

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 156926 B



(21) Patentansøgning nr.: 3114/83

(22) Indleveringsdag: 05 jul 1983

(24) Løbedag: 24 nov 1982

(41) Alm. tilgængelig: 05 jul 1983

(44) Fremlagt: 16 okt 1989

(86) International ansøgning nr.: PCT/NL82/00043

(86) International indleveringsdag: 24 nov 1982

(85) Videreførelsesdag: 05 jul 1983

(30) Prioritet: 26 nov 1981 NL 8105341

(51) Int.Cl.⁴

G 01 N 33/555

G 01 N 33/76

G 01 N 33/487

(71) Ansøger: *AKZO N.V.; Velperweg 76; Arnhem, NL

(72) Opfinder: Antonius Hendrikus Johannes Maria *Scheepens; NL, Hans van *Helli; NL, Hendrikus Johannes Josephus *Theunissen; NL

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af et antigen eller antistof i en prøvewæske ved måling af erythrocytsedimentation og prøvesæt til udførelse af fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3 1 1 4 - 8 3

Immunokemiske reaktioner udføres i et reagensglas med en bund med form som et omvendt prisme eller pyramidestubformet prisme, således at reagensglassets nedre kant danner en strimmel med en længde, der er i det mindste lig med 1/4 af afstanden mellem to modstående vægge eller, hvis det er hensigtsmæssigt, er i det mindste lig med 1/4 af reagensglassets diameter, hvilket har som resultat at såvel følsomheden som aflæseligheden forbedres.

DK 156926 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til kvalitativ eller halvkvantitativ påvisning af tilstedeværelsen af et antigen eller antistof i en prøvevæske, og endvidere angår den et prøvesæt, der gør det muligt
5 at udføre en sådan fremgangsmåde.

Diagnosticering af patologiske tilstand hos mennesker og dyr foretages hyppigt ved anvendelse af immunokemiske reaktioner. Generelt bestemmes tilstedeværelsen af et antigen eller antistof i en legemsvæske immunologisk ved at
10 bringe det tilsvarende antistof eller antigen i kontakt med den pågældende legemsvæske, der skal undersøges, sædvanligvis blodserum eller urin.

Tilstedeværelsen af antigenet eller antistoffet, der skal påvises, kan derefter konstateres ved hjælp af det faktum,
15 at et mindre opløseligt antigen-antistofkompleks dannes.

Sådanne komplekser dannes temmelig langsomt og kun ved relativt høje koncentrationer af antigen og antistof. For at forøge følsomheden er det derfor nødvendigt at anvende bærere med henblik på at muliggøre påvisningen af denne
20 type kompleks og derfor også af de pågældende antigener og antistoffer.

Koblingen af antigener og antistoffer til en bærer er en kendt teknik, der er beskrevet i alle immunologiske håndbøger. I vid udstrækning benyttede bærere er bl.a. erythrocyter, bakterieceller, bentonit, latexpartikler og cellulose. Ved den her omhandlede diagnostiske prøvemethode
25 gøres der brug af erythrocyter som bærere.

Tilstedeværelsen af f.eks. et antigen i en forsøgsprøve eller prøvevæske kan nu påvises ved at forsøgsprøven
30 bringes i kontakt med antistoffer over for dette antigen, som er koblet til erythrocyter. Hvis antigenet faktisk er

til stede i forsøgsprøven, vil en immunokemisk reaktion finde sted mellem det pågældende antigen og antistoffet, som er koblet til erythrocyter, hvilket resulterer i et antigen-antistofkompleks, der er koblet til erythrocyter, og i en sammenkobling (agglutinerings) af sådanne erythrocyt=

5 partikler. Ved bundfældning i et reagensglas med en rund bund frembringer disse agglutinerede erythrocyter et tydeligt lysebrunt mønster.

