



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **282 765 A5**

4(51) G 01 N 33/53

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP G 01 N / 315 457 3	(22)	11.07.88	(44)	19.09.90
(71)	siehe (73)				
(72)	Meisegeier, Bernhard, Dr. rer. nat.; Porstmann, Tomas, Prof. Dr. sc. med.; Kluge, Manfred, Obering.; Engelman, Angela, Dr. rer. nat., DD				
(73)	VEB Sächsisches Serumwerk Dresden, Herbert-Bochow-Straße 40, Dresden, 8012, DD				
(54)	Methode und Testkit für immunologische Nachweisreaktionen				

(55) Biochemie; Immunologie; Immunoassay; Enzymimmunoassay; Festphasenenzymimmunotechnik; Testkit; Antigen; Antikörper; Nachweis; Spezifität; Stabilisierung

(57) Die Erfindung betrifft eine Methode und einen Testkit für immunologische Nachweisreaktionen. Es wird ein Verfahren zur immunologischen antigenspezifischen Erfassung von Immunglobulin-Isotypklassen in humanen und animalen Körperflüssigkeiten mit verminderten unspezifischen Reaktionen und ein diesbezüglicher langzeitstabilisierter Testkit beschrieben. Die Verminderung der ungewollt unspezifischen Reaktionen wird durch Blockierung koimmobilisierter Rezeptoren und/oder durch kompetitive Reaktionen unspezifischer Faktoren und/oder durch Bindung unspezifischer Faktoren und/oder durch ionische Wechselwirkungen erreicht. Essentielle Testreagenzien, die mit einem immobilisierten Immunreaktanden in einer Immunkaskade mit abschließender Enzym-Substrat Wechselwirkung reagieren, werden unter Zusatz von stickstoffhaltigen organischen BRÖNSTEDT-Verbindungen und gegebenenfalls von Polyhydroxyverbindungen stabilisiert.

Patentansprüche:

1. Methode für immunologische Nachweisreaktionen zur Bestimmung von Immunglobulin-Isotypklassen IgX, wobei X für G, M, A, D, E steht, in humanen und tierischen Körperflüssigkeiten, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Blockierung koimmobilisierter Rezeptoren und/oder durch Konkurrenz- oder Verdrängungsreaktionen unspezifischer Faktoren und/oder durch Bindung unspezifischer Faktoren und/oder durch ionische Wechselwirkungen ungewollt unspezifische Reaktionen unterdrückt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen folgende Stufen umfaßt:
 - a) Mischen einer Probe, in der der klassenspezifische Antikörper des Typs IgX, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, nachzuweisen ist, mit einem Antigen Y vom Typ des unvermeidbar koimmobilisierten Antigens Y' und nachfolgende oder gleichzeitige Umsetzung mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
 - b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung des unlöslichen Antigen-IgX-Komplexes mit enzymmarkiertem Antikörper bzw. mit einem enzymmarkierten Antikörper-Fragment, gegen IgX oder Fragment des IgX gerichtet, auf an und für sich bekannte Art und Weise;
 - c) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise durch geeignete Auswertung.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen folgende Stufen umfaßt:
 - a) Umsetzung der Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit einem festphasenfixierten Antigen Z auf bekannte Art und Weise;
 - b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Einwirkung einer Mischung aus enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder gegen ein Fragment des IgX gerichtet und einem Rezeptor Y, der gegen im Test unspezifisch reagierende Bindungsproteine gerichtet ist;
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen folgende Stufen umfaßt:
 - a) Mischen einer Probe, in der der klassenspezifische Antikörper des Typs IgX, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, nachzuweisen ist, mit einem Rezeptorprotein Y vom Typ des unvermeidbar koimmobilisierten Rezeptors Y' und nachfolgende oder gleichzeitige Umsetzung mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
 - b) Entfernung nicht immobilisierter Bestandteile und Einwirkung einer Mischung aus enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder gegen ein Fragment des IgX gerichtet und dem Rezeptor Y auf den unlöslichen Z-IgX-Komplex;
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteils auf bekannte Art und Weise.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen folgende Stufen umfaßt:
 - a) Kontakt einer Probe, die den nachzuweisenden Antikörper IgX enthält, mit immobilisierten Rezeptoren Y, die Bindung mit im Test unspezifisch reagierenden Faktoren eingehen;
 - b) Gewinnung der nicht gebundenen Bestandteile und Einwirkung auf ein festphasenfixiertes Antigen Z auf bekannte Art und Weise zwecks Bildung eines Z-IgX-Komplexes;
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile, Einwirkung enzymmarkierter Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder gegen Fragmente von IgX spezifisch, und Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
 - a) Mischen einer Probe, in der Antikörper IgX nachzuweisen ist, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, mit einem Antikörper anti-Y, der gegen im Test unvermeidbar unspezifisch reagierende

