., 43, 595 (1953)]. D_r -arvot 0,003 tai vähemmän vastaavat silmin tehtyä arviointia "ei värisignaalia".

Sitten tulokset taulukoitiin seuraavasti ja muodostettiin kuviossa 1 esitetyt pylväsdiagrammit. On selvää,
15 että ainoastaan keksinnön mukainen käytetty pesukokoonpano alensi tehokkaasti taustaa, jonka muodosti P.g.-antigeenin ristireaktiot A.a.:lle ja P.i.:lle spesifisten vasta-aineiden kanssa. Tausta oli liian korkea, koska jotkin P.g.-
20 antigeenit reagoivat kontrollitesteissä epäspesifisesti A.a.- ja P.i.-vasta-aineiden kanssa. Tämä esimerkki osoittaa, että pesukokoonpanon pH:n tulisi olla enemmän kuin noin 9.

25 Taulukko I

Värisignaali D_r				
Testi	<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi	
30 Kontrolli A	0,114	0,024	0,024	
Kontrolli B	0,114	0,005	0,007	
Esimerkki 1	0,101	0,003	0,003	

Esimerkki 2

Vertailevat testit korkeassa pH:ssa käyttäen eri pinta-aktiivisia aineita

Tämä esimerkki on samanlainen kuin esimerkki 1 paitsi, että testeissä käytetyt pesukokoonpanot olivat pH:ssa 10.

Kontrollitesti A oli sama kuin esimerkissä 1. Kontrollitestissä C käytettiin fosfaattipuskurissa (0,1 molaa-
rinen, pH 10) olevaa natriumdekyylisulfaattia (1,8 %), kun taas kontrollitestissä D käytettiin samassa puskurissa olevaa natriumdekyylisulfaattia (10 %). Esimerkin 2 testi oli samanlainen kuin esimerkin 1 testi.

Testien tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa II ja graafisesti kuviossa 2. On selvää, että ainoastaan tämän keksinnön mukaisella testillä tunnistettiin P.g.-antigeeni ilman merkittävää taustaa, joka johtui antigeenin ristireaktioista muille mikro-organismeille spesifisten vasta-aineiden kanssa. Kontrollitestit osoittivat ei-hyväksyttävän korkean ristireagoivuuden ja sen mukaisesti korkean taustan. Tämä osoittaa, että pH:n lisäksi pesukokoonpanon täytyy sisältää tiettyjä pinta-aktiivisia aineita.

Taulukko II

25

Testi	<u>Värisignaali D,</u>		
	<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi
Kontrolli A	0,175	0,057	0,057
Kontrolli C	0,145	0,024	0,024
Kontrolli D	0,145	0,015	0,015
Esimerkki 2	0,145	0,003	0,003

30

Esimerkki 3

Vertailevat testit käyttäen pesukokoonpanoissa kationisia ja ionittomia pinta-aktiivisia aineita

Tämä esimerkki on useiden testien vertailu, joka suoritettiin käyttäen esimerkin 1 mukaista menetelmää, mutta käyttäen erilaisia pesukokoonpanoja.

Kontrollitestit A ja B olivat, kuten yllä on kuvattu. Esimerkki 3 suoritettiin, kuten esimerkin 1 testi. Muissa kontrollitesteissä käytettiin seuraavia pesukokoonpanoja:

Kontrolli E: kationinen pinta-aktiivinen aine EMCOL™ CC-9 (10 %) fosfaattipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 7,2).

Kontrolli F: kationinen pinta-aktiivinen aine EMCOL™ CC-9 (10 %) fosfaattipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10).

Kontrolli G: ioniton pinta-aktiivinen aine TWEEN™ 20 (10 %) fosfaattipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 7,2).

Kontrolli H: ioniton pinta-aktiivinen aine TWEEN™ 20 (10 %) fosfaattipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10).

Alla oleva taulukko III esittää testien tulokset ja tulokset on graafisesti esitetty kuviossa 3. On selvää, että ainoastaan esimerkki 3 osoittaa uutetun antigeenin (P.g.:stä) tarkan tunnistuksen ilman merkittäviä ristireaktioita muille mikro-organismeille spesifisille vasta-aineille.

Taulukko III

Testi	P.g.-reagenssi	Värisignaali D _r	
		P.i.-reagenssi	A.a.-reagenssi
Kontrolli A	0,114	0,024	0,024
Kontrolli B	0,114	0,005	0,007
Kontrolli E	0,180	0,057	0,073
Kontrolli F	0,175	0,022	0,022
Kontrolli G	0,175	0,057	0,073
Kontrolli H	0,175	0,027	0,057
Esimerkki 3	0,101	0,003	0,003

Esimerkit 4 & 5

Anionisia pinta-aktiivisia aineita sisältävien eri pesukokoonpanojen vertailut

5 Nämä esimerkit suoritettiin esimerkin 1 menetelmän mukaisesti ja niissä vertaillaan useita pesukokoonpanoja, jotka sisältävät pääasiassa anionisia pinta-aktiivisia aineita.

10 Määritettävä antigeeni uutettiin P.g.:n serotyypistä C. Esimerkki 4 ja kontrollitestit A suoritettiin, kuten esimerkin 1 testi paitsi, että esimerkissä 4 käytettiin 3-sykloheksyyliamino-2-hydroksi-1-propaanisulfonihappopuskuria (0,1 molaarinen, pH 10). Esimerkin 5 testissä käytettiin pesukokoonpanoa, joka sisälsi samassa puskurissa (0,1 molaarinen, pH 10) olevaa anionista pinta-aktiivista ainetta ULTRAWET™ 60L (5 %). Kaikissa jäljellä olevissa kontrollitesteissä käytettiin pesukokoonpanoja, jotka sisälsivät seuraavat pinta-aktiiviset aineet 3-sykloheksyyliamino-2-hydroksi-1-propaanisulfonihappopuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10):

20 Kontrolli I: anioninen pinta-aktiivinen aine EMPHOS™ CS1361 (5 %).

Kontrolli J: anioninen pinta-aktiivinen aine AVANEL™ S-70 (5 %).