Hvis antigenet ikke er til stede i prøvevæsken, kan ingen immunokemisk reaktion og derfor heller ikke nogen agglutinerings finde sted. Det til erythrocyter bundne antistof vil bundfældes efter kort tid og resulterer i et karakteristisk ringmønster i reagensglasset med rund bund.

10

Ved dette prøvearrangement betyder opnåelse af et karakteristisk ringmønster i reagensglasset derfor, at det forventede antigen ikke er til stede i prøvevæsken, at at prøveresultatet derfor er negativt.

15

Det omhandlede antigen kan også påvises på en anden måde, nemlig ved at bringe forsøgsprøven i kontakt med to reagenser:

20

- (1) antistoffet over for det pågældende antigen, og
- (2) det pågældende antigen, der er koblet til erythrocyter.

Hvis det omhandlede antigen ikke er til stede i prøvevæsken, vil en immunologisk reaktion finde sted mellem de to tilsatte reagenser, hvilket vil resultere i en agglutinerings mellem et erythrocytbundet antigen-antistofkompleks, som ved bundfældning ikke vil danne et karakteristisk ringmønster.

25

Hvis det omhandlede antigen er til stede i prøvevæsken, vil dette antigen reagere direkte med antistoffet, hvilket vil resultere i et (opløseligt) antigen-antistofkompleks, medens det ubenyttede erythrocytkoblede antigen vil bundfældes efter en kort tid og i et reagensglas med rund bund føre til dannelse af et karakteristisk ringmønster.

Ved dette prøvearrangement betyder opnåelse af et karakteristisk ringmønster derfor, at prøveresultatet er positivt.

10 Selv om fortolkningen af prøveresultatet derfor afhænger af det valgte prøvearrangement, danner det karakteristiske ringmønster af det erythrocytbundne antigen eller antistof hver gang grundlaget for prøvemethoden.

15 Hidtil er de ovenfor omtalte forsøg blevet udført i konventionelle rundbundede reagensglas. I sådanne reagensglas manifesterer det karakteristiske ringmønster af ikke-agglutinerede erythrocyter sig som en mere eller mindre tyk ring.

20 Det har nu overraskende vist sig, at ved udførelse af disse immunokemiske reaktioner i et reagensglas med en bund med form som et omvendt prisme eller pyramidestubformet prisme, så at rørets nedre kant danner en strimmel med en længde, der er mindst lig med en $1/4$ af afstanden mellem to modstående vægge, eller, hvis det er hensigtsmæssigt, er i det mindst lig med en $1/4$ af reagensglassets diameter,

(a) lettes aflæseligheden af prøveresultatet, så at betydelig færre ukorrekte iagttagelser foretages, og

(b) forøges prøvens følsomhed med en faktor på 2 til 3,

hvilket betyder, at antigenet eller antistoffet nu kan påvises i lavere koncentrationer end det ville være muligt med et konventionelt rundbundet reagensglas.

5 Anvendelsen af reagensglasset ifølge opfindelsen kan endvidere have den optiske fordel, at den immunologiske prøve kan udføres på en sådan måde, at et negativt resultat manifesterer sig som et karakteristisk præcipitat i form af et minustegn.

10 Reagensglassene, der anvendes inden for opfindelsens rammer, er fremstillet af et transparent materiale, f.eks. glas eller en transparent plast. Faconen af disse reagensglas, bortset fra bundens facon, er uvæsentlig. Reagensglassene kan derfor have kvadratisk, rektangulært, cirkulært eller ovalt tværsnit.

15 Som allerede nævnt skal bunden af reagensglassene have facon som et omvendt prisme eller et pyramidestubformet prisme, hvilket har som resultat, at reagensglassets nedre kant indsnævres til og som om den var en strimmel. Prismets vægge kan endvidere være bøjet en smule udefter.