- Rezeptoren Y gerichtet ist bzw. von gleicher Spezifität wie im Test unspezifisch reagierende Antikörper ist, und gleichzeitige oder nachfolgende Reaktionen mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
- b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung mit enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder ein Fragment des IgX gerichtet, auf bekannte Art und Weise;
 - c) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
- a) wirksame Einwirkung eines Anti-Y-Serums auf ein festphasenfixiertes Antigen Z, das spezifisch zu dem in der Probe nachzuweisenden Antikörper IgX ist und unvermeidbar koimmobilisierte Rezeptoren Y enthält;
 - b) Einwirkung der Probe mit dem nachzuweisenden Antikörper IgX und Bildung eines Z-IgX-Komplexes nach bekanntem Mechanismus;
 - c) Entfernung ungebundener Bestandteile und Umsetzung mit enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gerichtet gegen IgX oder ein Fragment des IgX.
 - d) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise;
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
- a) Umsetzung einer Mischung aus einer Probe mit dem nachzuweisenden Antikörper IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist und einem Rezeptor Y mit einem festphasenfixierten anti-Z-Z-Komplex zur Bildung des immobilisierten anti-Z-Z-IgX-Komplex;
 - b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung mit enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder ein Fragment des IgX gerichtet;
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.
9. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
- a) Inkubation einer Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit einem festphasenfixierten Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder ein Fragment des IgX gerichtet, nach bekanntem Mechanismus;
 - b) Entfernung nicht immobilisierter Bestandteile;
 - c) Umsetzung einer Mischung des korrespondierenden, spezifisch mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper IgX reagierenden Antigens Z und einem Antikörper anti-Y, der mit unspezifischen Faktoren reagiert;
 - d) gleichzeitige oder nachfolgende Umsetzung mit einem enzymmarkierten Antikörper oder Antikörperfragment, gegen Z gerichtet, und Entfernung nicht gebundener Bestandteile;
 - e) Ermittlung des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.
10. Verfahren nach Anspruch 1–9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
- a) Inkubation einer Probe mit dem nachzuweisenden Antikörper IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit dem immobilisierten Antigen Z oder mit einem immobilisierten anti-Z-Z-Komplex in Gegenwart von Elektrolyten der Gesamtionenstärken 0,16 bis 12 mol/l;
 - b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung mit dem enzymmarkierten Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder IgX-Fragment gerichtet, in Gegenwart von Elektrolyten in Gesamtionenstärken von 0,16 bis 12 mol/l;
 - c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Feststellung des Ausmaßes der Enzymbindung auf bekannte Art und Weise.
11. Verfahren nach Anspruch 1–9, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen die Stufen umfaßt:
- a) Inkubation einer Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit einem immobilisierten Antikörper oder Antikörperfragment, gegen IgX oder ein Fragment des IgX gerichtet, in Gegenwart von Elektrolyten in Gesamtionenstärken von 0,16 bis 12 mol/l;
 - b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Umsetzung mit dem spezifisch mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX reagierenden Antigens Z in