Kontrolli K: ioniton pinta-aktiivinen etanoliamiini (3 %).

25 Kontrolli L: anioninen pinta-aktiivinen aine DUPONOL™ WAQE (5 %).

Kontrolli M: anioninen pinta-aktiivinen aine ZONYL™ FSJ (5 %).

30 Kontrolli N: anioninen pinta-aktiivinen aine MONAWET™ MM80 (5 %).

Kontrolli O: anioninen pinta-aktiivinen aine SARKOSYL™ NL (5 %).

Kontrolli P: anioninen pinta-aktiivinen aine AEROSOL™ AY100 (5 %).

35 Kontrolli Q: anioninen pinta-aktiivinen aine TRITON™ 770 (5 %).

Testitulokset on esitetty alla olevassa taulukossa IV ja graafisesti kuviossa 4. Ainoastaan esillä olevan keksinnön mukaiset testit tunnistivat herkästi uutetun antigeenin (P.g.:stä) ilman merkittäviä ristireaktioita muille mikro-organismeille spesifisten vasta-aineiden kanssa. Kuviossa 4 esitetyt taustasignaalit ovat signaaleja, jotka eivät liity antigeeni-vasta-aine-sitoutumiseen.

10 Taulukko IV

		<u>Värisignaali D_r</u>		
Testi		<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi
15	Kontrolli A	0,185	0,073	0,073
	Kontrolli I	0,185	0,073	0,073
	Kontrolli J	0,185	0,101	0,101
	Kontrolli K	0,185	0,114	0,114
	Kontrolli L	0,185	0,042	0,042
20	Kontrolli M	0,185	0,057	0,057
	Kontrolli N	0,185	0,027	0,027
	Kontrolli O	0,185	0,101	0,101
	Kontrolli P	0,185	0,101	0,101
	Kontrolli Q	0,185	0,108	0,108
25	Esimerkki 4	0,185	0,015	0,015
	Esimerkki 5	0,185	0,007	0,009

Esimerkit 6 - 8

30 Anionisia pinta-aktiivisia aineita käyttäen suoritettut vertailevat lisätestit

Nämä esimerkit suoritettiin seuraten kaikissa testeissä esimerkissä 1 kuvattua menetelmää. Kontrolli A oli, kuten yllä on kuvattu. Kaikki pesukokoonpanot sisälsivät mainitut pinta-aktiiviset aineet 3-sykloheksyyliamino-2-

hydroksyyli-1-propaanisulfonihappopuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10):

Esimerkki 6: anioninen pinta-aktiivinen aine ULTRAWET™ 60L (5 %).

5 Esimerkki 7: anionisten pinta-aktiivisten aineiden ULTRAWET™ 60L (5 %) ja TERGITOL™ 4 (5 %) seos.

Esimerkki 8: anioninen pinta-aktiivinen aine TERGITOL™ 4 (2,7 %).

10 Kontrolli R: anioninen pinta-aktiivinen aine TRITON™ QS44 (5 %).

Kontrolli S: anioninen pinta-aktiivinen aine HOSTAPAL™ BV (5 %).

Kontrolli T: anioninen pinta-aktiivinen aine POLYSTEP™ B12 (5 %).

15 Kontrolli U: zwitterioninen pinta-aktiivinen aine SULFO-BETAINE™ (5 %).

20 Testien tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa V ja pylväsdiagrammeina kuviossa 5. On selvää, että ainoastaan tämän keksinnön mukaiset testit antoivat halutun herkkyyden P.g.:stä uutetulle antigeenille samalla aiheuttaen merkittävästi alentuneet ristireaktiot muille mikro-organismeille spesifisten vasta-aineiden kanssa. Kuvion 5 taustasignaali oli signaali, joka ei liity anti-geeni-vasta-aine-sitoutumiseen.

Taulukko V

	Testi	Värisignaali D _r		
		<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi
5	Kontrolli A	0,195	0,101	0,101
	Kontrolli R	0,195	0,145	0,114
	Kontrolli S	0,195	0,114	0,114
	Kontrolli T	0,195	0,114	0,114
10	Kontrolli U	0,195	0,042	0,042
	Esimerkki 6	0,175	0,013	0,013
	Esimerkki 7	0,175	0,009	0,009
	Esimerkki 8	0,175	0,011	0,011
15	Esimerkki 9			
	Pesuliuoksissa olevien samanlaisten pinta-aktiivisten aineiden vertailu			
	Tässä esimerkissä vertaillaan pesukokoonpanoissa kolmea samanlaista pinta-aktiivista ainetta testeissä,			
20	jotka suoritettiin käyttäen esimerkin 1 menetelmää. Tämän keksinnön suorituksessa (esimerkki 9) käytettiin anionista pinta-aktiivista ainetta TERGITOL™ 4 (2,7 %) 3-sykloheksyyliamino-2-hydroksipropaanisulfonihappopuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10) ja sitä verrattiin selllaisten pesukokoonpanojen käyttämiseen, jotka sisälsivät anionista pinta-aktiivista ainetta TERGITOL™ 7 (kontrolli V, 0,5 %) ja anionista pinta-aktiivista ainetta TERGITOL™ 8 (kontrolli W, 5 %) glysiinipuskurissa (pH 10). 5 % konsentraationa anioninen pinta-aktiivinen aine TERGITOL™ 7 ei virrannut kalvon läpi. Se on yleensä alkyylisulfaatti, jossa on noin 17 hiiliatomia, ja anioninen pinta-aktiivinen aine TERGITOL™ 8 on yleensä alkyylisulfaatti, jossa on noin 18 hiiliatomia. Molempia myy Union Carbide.			
25				
30				
35	Testien tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa VI. On selvää, että samanlaiset pinta-aktiiviset			

aineet eivät anna haluttua herkkyyttä ja alhaista risti-reagoivuutta, jotka saavutettiin käyttäen pesukokoonpanoa, joka sisälsi anionista pinta-aktiivista ainetta TERGITOL™ 4.

