

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**202 320 B**

(21) A bejelentés száma: 3613/86  
(22) A bejelentés napja: 1986. 08. 18.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
85.02271 85. 08. 19. NL

(51) Int. Cl<sup>5</sup>  
**G 01 N 33/53**

(40) A közzététel napja: 1988. 09. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1991. 02. 28. SZKV 91/2.

(72) Feltalálók:

KUYPERS Leonardus Paulus Clemens, Teeffelen,  
WOLTERS Gerrit, El Oss (NL)

(73) Szabadalmas:

AKZO N. V., Arnhem (NL)

(54)

### **Berendezés immunkémiai vizsgálatokhoz**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya berendezés immunkémiai vizsgálatokhoz legalább egy tartóval, amelynek tetején nyílás van kialakítva és a tartó belseje immunkémiaileg aktív anyaggal van bevonva, a tartó teteje eltávolítható záróelemmel van lezárva, a tartó ezen túlmenően tartalmaz egy második immunkémiaileg aktív anyagot, amely – a vizsgálandó anyag távollétében – abban az alakban, amelyben ez a második immunkémiaileg aktív anyag a tartóban jelen van, a tárolás és a szállítás alatt nem léphet kölcsönhatásba a tartó belsejével normál feltételek mellett és semleges a felvitt immunkémiaileg aktív anyaggal szemben, és ahol a találmány szerint a tartó tartalmaz egy szilárd, közelítőleg gömb alakú, fagyasztva szárított részecskét, amely magában foglalja a második immunkémiaileg aktív anyagot és kívánt esetben puffer és/vagy merevítőanyagokat.

A leírás terjedelme: 6 oldal rajz nélkül

**HU 202 320 B**

A találmány tárgya berendezés immunkémiai vizsgálatokhoz, legalább egy tartóval, amelynek tetején nyílás van kialakítva és a tartó belseje immunkémiaiilag aktív anyaggal van bevonva, a tartó teteje eltávolítható záróelemmel van lezárva, a tartó ezen túlmenően tartalmaz egy második immunkémiaiilag aktív anyagot, amely – a vizsgálandó anyag távollétében – abban az alakban, amelyben a második immunkémiaiilag aktív anyag a tartóban jelen van, a tárolás és a szállítás alatt nem léphet kölcsönhatásba a tartó belsejével normál feltételek mellett és semleges a felvitt immunkémiaiilag aktív anyaggal szemben.

Az immunkémiai vizsgálatokhoz alkalmazott berendezések egy részénél [például a „Micro-ELISA” vagy a Vironosüka (R) Anti-CHV elnevezésű készülékekben] az immunkémiaiilag aktív anyag a tartó belsejében van elhelyezve annak érdekében, hogy csökkentsék azon műveletek számát, amelyeket el kell végezni az immunkémiai meghatározás véghezvitelére. A műveletek számának csökkentése két szempontból igen fontos: először is azon intézmények szempontjából, amelyeknek nagyszámú ilyen meghatározást kell elvégezni; másodsor pedig az egyedi meghatározásoknál, ahol a hibalehetőségek csökkennek, ha az elvégzendő munkamenedek száma is kevesebb. Ezért számtalan törekvés irányul arra, hogy a fent említett követelményeket minél jobban kielégítő berendezést fejlesszenek ki.

Ahhoz például, hogy az ún. szendvics-meghatározást el lehessen végezni, általában felmerült annak szükségessége, hogy a vizsgálandó anyagon túlmenően egy második immunkémiaiilag aktív anyagot vigyünk be a tartóba, amelynek mennyiségét pontosan ismerjük. Az inkubációs idő leteltével és a tartó kiöblítésével a vizsgálandó anyag mennyiségileg és minőségileg meghatározható. Azáltal, hogy ezt a második immunkémiaiilag aktív anyagot pontos mennyiségben kell adagolni, további hibalehetőség jelentkezik, és a bevétel – ha nagyszámú anyagról van szó – igen munkaigényes.

Nyilvánvaló tehát az igény egy olyan eszköze, amelynek tartója tartalmazza a második immunkémiaiilag aktív anyagot, hogy a meghatározó vizsgálatot végző személynek ezt már nem kell hozzáadni.