- Gegenwart von Elektrolyten in Gesamtionenstärken von 0,16 bis 12 mol/l und gleichzeitige oder nachfolgende Umsetzung mit enzymmarkiertem Antikörper oder Antikörperfragment, gegen Z gerichtet, in Gegenwart von Elektrolyten in Gesamtionenstärken von 0,16 bis 12 mol/l;
- c) Ermittlung des Maßes der Enzymbindung auf bekannte Art und Weise.
12. Testpackung zur Bestimmung von Immunglobulin-Isotypklassen IgX, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Bestandteile enthält, die durch Blockierung koimmobilisierter Rezeptoren und/oder durch Konkurrenz- oder Verdrängungsreaktion unspezifischer Faktoren und/oder durch Bindung unspezifischer Faktoren und/oder durch ionische Wechselwirkungen ungewollt unspezifische Reaktionen unterdrücken.
 13. Testpackung nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich die markierten Antikörper bzw. Antikörperfragmente in einem Medium aus monomeren (0,01 bis 2 mol/l) oder peptidartig-verknüpften Homo- oder Heteroamino-säuren (1 bis 20 mmol/l) oder abgebauten Proteinen (1 bis 5 mmol/l) sowie von stickstoffhaltigen BRÖNSTEDT-Verbindungen und Polyhydroxyverbindungen befinden.
 14. Testpackung nach Anspruch 12 und 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die BRÖNSTEDT-Verbindung aus der Gruppe von Verbindungen mit der allgemeinen Zusammensetzung $R-N(R_1, R_2, R_3)^+X^-$ ausgewählt ist, wobei R den Rest H oder eine Alkankette der allgemeinen Zusammensetzung $(CH_2)_n-H$ repräsentiert und R_1, R_2, R_3 einem Rest der allgemeinen Zusammensetzung $(CH_2)_n-OH$ entspricht und n den Wert von 1 bis 8 annehmen kann und X einen organischen oder anorganischen Säurerest darstellt.
 15. Testpackung nach Anspruch 12 und 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß der markierte Antikörper ein enzymmarkierter Antikörper ist.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Das Verfahren findet Anwendung zum antigenspezifischen Nachweis oder zur Bestimmung des quantitativen Gehaltes von Antikörpern in humanen und animalen Körperflüssigkeiten oder anderen Testflüssigkeiten mittels immunologischer Methoden, die auf In-vitro-Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen und zur Herstellung von Testsätzen für Immunoassays, vorzugsweise für Enzymimmunoassays, die vorrangig in der Human- und Veterinärmedizin, Pharmazie, Landwirtschaft, Mikrobiologie, in den Biowissenschaften angewendet werden, dienen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Ermittlung der Anwesenheit oder zur Bestimmung des quantitativen Gehaltes von Antikörpern, also von Proteinen, die unter Einwirkung von Antigenen entstanden sind und mit diesen Antigenen spezifisch reagieren, verwendet man immunologische Methoden, die auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen, vorzugsweise Enzymimmuno-Techniken, die sich durch hohe Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit auszeichnen.

Für solche Immunreaktionen werden spezifisch reagierende Antigene und Antikörper, ein Indikatorsystem, spezielle Medien für die Reaktion der Reaktionspartner und in der Regel Kontrollmaterialien benötigt. Die der Immunreaktion folgende Indikatorreaktion wie Farb-, Fluoreszenz-, Chemilumineszenzreaktion dient der Erfassung des Maßes der spezifischen Bindungsreaktion. Aufgrund der leichten Abtrennbarkeit der Reaktionsprodukte werden für die Bindungsreaktionen Festphasentechniken bevorzugt eingesetzt.

(E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* 8, 871 [1971]; B.K. van Weemen, A. H. W. M. Schuurs, *FEBS Letters* 15, 232 [1971]; E. Ishikawa, T. Kawai, K. Miyai, *Enzymimmunoassay*; Igaku-Shoin, Tokyo, New York 1981)

US-Patent 4020 151 beschreibt die Bestimmung antigenspezifischer Immunglobuline mittels Festphasenimmunoassay.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch eine Reihe von unspezifisch reagierenden Faktoren gestört, somit werden falsche Ergebnisse erzielt.

(A. H. W. M. Schuurs, B.K. van Weemen, *Clinica Chimica Acta* 81, 1 [1977];

O. Meurman, in: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 104, New Developments in Virology; Ed. P. A. Bachmann, Berlin, Heidelberg, New York 1983, S. 101)

Solche unspezifischen Bindungen und falschpositive Ergebnisse können durch Rheumafaktoren, die mit aggregiertem IgG reagieren, durch antinukleäre Antikörper, die gegen Kernmaterial verschiedener Antigene gerichtet sind, durch anti-zelluläre Antikörper, die mit Zellbestandteilen, die in Antigenpräparationen enthalten sind, Reaktionen eingehen können und durch andere Protein-Rezeptor-Reaktionen hervorgerufen werden.

Viele virale Antigene enthalten Fc-Rezeptoren, die unspezifische Bindungen verursachen können. Die Reduzierung oder Eliminierung von unspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen ist deshalb für die Treffsicherheit der Bestimmungen von großem Wert.