5

Taulukko VI

Testi	Värisignaali D _r		
	<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi
Kontrolli V	0,175	NA	0,019
Kontrolli W	0,175	0,024	0,025
Esimerkki 9	0,175	0,011	0,011

NA = ei saatavissa

15

Esimerkit 10 - 16

Suosittelvat pesukokoonpanot ja niitä käyttävät testit

Tämän keksinnön mukainen suositeltava pesukokoonpano sisältää kaseiinia, joka on sekoitettu anionisen pinta-aktiivisen aineen TERGITOL™ 4 kanssa sopivaan puskuuriin. Näissä esimerkeissä käytetty menetelmä oli esimerkin 1 mukainen. Seuraavia tämän keksinnön mukaisia pesukokoonpanoja käytettiin:

Esimerkki 10: ainoastaan pinta-aktiivinen aine (5 %) meripihkahapossa (0,1 molaarinen, pH 5).

Esimerkki 11: ainoastaan pinta-aktiivinen aine (5 %) 2-(4-morfolino)etaanisulfonihappopuskurissa (0,1 molaarinen, pH 6).

Esimerkki 12: pinta-aktiivinen aine (5 %) ja kaseiini (0,5 %) 2-(4-morfolino)etaanisulfonihappopuskurissa (0,1 molaarinen, pH 6).

Esimerkki 13: ainoastaan pinta-aktiivinen aine (5 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 9).

Esimerkki 14: pinta-aktiivinen aine (5 %) ja kaseiini (0,5 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 9).

Esimerkki 15: ainoastaan pinta-aktiivinen aine (5 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10).

5 Esimerkki 16: pinta-aktiivinen aine (5 %) ja kaseiini (0,5 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10).

10 Testien tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa VII ja graafisesti kuviossa 6. Kaseiinin läsnäolo tuntuu alentavan ristireaktioita testeissä, joissa käytetään pesukokoonpanoja, joissa pH on lähempänä neutraalia. Kun pH tulee happamemmaksi (5 tai alle) tai emäksisemmäksi (10 tai yli), kaseiinilla on vähemmän vaikutusta. Kuvion 6 taustasignaali oli värisignaali, joka ei liity antigeeni-vasta-aine-sitoutumiseen.

15

Taulukko VII

Testi	Värisignaali D _r		
	<u>P.g.</u> -reagenssi	<u>P.i.</u> -reagenssi	<u>A.a.</u> -reagenssi
20 Esimerkki 10	0,114	0,003	0,005
Esimerkki 11	0,130	0,023	0,024
Esimerkki 12	0,145	0,011	0,015
Esimerkki 13	0,175	0,024	0,024
25 Esimerkki 14	0,160	0,011	0,017
Esimerkki 15	0,160	0,003	0,003
Esimerkki 16	0,160	0,003	0,003

Esimerkki 17

30 Keksinnön mukaiset testit, joissa määritetään antigeenin eri konsentraatiot proteiiniesikäsittelyn kanssa ja ilman

35 Esillä oleva esimerkki kuvaa tämän keksinnön suorituksen A.a.:sta, P.g.:stä ja P.i.:stä uutetun antigeenin eri konsentraatioiden määrittämiseksi. Testi suoritettiin

käyttäen esimerkissä 1 kuvattua menetelmää paitsi, että uutetun antigeenin liuokset sekoitettiin kokoonpanon kanssa, joka sisälsi AMIDEK™-proteaasia (Genencor International, Rochester, N.Y.)(300 µl liuosta, jonka konsentraatio oli 20 mg/ml), muutamaksi sekunniksi huoneenlämpötilassa ennen antigeenin lisäämistä testilaitteen testikuoppiin. Tässä esimerkissä käytettiin väriä muodostavaa kokoonpanoa B ja vasta-aine-reagenssin konsentraatiota alennettiin 25-%:tiin esimerkin 1 konsentraatiosta. Vasta-aineen määrä polymeeripartikkeleissa oli 1,5ertainen verrattuna esimerkkiin 1.

Pesukokoonpano sisälsi anionista pinta-aktiivista ainetta TERGITOL™ 4 (1,35 %), kaseiinia (0,5 %) ja time-rosaalia (0,1 %) glysiinipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 10). Kontrollitestissä käytettiin pesukokoonpanoa, joka sisälsi fosfaattipuskurissa (0,1 molaarinen, pH 7,3) olevaa natriumdekyylisulsaattia (1,8 %).

Antigeeni uutettiin P.g.:n serotyypeistä A, B ja C, P.i.:n serotyypistä A ja A.a.:n serotyypistä B. Testatut antigeenikonsentraatiot olivat P.g.:lle ja P.i.:lle $1,25 \times 10^8$ solua/ml, $1,56 \times 10^7$ solua/ml ja $1,95 \times 10^6$ solua/ml ja A.a.:lle $6,25 \times 10^7$ solua/ml, $3,91 \times 10^6$ solua/ml ja $4,88 \times 10^5$ solua/ml.