A 4 017 597 sz. USA szabadalom olyan megoldást ismertet a probléma kiküszöbölésére, ahol a második immunkémiaiilag aktív anyagot olyan tartóba viszik be, amely az első immunkémiaiilag aktív anyag oldatával van bevonva, majd ezt követően a második immunkémiaiilag aktív anyagot fagyasztyják 5–15 másodperc alatt kb. –78°-ra és liofilizálják.

Egy másik megoldás szerint a második immunkémiaiilag aktív anyagot por alakban viszik be. Bár a fent említett eljárások megoldják azt a problémát, hogy az immunkémiai meghatározást végző személynek ne kelljen beadni a második immunkémiaiilag aktív anyagot, számtalan hátránnyal járnak és a gyakorlatban nem váltak be.

Először is a második immunkémiaiilag aktív anyag oldott alakban van jelen a bevonattal ellátott csőben egy bizonyos (rövid) ideig. Amennyiben az első immunkémiaiilag aktív anyag egy antitest (ellenanyag) és a második immunkémiaiilag aktív anyag a megfelelő antigén, valamilyen kölcsönhatás mindenképpen fellép. Egy bizonyos mértékű kölcsönhatás a fal és a második immunkémiaiilag aktív anyag között is végbemegy.

Másodsor, nagy számú cső vagy mikrotrárló lemez

lehűtése –78°-ra 15 másodpercen belül műszakilag komplikált és költséges lépéseket igényel, a liofilizáláshoz pedig nagy és költséges liofilizáló tér szükséges.

A jelen találmánnyal olyan berendezés kialakítása a célunk, amelynek alkalmazásával elkerülhető, hogy az immunkémiai meghatározást végző személynek kelljen bevinni a második immunkémiaiilag aktív anyagot és egyidejűleg kiküszöbölhető az ismert megoldások hátrányai.

A kitűzött feladatot olyan berendezéssel oldottuk meg, amely magában foglal legalább egy, a tetején nyílással ellátott tartót, amelynek belseje immunkémiaiilag aktív anyaggal van bevonva, a tartó teteje eltávolítható záróelemmel van lezárva és tartalmaz egy második, immunkémiaiilag aktív anyagot, amely – a vizsgálandó anyag távollétében – abban az alakban, amiben a második immunkémiaiilag aktív anyag a zárt tartályban jelen van, a tárolás és a szállítás alatt, normál feltételek mellett semmiféle kölcsönhatásba nem lép a tartó belsejével és semleges az arra felvitt immunkémiaiilag aktív anyaggal szemben. A berendezés azzal jellemezhető, hogy a tartó tartalmaz egy szilárd, lényegében gömb alakú fagyasztyva szárított részecskét, ami tartalmazza a második immunkémiaiilag aktív anyagot. A gömbszerű részecskéket azt megelőzően készítjük el, mielőtt a második immunkémiaiilag aktív anyag (IAS 2) érintkezésbe kerülne a fal belső részével vagy az első immunkémiaiilag aktív anyaggal (IAS 1).

Ezen túlmenően a találmány szerinti berendezés fokozott mértékű szignifikanciát mutat, ami azt jelenti, hogy a találmány szerinti készülék detektálási határa jobb, mint a technika állását képviselő US-PS 4 017 597 szerinti készüléké.

Kitűnt ugyanis, hogy a találmány szerinti berendezéssel végzett meghatározás érzékenysége és specifikussága ugyanolyan minőségű – még hosszú ideig tartó tárolás esetén is – mint az ismert berendezésekkel végzett meghatározásoknál, ahol a második immunkémiaiilag aktív anyagot (IAS 2) a vizsgálat során adják hozzá.