Zur Verringerung unspezifischer Bindungen an den festen Träger werden den Verdünnungsflüssigkeiten und Inkubationsmedien verschiedene isolierte Proteine oder Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen (S. Avrameas, in: *New Developments in Diagnostic Virology*, Ed. P. A. Bachmann, Berlin, Heidelberg, New York 1983, S. 93; *J. Clin. Microbiol.* 13, 738 [1981]; *Methods in Enzymology*, 70, 419 [1980] DD-PS 132593) fetales Kälberserum oder nach DD 224952 anderes komplettes Blutserum zugesetzt.

Diese angeführten Zusätze während der Inkubationsvorgänge reichen nicht immer aus (Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 36 [1981]), die unspezifischen Bindungen von Immunglobulinen in genügender Maße ohne Beeinträchtigung der spezifischen Immunreaktionen zu unterdrücken. Zum anderen verursachen zu hohe Proteinkonzentrationen Desorptionserscheinungen während der Inkubation der Immunreaktanten. Die Einwirkung kompletten Serums auf den zu lagernden, mit Antikörpern oder Antigenen beschichteten Träger kann während der Lagerung durch die enthaltenen Enzyme proteolytische Abbauvorgänge des immunologisch aktiven festphasengebundenen Immunreaktanten und damit Aktivitätsverluste hervorrufen.

In den Patenten US 346662, GB 2 114 289 wird ein Immunoassay für klassenspezifische Immunglobulin-Antikörper mit vermindertem Einfluß des Rheumafaktors beschrieben. Duermeyer u. a. (Journal of Medical Virology 4, 25 [1979]) verwendet zur Unterdrückung des Einflusses des Rheumafaktors das markierte F(ab)₂-Fragment des Indikatorantikörpers (EP 0008473; US 4 292 403), das sich nur in geringen Ausbeuten präparieren läßt. Der Einfluß des Rheumafaktors wird in einigen Fällen auch unterbunden, wenn in bestimmten Tests ein markiertes Virusantigen als Detektionspartner verwendet wird (DP 2930 706, US 4 273 756, US 4 347 311). Hierfür sind aufwendige Anreicherungsverfahren erforderlich.

Einige Autoren empfehlen, die im Test verwendeten Antigene und Antikörper in sehr hoher Reinheit einzusetzen, um die Rate unspezifischer Reaktionen zu erniedrigen, dies ist allerdings mit einem sehr hohen Arbeitsaufwand unter Einsatz mehrstufiger Reinigungsprozesse mittels spezieller Technik und in der Regel mit beträchtlichen Ausbeuteverlusten verbunden (V. Knez, J. A. Stewart, D. W. Ziegler, J. Immunol. 117, 2006 [1976]; K. O. M. Kalimo, R. J. Marttila, K. Grantors, M. K. Viljanen, Intect. Immun. 15, 883 [1978]; A. M. Arxin, C. M. Koropchak, J. Clin Microbiol. 12, 367 [1980]).

Die Herstellung kompletter Testpackungen, die die notwendigen, unter standardisierten industriellen Bedingungen hergestellten, spezifisch reagierenden Testbestandteile enthalten, ist für den Anwender der Immunotechniken von besonderem Vorteil, vorausgesetzt, die empfindlichen biologischen, immunologisch aktiven Materialien reagieren mit geringer Störanfälligkeit und behalten über lange Zeit ihre immunologische Aktivität und sind somit lager- und versandfähig.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat sich das Ziel gestellt, unspezifische Reaktionen im Enzymimmunoassay zur Erfassung von Immunglobulin-Isotypklassen zu reduzieren oder zu eliminieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung von Immunglobulinklassen anzugeben und einen lagerfähigen, langzeitstabilisierten Testkit mit spezifisch reagierenden Testbestandteilen zur Erfassung von immunologisch aktiven Verbindungen, insbesondere zum Nachweis und zur Bestimmung von Isotypimmunglobulinklassen und ggf. von Antigenen bereit zu stellen.

Die spezifische Unspezifitäten-verminderte Feststellung der Immunglobulin-Isotypie erfolgt erfindungsgemäß durch:

1.

- a) Mischen einer Probe, in der der klassenspezifische Antikörper des Typs IgX, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, nachzuweisen ist, mit einem Antigen Y vom Typ des unvermeidbar koimmobilisierten Antigens Y', das Protein-Rezeptor-Bindungen mit im Test unspezifisch reagierenden Antikörper anti-Y eingeht und nachfolgende oder gleichzeitige Umsetzung mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
- b) Entfernung nicht immobilisierter Bestandteile und Umsetzung des unlöslichen Antigen-IgX-Komplexes mit enzymmarkiertem anti-IgX auf an und für sich bekannte Art und Weise;
- c) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Weise durch visuelle, photometrische oder fluorophotometrische Auswertung;

oder 2.