Testien tulokset on taulukoitu taulukkoon VIII. Ne kuvaavat parantuneet tulokset, jotka saatiin käyttäen tämän keksinnön mukaista menetelmää ja sitä, että proteiiniesikäsitteily auttaa ristireagoivuuden poistamisessa erikoisesti silloin, kun käytetään korkeita antigeenikonsentraatioita.

Taulukko VIII

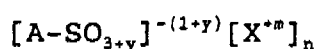
5	Antigeeni	Solu- konsent- raatio	Testi	Värisignaali D _r		
				<u>P.g.-</u> rea- genssi	<u>P.i.-</u> rea- genssi	<u>A.a.-</u> rea- genssi
	P.g.:n	1,25 x 10 ⁸	kontrolli esim. 17	0,175	0,089	0,089
	serotyyppi A	solua/ml		0,175	0,007	0,011
10	P.g.:n	1,56 x 10 ⁷	kontrolli esim. 17	0,101	0,019	0,019
	serotyyppi A	solua/ml		0,114	0,003	0,003
	P.g.:n	1,95 x 10 ⁶	kontrolli esim. 17	0,020	0,003	0,003
	serotyyppi A	solua/ml		0,019	0,003	0,003
15	P.g.:n	1,25 x 10 ⁸	kontrolli esim. 17	0,185	0,101	0,101
	serotyyppi C	solua/ml		0,185	0,003	0,003
	P.g.:n	1,56 x 10 ⁷	kontrolli esim. 17	0,114	0,022	0,022
	serotyyppi C	solua/ml		0,160	0,003	0,003
	P.g.:n	1,95 x 10 ⁶	kontrolli esim. 17	0,025	0,003	0,003
	serotyyppi C	solua/ml		0,011	0,003	0,003
20	P.g.:n	1,25 x 10 ⁸	kontrolli esim. 17	0,175	0,057	0,057
	serotyyppi B	solua/ml		0,195	0,003	0,003
	P.g.:n	1,56 x 10 ⁷	kontrolli esim. 17	0,101	0,007	0,007
	serotyyppi B	solua/ml		0,114	0,003	0,003
25	P.g.:n	1,95 x 10 ⁶	kontrolli esim. 17	0,022	0,003	0,003
	serotyyppi B	solua/ml		0,024	0,003	0,003
	P.i.:n	1,25 x 10 ⁸	kontrolli esim. 17	0,022	0,195	0,022
	serotyyppi A	solua/ml		0,003	0,175	0,003
30	P.i.:n	1,56 x 10 ⁷	kontrolli esim. 17	0,003	0,145	0,003
	serotyyppi A	solua/ml		0,003	0,114	0,003
	P.i.:n	1,95 x 10 ⁶	kontrolli esim. 17	0,003	0,054	0,003
	serotyyppi A	solua/ml		0,003	0,024	0,003
	A.a.:n	6,25 x 10 ⁷	kontrolli esim. 17	0,003	0,003	0,175
	serotyyppi B	solua/ml		0,003	0,003	0,175
35	A.a.:n	3,91 x 10 ⁶	kontrolli esim. 17	0,003	0,003	0,089
	serotyyppi B	solua/ml		0,003	0,003	0,101
	A.a.:n	4,88 x 10 ⁵	kontrolli esim. 17	0,003	0,003	0,007
	serotyyppi B	solua/ml		0,003	0,003	0,011

Patenttivaatimukset:

1. Vesipohjainen pesukokoonpano, t u n n e t t u
5 siitä, että se on puskuroitu pH:hon, joka on alempi tai
yhtä suuri kuin 6 tai korkeampi tai yhtä suuri kuin 9 ja
sisältää:

ainakin 0,1 painoprosenttia anionista pinta-aktiivista ainetta, joka on kaavan:

10

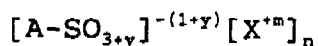


mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on
ainakin noin 180, X^m on vety tai monovalentti tai diva-
15 lentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai
2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2.

2. Käyttökelpoinen diagnostinen testikäyttöpakkaus
spesifisesti sitoutuvan ligandin määrittämiseksi, t u n-
n e t t u siitä, että se sisältää erillisissä pakkauksis-
20 sa:

(1) vesipohjaisen pesukokoonpanon, ja
(2) reseptorin spesifisesti sitoutuvalle kohdeligandille,
käyttöpakkaukselle ollessa ominaista, että pesukokoonpano
on puskuroitu pH:hon, joka on alempi tai yhtä suuri kuin
25 6 tai korkeampi tai yhtä suuri kuin 9, ja sisältää ainakin
0,1 painoprosenttia anionista pinta-aktiivista ainetta,
joka on kaavan:

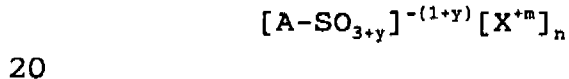
30



mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on
ainakin noin 180, X^m on vety tai monovalentti tai diva-
lentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai
2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen käyttöpakkaus, t u n n e t t u siitä, että reseptori on joko tunnistettavasti leimattu tai immobilisoitu partikkelimaiselle substraatille, suodatinkalvolle, selluloosasuodatinpaperille
5 tai polymeerilla tai resiinillä päällystetylle filmille.