20 Det karakteristiske præcipitat, som dannes ved en immunokemisk bestemmelse, og som afhængigt af det valgte prøvearrangement kan angive et positivt resultat eller et negativt resultat, dannes nu i den strimmelformede ende af reagensglasset. Det må antages, at præcipitatet i form af
25 et minustegn tilvejebringer et mere karakteristisk sedimentationsmønster - især for lægmænd, der ikke udfører sådanne forsøg særlig hyppigt - end det mønster, der opnås i de rundbundede reagensglas, hvilket således forklarer den bedre aflæselighed af forsøgsresultatet.

30 De foretrukne reagensglas ifølge opfindelsen er cylindriske og har en diameter på fortrinsvis mellem 0,5 og 1,5 cm samt

en bund med facon som et omvendt, pyramidestubformet prisme, idet den nedre kant af bunden danner en strimmel med en længde, der er i det mindste lig med $1/4$ af reagensglassets diameter og fortrinsvis har en længde, der er lig med
5 50 - 85% af reagensglassets diameter.

Højden af det omvendte prisme (eller pyramidestubformede prisme) er ikke særlig afgørende. En foretrukken "højde" er imidlertid ca. lig med 25 - 75% af reagensglassets diameter og især 40 - 50% af reagensglassets diameter.

10 Prøvemethoden ifølge opfindelsen kan anvendes til forskellige typer diagnostiske prøveformål, f.eks. til den kvalitative påvisning af patologiske antistoffer i blod eller urin, men også til påvisning af HCG i urin, hvilket har som resultat, at prøvemethoden er særlig egnet som en graviditets-
15 prøve.

P a t e n t k r a v .

20 1. Fremgangsmåde til kvalitativ eller halvkvantitativ påvisning af tilstedeværelsen af et antigen eller antistof i en prøvewæske, ved hvilken fremgangsmåde prøvewæsken bringes i kontakt med enten en erythrocytkoblet bindingspartner for antigenet eller antistoffet, som skal
25 påvises, eller med en blanding af et erythrocytkoblet antigen eller antistof selv og bindingspartneren for antigenet eller antistoffet, der skal påvises, hvilken bindingspartner ikke er koblet til en bærer, og tilstedeværelsen eller fraværet af antigenet eller antistoffet i prøvewæsken derefter fastslås ud fra det karakteristiske sedi-
30 mentationsmønster, der i reagensglasset dannes af erythro=

cyterne, k e n d e t e g n e t ved, at prøven udføres i et reagensglas med en bund med form som et omvendt prisme eller et pyramidestubformet prisme, så at reagensglassets nedre kant danner en strimmel med en længde, der er i det mindste lig med $1/4$ af afstanden mellem to modstående væg-
5 ge, eller, hvis det er hensigtsmæssigt, er i det mindste lig med $1/4$ af reagensglassets diameter.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til påvisning af tilstedeværelsen eller fraværet af proteinet HCG i urin, k e n -
10 d e t e g n e t ved, at en urinprøve i det i krav 1 beskrevne reagensglas bringes i kontakt med et erythrocyt-koblet anti-HCG, og at et karakteristisk sedimentationsmønster efter 1 til 2 timer påvises i form af et minustegn,
15 hvis HCG mangler i urinprøven.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at reagensglassets bund har form som et omvendt, pyramidestubformet prisme med en højde på 25 - 75%, for-
20 trinsvis 40 - 50% af diameteren eller, hvis det er hensigtsmæssigt, af afstanden mellem to af reagensglassets modstående vægge.

4. Prøvesæt til udførelse af fremgangsmåden ifølge et-
25 hvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at sættet omfatter i det mindste følgende:

(a) et reagensglas med en bund med form som et omvendt prisme eller keglestubformet prisme, så at reagensglassets nedre kant danner en strimmel eller linie med en længde, der er i det mindste lig med en $1/4$ af afstanden mellem to modstående vægge eller, hvis det er hensigtsmæssigt, er i det mindste lig med $1/4$ af reagensglassets diameter,
30 og
35

(b) de immunologiske reagenser, der kræves til udførelse af den immunologiske bestemmelse.

5

10

15

20

25

30

35