- a) Umsetzung der Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit einem festphasenfixierten Antigen Z auf bekannte Art und Weise;
- b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Einwirkung einer Mischung aus enzymmarkiertem anti-IgX und einem Antigen Y, das gegen korrespondierende, im Test unspezifisch reagierende immunologisch aktive Proteine gerichtet ist;
- c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteils auf bekannte Art und Weise durch geeignete Auswertung;

oder 3.

- a) Mischen einer Probe, in der der klassenspezifische Antikörper des Typs IgX, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, nachzuweisen ist, mit einem Antigen Y vom Typ des unvermeidbar koimmobilisierten Antigens Y', das Protein-Rezeptor-Bindungen mit im Test unspezifisch reagierenden Antikörpern anti-Y eingeht und nachfolgende oder gleichzeitige Umsetzung mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
- b) Entfernung nicht immobilisierter Bestandteile und Einwirkung einer Mischung aus enzymmarkiertem anti-IgX und dem Antigen Y auf den unlöslichen Antigen-IgX-Komplex;
- c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteils auf bekannte Art und Weise durch geeignete Auswertung;

oder 4.

- a) Kontakt einer Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit immobilisierten Rezeptoren Y, die Immunbindungen mit im Test unspezifisch reagierenden Faktoren anti-Y eingehen;
- b) Gewinnung der nicht gebundenen Bestandteile und Einwirkung auf ein festphasenfixiertes Antigen Z auf bekannte Art und Weise zwecks Bildung eines Antigen-IgX-Komplexes;
- c) Entfernung nicht gebundener Bestandteile, Einwirkung und Manifestation des gebundenen Enzymanteils auf an und für sich bekannte Art und Weise;

oder 5.

- a) Mischen einer Probe, in der der Antikörper des Typs IgX nachzuweisen ist, der gegen ein Antigen Z spezifisch ist, mit einem Antikörper anti-Y, wobei anti-Y den Antikörper gegen im Test unvermeidbar unspezifisch reagierendes Antigen Y darstellt, bzw. von gleicher Spezifität wie im Test unspezifisch reagierende Antikörper ist, und gleichzeitige oder nachfolgende Reaktionen mit einem festphasenfixierten spezifisch reagierenden korrespondierenden Antigen Z;
- b) Entfernung nicht an die feste Phase gebundener Bestandteile und Herstellung eines immobilisierten (Antigen-Z)-(IgX)-Komplexes mit nachfolgender Umsetzung mit markiertem anti-IgX;
- c) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise;

oder 6.

- a) wirksame Einwirkung eines Anti-Y-Serums auf ein festphasenfixiertes Antigen Z, das spezifisch zu dem in der Probe nachzuweisenden Antikörper IgX ist und unvermeidbar koimmobilisierte Rezeptoren enthält;
- b) Einwirkung der Probe mit dem nachzuweisenden Antikörper IgX und Bildung eines Z-IgX-Komplexes nach bekanntem Mechanismus;
- c) Entfernung ungebundener Bestandteile;
- d) Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise;

oder 7.

- a) Umsetzung einer Mischung aus einer Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist und einem Rezeptor Y, der Rezeptor-Protein-Bindungen mit im Test unspezifisch reagierenden Antikörper anti-Y eingeht, mit einem festphasenfixierten (anti-Z)-(Antigen-Z)-Komplex zur Bildung des immobilisierten anti-Z-Z-IgX-Komplexes und Blockierung unspezifischer Faktoren unter Nutzung bekannter zwischenmolekularer Bindungskräfte;
- b) Entfernung nicht gebundener Bestandteile und Manifestation des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Weise;

oder 8.

- a) Inkubation einer Probe mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX, der spezifisch zu einem Antigen Z ist, mit einem festphasenfixierten Antikörper anti-IgX zwecks Bildung des unlöslichen Immunkomplexes anti-IgX-IgX auf bekannte Art und Weise;
- b) Entfernung nicht immobilisierter Bestandteile;
- c) Umsetzung einer Mischung des korrespondierenden, spezifisch mit dem nachzuweisenden klassenspezifischen Antikörper des Typs IgX reagierenden Antigens Z und einem Antikörper anti-Y, der mit unspezifischen Faktoren reagiert;
- d) gleichzeitige oder nachfolgende Umsetzung mit einem enzymmarkierten Antikörper anti-Z und
- e) Ermittlung des gebundenen Enzymanteiles auf bekannte Art und Weise.