4. Menetelmä periodontaalitautiin liittyvän mikro-organismin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheet, joissa:
A. muodostetaan veteen liukenematon kompleksiksi periodontaa-
10 litautiin liittyvästä mikro-organismista uutetun antigeenin ja antigeenille spesifisen vasta-aineen välille,
B. erotetaan kompleksoitumattomat materiaalit veteen liukenemattomasta kompleksista pesemällä vesipohjaisella pesukokoonpanolla, joka on puskuroitu pH:hon, joka on alempi
15 tai yhtä suuri kuin 6 tai korkeampi tai yhtä suuri kuin 9, pesukokoonpanon sisältäessä ainakin 0,1 painoprosenttia anionista pinta-aktiivista ainetta, joka on kaavan:



mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on ainakin noin 180, X^m on vety tai monovalentti tai divalentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai 2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2, ja
25 C. tunnistetaan veteen liukenematon kompleksiksi määrittä-
seksi mikro-organismista.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että antigeeni tehdään liukenematomaksi suoralla adsorptiolla tai kovalenttisella kiinnityksellä kiinteään substraattiin, ja että tunnistus suori-
30 tetaan käyttäen joko tunnistettavasti leimattua antigeenille spesifistä vasta-ainetta tai leimaamatonta antigeenille spesifistä ensimmäistä vasta-ainetta, jonka sitten annetaan kompleksoitua tunnistettavasti leimatun toisen

vasta-aineen kanssa, joka on spesifinen ensimmäiselle vasta-aineelle.

5 6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine on tunnistettavasti leimattu ja kompleksin tunnistus suoritetaan antamalla antigeenin reagoida toisen vasta-aineen kanssa, joka on joko immobilisoitu tai joka kykenee tulemaan immobilisoiduksi niin, että muodostetaan veteen liukenematon kerroskompleksi antigeenin ja molempien vasta-aineiden välille.

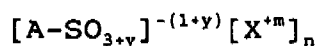
10 7. Menetelmä periodontaalitautiin liittyvän mikro-organismin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheet, joissa:

15 A. saatetaan vesipohjainen näyte, jonka epäillään sisältävän periodontaalitautiin liittyvästä mikro-organismista uutettua antigeenia, kosketukseen mikrohuokoisen suodatin-kalvon kanssa, jossa on erillisinä alueina kalvon pinnalla veteen liukenematonta reagenssia, joka sisältää veteen liukenemattomia partikkeleita, joihin on kiinnitetty antigeenille spesifisiä vasta-aineita,

20 muodostamaan erillisille alueille veteen liukene-maton kompleksi vasta-aineen ja antigeenin välille,

25 B. saatetaan veteen liukenematon kompleksi kosketukseen tunnistettavasti leimatun toisen vasta-aineen kanssa, joka on spesifinen antigeenille niin, että muodostetaan tunnistettavasti leimattu veteen liukenematon kerroskompleksi erilliselle alueelle,

30 C. vaiheen B kanssa yhtä aikaa tai sen jälkeen erotetaan kompleksoitumattomat materiaalit leimatusta veteen liukene-mattomasta kerroskompleksista pesemällä kompleksoitumat-tomat materiaalit kalvon läpi vesipohjaisella pesukokoon-panolla, joka on puskuroitu pH:hon, joka on alempi tai yhtä suuri kuin 6 tai korkeampi tai yhtä suuri kuin 9, pesukokoonpanon sisältäessä ainakin 0,1 painoprosenttia anionista pinta-aktiivista ainetta, joka on kaavan:



5 mukainen, jossa A on hiilivety, jonka molekyylipaino on ainakin noin 180, X^m on vety tai monovalentti tai divalentti kationi, m on 1 tai 2, y on 0 tai 1 ja n on 1 tai 2 edellyttäen, että m ja n eivät molemmat ole 2, kompleksoitumattomien materiaalien erottamiseksi leimatusta veteen liukenemattomasta kerroskompleksista, ja

10 D. tunnistetaan leimattu veteen liukenematon kerroskompleksi määritykseksi näytteessä olevasta mikro-organismita.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sillä määritetään mikä tahansa mikro-organismeista Actinobacillus actinomy-
15 temcomitans, Prevotella intermedius ja Porphyromonas gin-
givalis.

9. Jomman kumman patenttivaatimuksen 7 ja 8 mukainen menetelmä usean periodontaalitautiin liittyvän eri mikro-organismin samanaikaiseksi määrittämiseksi, tun-
20 nettu siitä, että kalvolla on useita erillisiä ja toisistaan riippumattomia alueita, jotka sisältävät erillisiä veteen liukenemattomia reagensseja kullekin määritettävälle mikro-organismita.

10. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen keksintö, tunnettu siitä, että pesukokoonpano on puskuroitu pH:hon, joka on noin 9,5 - noin 11.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 10 mukainen keksintö, tunnettu siitä, että pesukokoonpano sisältää 1 - 5 painoprosenttia pinta-aktiivista ainetta.

30 12. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen keksintö, tunnettu siitä, että pesukokoonpano sisältää immunogeenisesti reagoimatonta proteiinia.

13. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 12 mukainen keksintö, tunnettu siitä, että A on alkyyl-

tai alkyylillä substituoitu fenyyli, jonka molekyylipaino on 180 - 250.

14. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 13 mukainen keksintö, t u n n e t t u siitä, että A on alkyyli, jossa on 14 - 16 hiiliatomia, m j a y ovat molemmat 1 j a n on 2.