Die Rate unspezifischer Reaktionen läßt sich weiterhin durch Verminderung der zwischenmolekularen Bindungskräfte zwischen unspezifisch reagierendem Bindungsprotein und dem zugehörigen Rezeptor erniedrigen. Dies gelingt durch Zusätze von Elektrolyten in Gesamtionenstärken von 0,16 bis 12 mol/l, vorzugsweise von 0,3 bis 2, während der Bindungsprozesse der löslichen Immunreaktanten an die immobilisierten Reaktionspartner.

Die Testpackung enthält Bestandteile, die a) durch Blockierung koimmobilisierten Antigens oder b) durch Konkurrenz- oder Verdrängungsreaktion unspezifisch reagierender Faktoren und/oder c) durch ionische Wechselwirkungen die ungewollt unspezifische Reaktionen unterdrücken.

Die in der Testpackung enthaltenden immunologisch reaktiven Substanzen, insbesondere die enzymmarkierten Antikörper befinden sich zwecks Langzeitstabilisierung in einem Medium aus monomeren (0,01 bis 2 mol/l) oder peptidartig-verknüpften Aminocarbonsäuren (1 bis 20 mmol/l) oder peptidartig-verknüpften Homo- oder Heteroamino-säuren (1 bis 20 mmol/l) oder abgebauten Proteinen (1 bis 5 mmol/l) oder Proteinen (0,01 bis 0,5 mmol/l) unter Zusatz von stickstoffhaltigen BRÖNSTEDT-Verbindungen mit Säure-Base-Eigenschaften, ausgewählt aus der Gruppe von Verbindungen mit der allgemeinen Zusammensetzung $R-N(R_1, R_2, R_3)^+X^-$, wobei R den Rest H oder eine Alkankette der allgemeinen Zusammensetzung $(CH_2)_n-H$ repräsentiert; R_1, R_2, R_3 einen Rest der allgemeinen Zusammensetzung $(CH_2)_n-OH$ entspricht, wobei n den Wert von 1 bis 8, vorzugsweise 1 bis 3 annehmen kann, und X einen organischen oder anorganischen Säurerest darstellt und außerdem ggf. Polyhydroxyverbindungen, vorzugsweise Polyhydroxyverbindungen in monomolekularen (0,06 bis 1,2 mol/l) oder acetalartig verknüpften Zustand (0,1 bis 20 Gew.-%) enthält.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

- a) Eine Polystyren-Mikrotitrationsplatte wird mit 0,1 ml je Vertiefung einer phosphatgepufferten Natriumchlorid-Lösung (pH 7,4; 0,1 mol/l), die Röteln-Virus-Antigen enthält, das mittels Ultrazentrifugation gereinigt wurde und einen Hämagglutinationstiter (Tauben-Erythrozyten) von 1:8 aufweist, 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach Waschen der Platte in bekannter Art und Weise werden 0,1 ml einer Mischung eines mit Phosphat-Natriumchlorid-Puffer im Verhältnis 1:200 verdünnten Serums vom Menschen, das Antikörper gegen Röteln-Virus enthält und eines Serums mit Antikörpern gegen Bestandteile des Zellkerns wie Nucleoprotein, Histone und gegen Zellwandbestandteile, das in bekannter Weise durch Tierimmunisierung gewonnen wurde, in jede Vertiefung eingefüllt. Die Platte wird 2 h bei 37°C aufbewahrt. Nach Waschen werden 0,1 ml eines anti-human- F_c -Phosphatase-Konjugates in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wird 2 h bei 37°C aufbewahrt.

Man wäscht, wie üblich, dreimal mit phosphatgepufferter Natriumchlorid-Tween-Lösung und läßt in jeder Vertiefung 0,1 ml einer Lösung von 4-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Diethanolamin (1 mol/l, pH 9,8) 30 min bei $20^\circ C \pm 3 K$ einwirken. Mittels Vertikalphotometrie wird bei 405 nm die spezifische Extinktion ermittelt, die im Mittelwert 1,09 beträgt.