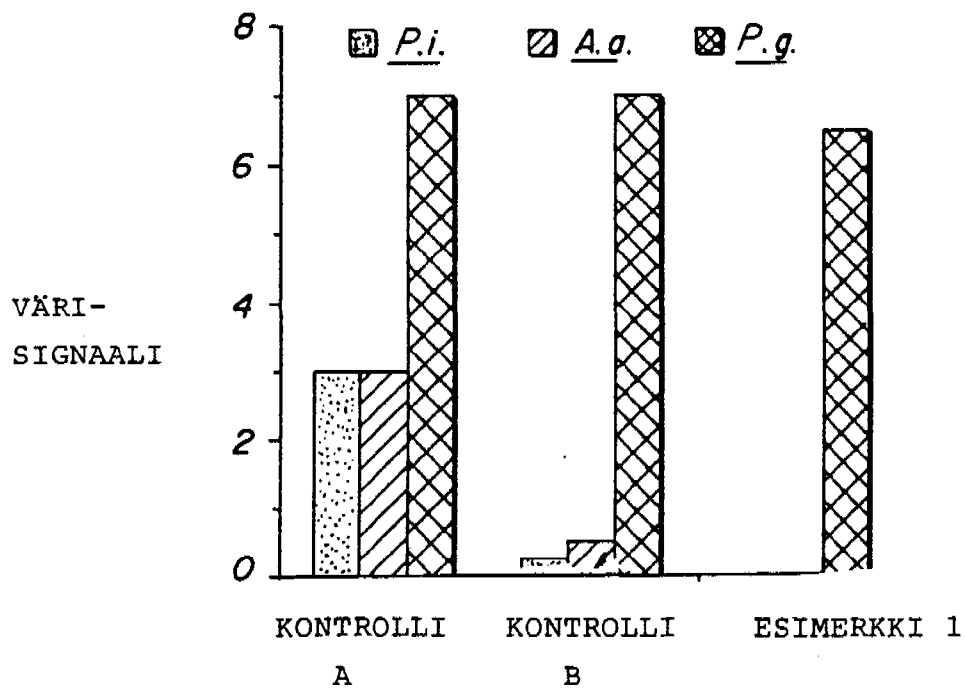


FIG. 1

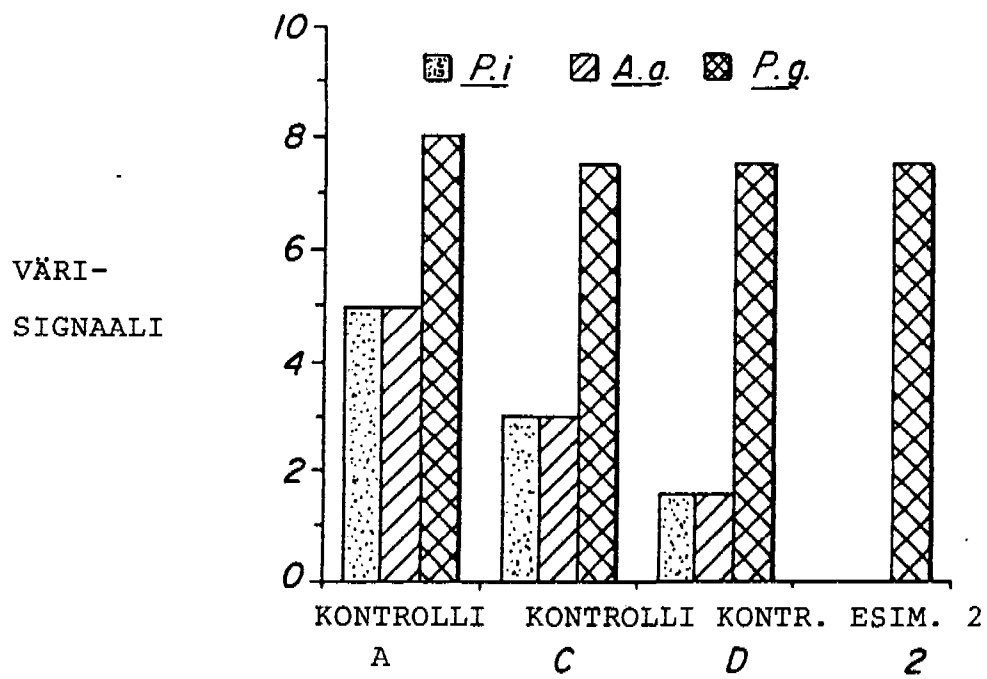


FIG. 2