- b) Zum Vergleich wird entsprechend den unter 1 a) aufgeführten Bedingungen eine Mikrotitrationsplatte mit virusfreiem Kontrollantigen über 16 h bei 2 bis 8°C beschichtet.
Nach dem Waschen wird die eine Hälfte der Platte (Teil A) mit 0,1 ml je Vertiefung des im Verhältnis 1:200 mit Phosphat-Natriumchlorid-Puffer verdünnten Serums vom Menschen und die andere Hälfte der Platte (Teil B) mit 0,1 ml je Vertiefung des analog verdünnten Serums vom Menschen, dem die tierischen Antikörper gegen Zellwand- und Zellkernbestandteile in wirksamer Konzentration zugemischt wurden, 2 h bei 37°C inkubiert.
In analoger Weise zu 1 a) wird mit Konjugat und p-Nitrophenylphosphat-Lösung umgesetzt.
Der Vergleich der Extinktionen der Vertikalphotometrie zeigt die Wirksamkeit der Verfahrensweise zur Eliminierung unspezifischer Reaktionen:
Teil A (ohne Antikörper gegen zelluläre und nukleäre Bestandteile) 0,59
Teil B (mit Antikörpern gegen zelluläre und nukleäre Bestandteile) 0,07

Beispiel 2

- a) Die Vertiefungen einer nach Beispiel 1 a) mit Röteln-Antigen beschichteten und anschließend gewaschenen Mikrotitrationsplatte werden mit je 0,1 ml einer Mischung eines mit Phosphat-Natriumchlorid-Puffer im Verhältnis 1:200 verdünnten Serums vom Menschen, das Antikörper gegen Röteln-Virus enthält und partiell gereinigter zellulärer und nukleärer Bindungsproteinkomponenten, beschickt und 2 h bei 37°C aufbewahrt. Man saugt ab, wäscht und pipettiert in jede Vertiefung 0,1 ml Konjugat, wie unter 1 a) beschrieben, führt die Inkubation mit 4-Nitrophenylphosphat-Lösung (analog 1 a) aus und ermittelt durch Vertikalphotometrie die Extinktion bei 405 nm.
Der Mittelwert der Extinktion beträgt 1,18.
b) Zum Vergleich werden die Vertiefungen der einen Hälfte einer entsprechend 1 a) mit virusfreiem Kontrollantigen beschichteten Mikrotitrationsplatte mit im Verhältnis 1:200 mit Phosphat-Natriumchlorid-Puffer verdünntem Serum vom Menschen (0,1 ml je Vertiefung), das Antikörper gegen Röteln-Virus enthält, und die Vertiefungen der anderen Hälfte mit je 0,1 ml einer Mischung eines mit Phosphat-Natrium-Puffer im Verhältnis 1:200 verdünnten Serums von Menschen, das Antikörper gegen Röteln-Virus enthält und partiell gereinigter zellulärer und nukleärer Bindungsproteinkomponenten beschickt, nach Aufbewahrung über 2 h bei 37°C wird abgesaugt und gewaschen. Nach analoger Inkubation des Konjugates und anschließend der 4-Nitrophenylphosphat-Lösung, wie unter 1 a) beschrieben, wird durch Vertikalphotometrie die Extinktion bei 405 nm ermittelt.
Teil A der Platte (ohne zellulären, nukleären Bindungsprotein) 0,65
Teil B der Platte (mit zellulärem, nukleärem, nukleärem Bindungsprotein) 0,12

Beispiel 3

- a) Die Vertiefungen von Polystyren-Mikrotitrationsplatten werden mit je 0,1 ml einer Lösung von antihuman-IgM in Carbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,6) 16 h bei 2 bis 8°C inkubiert. Nach Waschen der Platte in bekannter Weise werden 0,1 ml eines Serums vom Menschen, das IgM-Antikörper gegen Röteln-Virus enthält und mit phosphatgepufferter Natriumchlorid- (0,3 mol/l, pH 7,2)-Tween- (0,5 g/l)-Lösung, die Serum vom Kaninchen (100 g/l) enthält, im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde, zu jeder Vertiefung pipettiert und 12 h bei 20 bis 25°C inkubiert.
Nach Waschen der Platte werden 0,1 ml einer Lösung, die Röteln-Virus-Antigen (gereinigt mittels Ultrazentrifugation, Hämagglutinationstiter gegen Taubenerythrozyten 1:8 in der einsatzfähigen Lösung), partiell gereinigte zelluläre und nukleäre Bindungsproteinkomponenten, anti-Röteln-Phosphatase-Konjugat (Endverdünnung 1:300; durch Konjugation in bekannter Weise aus alkalischer Phosphatase und anti-Röteln-Immunglobulin vom Kaninchen gewonnen) in Phosphat-Natriumchlorid (0,3 mol/l)-Tween (0,5 g/l)-Kaninchen-Protein (20 g/l)-Lösung enthält, in die Vertiefungen pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert.
Nach Waschen mit Phosphat-Natriumchlorid-Tween-Lösung läßt man in jeder Vertiefung 0,1 ml einer Lösung von 4-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Diethanolamin (1 mol/l, pH 9,8) 45 min bei 20°C ± 3 K einwirken. Mittels Vertikalphotometrie wird bei 405 nm die Extinktion ermittelt, die im Mittelwert 0,805 beträgt.
b) Zum Vergleich werden die Vertiefungen der einen Hälfte (Teil A) einer nach 3 a) mit anti-human-IgM beschichteten und mit Serum vom Menschen, das IgM-Antikörper gegen Röteln-Virus enthält, inkubierten und gewaschenen Platte mit 0,1 ml einer Lösung beschickt, die Kontrollantigen und anti-Röteln-Phosphatase in Phosphat-Natriumchlorid-Tween-Kaninchenprotein-Lösung, enthält.
Teil B der Platte wird je Vertiefung mit 0,1 ml einer Lösung beschickt, die Kontrollantigen, partiell gereinigtes zelluläres und nukleäres Bindungsprotein und anti-Röteln-Phosphate-Konjugat in Phosphat-Natriumchlorid-Tween-Kaninchenprotein-Lösung enthält.
Wie unter 3 a) beschrieben, wird nach Einwirkung der 4-Nitrophenylphosphat-Lösung durch Vertikalphotometrie die Extinktion bei 405 nm ermittelt.
Teil A der Platte: Extinktion 0,58
Teil B der Platte: Extinktion 0,26

Beispiel 4

In die obere Hälfte (Reihe A–D) der mit Basalmembranantigenen beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte werden 0,1 ml 1:21 in 0,01 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4, der 0,15 mol/l NaCl und 0,05% (v/v) Tween 20 sowie 10% (v/v) Schafserum enthält (Medium 1), verdünntes Humanserum mit bzw. ohne Antikörper gegen Basalmembran inkubiert.
In die untere Hälfte der Mikrotiterplatte werden die gleichen Seren in 1:21 Verdünnung mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer pH 7,4, der 0,5 mol/l NaCl und 0,2% (v/v) Tween 20 sowie 10% (v/v) Schafserum enthält (Medium 2), inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation durch Absaugen der Lösungen aus den Vertiefungen und der dreimaligen Spülung mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,15 mol/l NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20 (Lösung 1) der Reihen A–D bzw. der dreimaligen Spülung mit 0,01 mol/l Phosphatpuffer, 0,5 mol/l NaCl, 0,2% (v/v) Tween 20 (Lösung 2) der Reihen E–H, werden 0,1 ml Peroxidase-markiertes anti-human-IgG 1:1 000 verdünnt mit Medium 1 und 1:1 000 verdünnt mit Medium 2 in die obere bzw. untere Hälfte der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Absaugen des Konjugates werden die Vertiefungen der Reihen A–D mit Lösung 1 und der Reihen E–H mit Lösung 2 gespült.

Anschließend wurde in alle Vertiefungen 0,1 ml Substratlösung pipettiert, und nach 15 min wird die Substratreaktion durch 0,1 ml Säurezugabe unterbrochen. Die Extinktionen werden durch Vertikalphotometrie bei 492 nm ermittelt. Von den 10fach Bestimmungen der jeweils 2 Positiv- und 2 Negativseren werden Mittelwert und Standardabweichung der Extinktionen errechnet.

Reihe	Serum	Medium/Lösung	$\times E_{492} \cdot S$	P/N
A	1 (PK)	1/1	$1,21 \pm 0,09$	3,67
B	1 (NK)	1/1	$0,33 \pm 0,055$	
C	2 (PK)	1/1	$2,47 \pm 0,18$	
D	2 (NK)	1/1	$0,30 \pm 0,04$	8,23
E	2 (NK)	2/2	$0,11 \pm 0,017$	
F	2 (PK)	2/2	$2,51 \pm 0,22$	22,8
G	1 (NK)	2/2	$0,17 \pm 0,045$	
H	1 (PK)	2/2	$1,18 \pm 0,11$	6,94