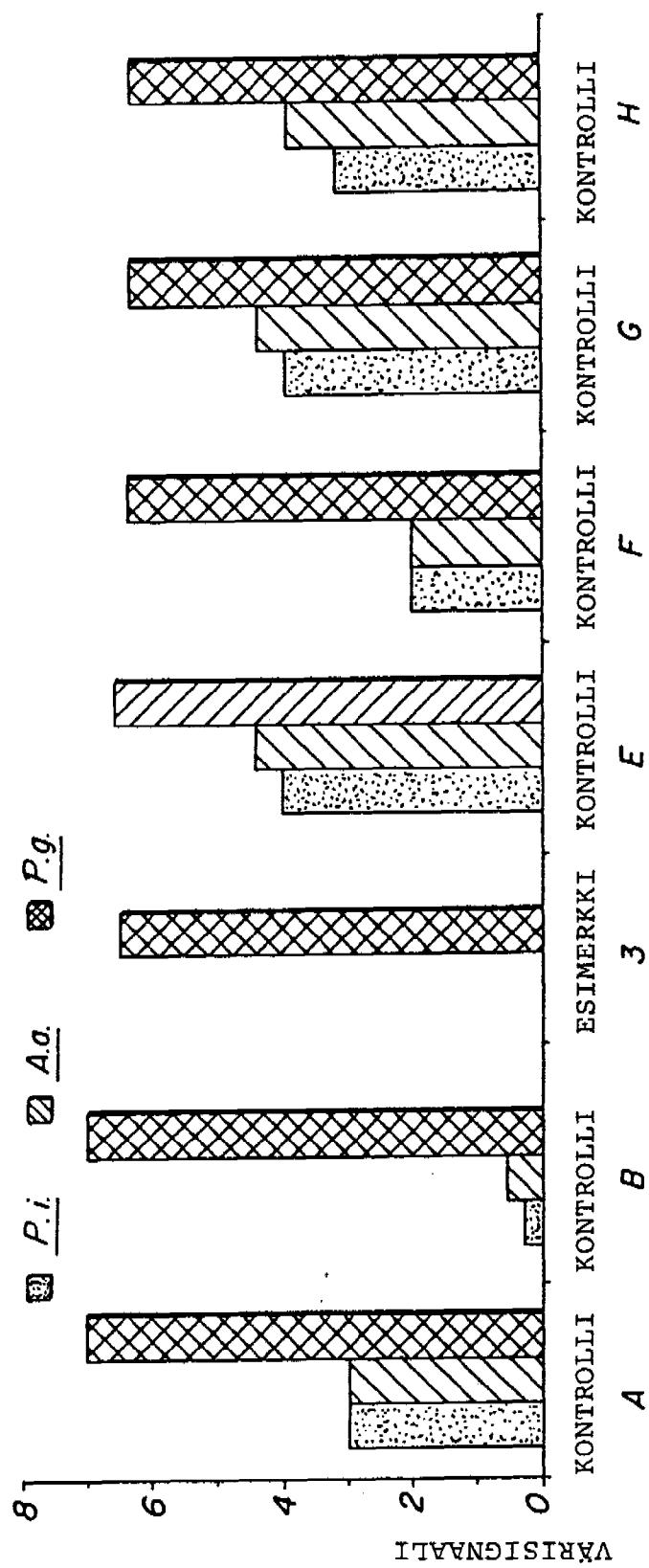


FIG. 3

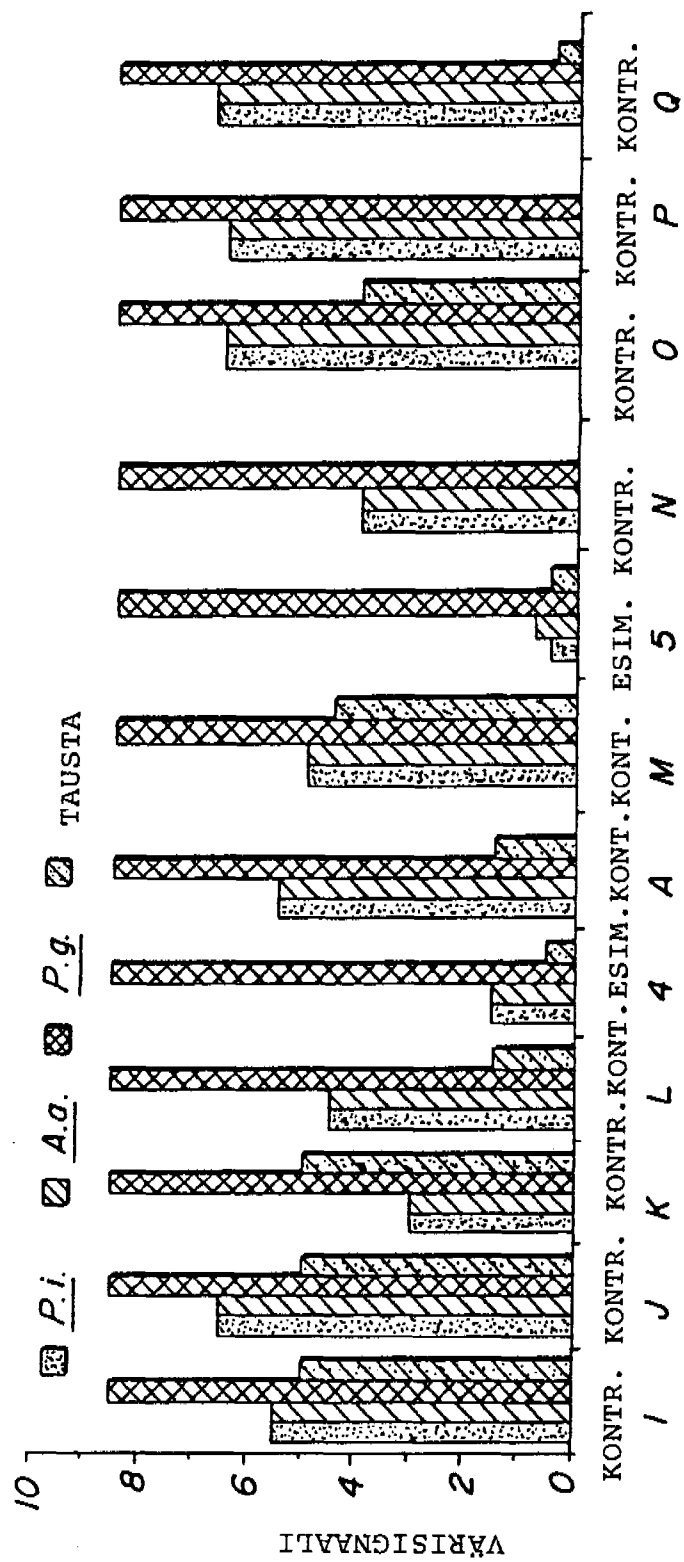


FIG. 4

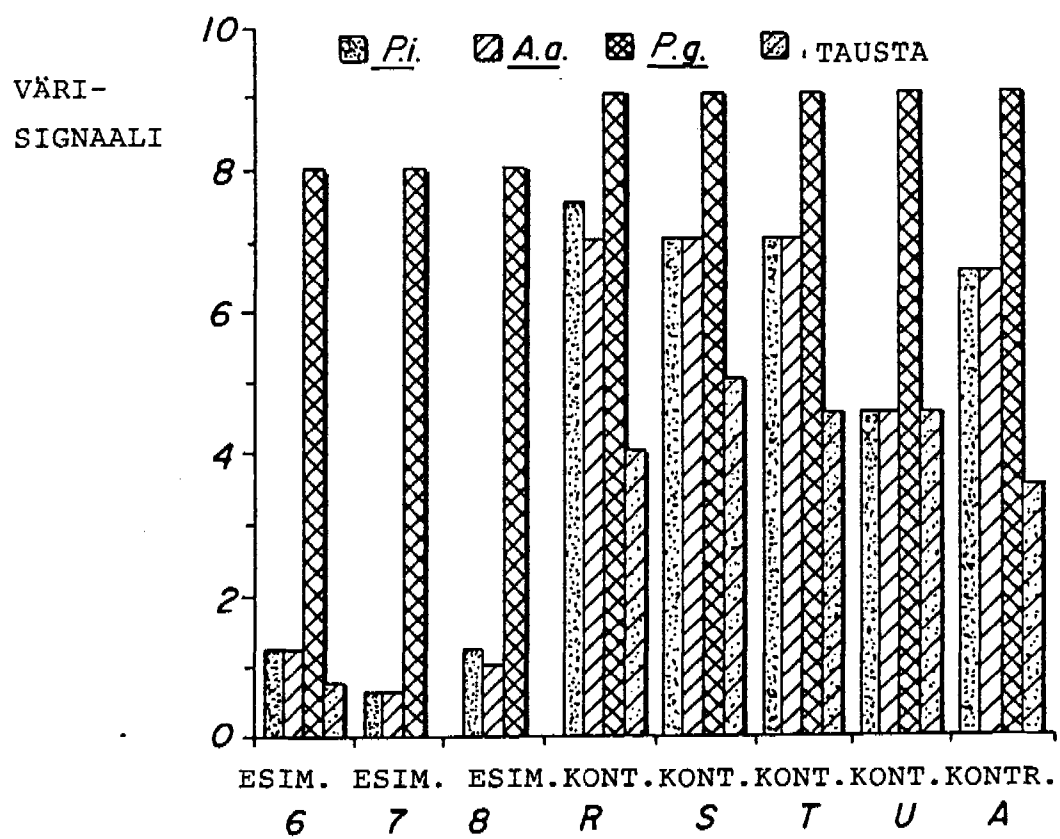


FIG. 5

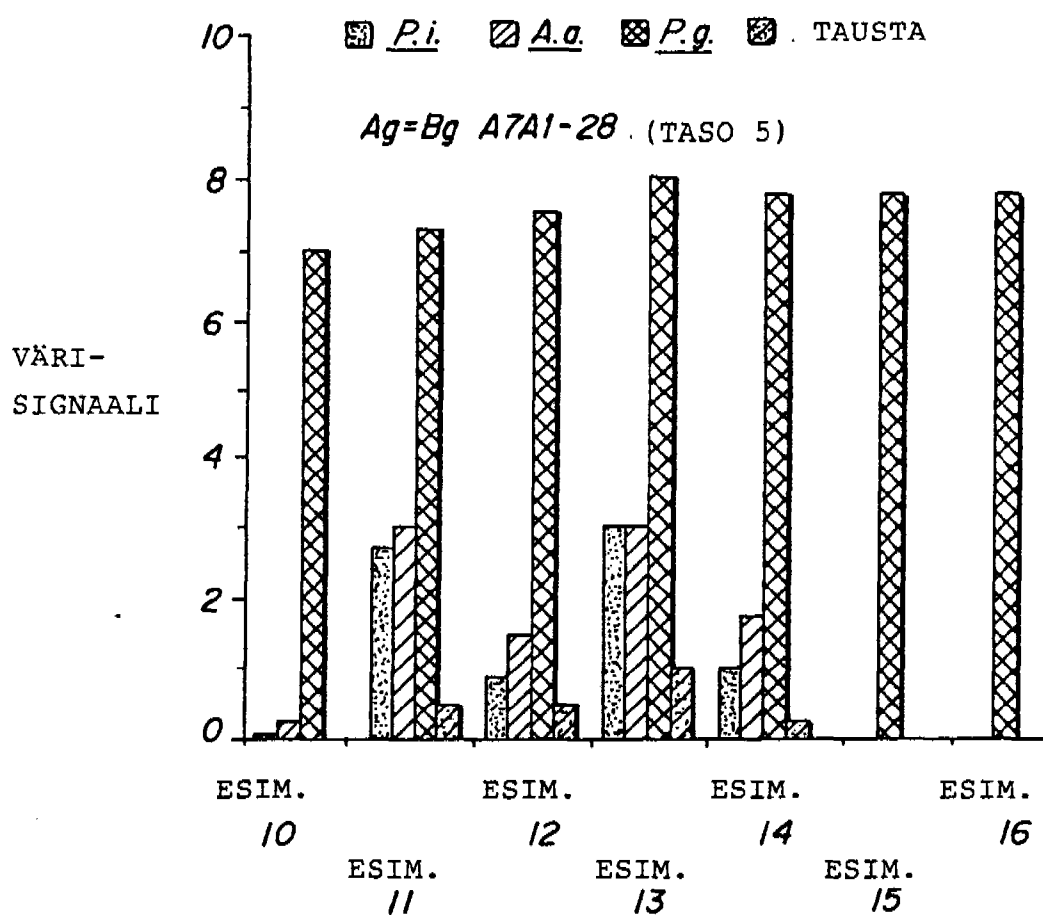


FIG. 6