Maga a berendezés legalább egy tartót tartalmaz. Amennyiben a berendezés csak egy tartóval van ellátva, ez lehet egy vizsgálócső, amelynek belsejébe az első immunkémiaiilag aktív anyagot bevisszük és amely tartalmazza a második immunkémiaiilag aktív anyagot, ami semminemű kölcsönhatásba nem lép a fal belső felével és semleges az első immunkémiaiilag aktív anyaggal szemben. A tartó teteje fedéllel van lezárva. A vizsgálócsövek és az ilyen jellegű fedelek jól ismertek, készülhetnek üvegből, vagy szintetikus polimerekből, pl. poliszürolból. A vizsgálócső lehetőleg átlátszó kell hogy legyen. A fedő és a vizsgálócső adott esetben készülhet ugyanabból az anyagból. A vizsgálócső mérete és alakja széles határok között változhat: lehet szögletes, kúpos vagy félgömb alakú fenékkal kialakítva, legelőnyösebbnek a félgömb alakú fenékkiképzés tekinthető. A cső magassága változhat pl. 1 és 10 cm között, a belső átmérő 0,3–5 cm, előnyösen 0,5–3 cm lehet. A fedél önmagában ismert módon szerelhető a vizsgálócsőre, ön módon, hogy eltávolítható legyen és zárt állapotban légmentesen zárja le a csövet.

A berendezés tartalmazhat több tartót is. A tartók száma széles határok között változhat, pl. 2 és 1000, előnyösen 10 és 500 között, különösképpen 25 és 200 között. A tartók előnyösen ugyanazon anyag segítségével köthetők össze egymással, mint amilyen anyagból

maguk a tartók vannak. Ez az anyag ugyanaz lehet, mint az egy tartóval ellátott berendezéseknél. Ebben az esetben is a tartók mérete széles határok között változhat. Általában itt az egyes tartók kisebb méretűek, mint az egytartós készülékeknél. A magasság változhat 0,2 és 4 cm között, előnyösen 0,3 és 2 cm között, a belső átmérő 0,3 és 2 cm, előnyösen 0,4 és 1,0 cm között. Az igen előnyösnek tartott készülék, több tartóval, mikroterlemezként ismert, ennél a megoldásnál minden egyes tartó külön-külön van lezárva. Előnyösen olyan mikrotiter lemezt használunk, amely egymással összekapcsolódó záróelemekkel van ellátva. Erre a célra igen alkalmas egy olyan csonkokkal ellátott lemez, amelyen a csonkok 1–3 mm-re állnak ki és a tartókat légmentesen zárják le. Különösképpen szilikongumiból készült csonkokkal kialakított lemezek alkalmasak erre a célra.

A tartó(k) falai immunkémiailag aktív anyaggal (IAS 1) vannak bevonva, amelyet önmagában ismert módon viszünk fel, pl. adszorpció vagy kovalens kötés útján. Ezt célszerűen úgy végezhetjük el, ha egy immunkémiailag aktív oldatot vagy szuszpenziót viszünk be a tartó(k)ba és egy bizonyos idő után, pl. 3–24 óra elteltével az oldatot vagy a szuszpenziót eltávolítjuk a tartóból. Az adszorpció eredményeképpen az immunkémiailag aktív anyag feltapad a tartó(k) belső falára. Általában a tartó(k) belső falfelületének 80%-ára viszünk fel az első immunkémiailag aktív anyagból, hogy megakadályozzuk ennek a tartó(k) faláról való elmozdulását, amikor a záróelemekkel zárunk.

Amennyiben a készülék több tartóval rendelkezik, a tartók belső fala ellátható az első immunkémiailag aktív anyaggal és minden tartó tartalmazhatja a második immunkémiailag aktív anyagot (IAS 2). Előnyös lehet, ha a készülék egy vagy több olyan tartót foglal magában, amelyekben nincs jelen az első immunkémiailag aktív anyag, vagy a második immunkémiailag aktív anyag, vagy az első immunkémiailag aktív anyag és a második immunkémiailag aktív anyag, vagy ezek kombinációja, és amelyekben így vak meghatározásokat végezhetünk el.

Kalibráló meghatározások céljaira egyes tartók tartalmazhatnak az első immunkémiailag aktív anyagot tartalmazó részecske mellett egy szilárd, lényegében gömb alakú, fagyasztva szárított részecskét, amely a vizsgálendő anyagot tartalmazza.

A tartókban a második immunkémiailag aktív anyagnak olyan formában kell jelen lennie, hogy a normál feltételek mellett történő tárolás és szállítás során ne léphessen fel kölcsönhatás sem a tartó belsejével, sem pedig az első immunkémiailag aktív anyaggal. Ezen célból a második immunkémiailag aktív anyagot kezelésnek szokták alávetni, mielőtt az érintkezésbe kerülne a tartó belső falával vagy első immunkémiailag aktív anyaggal. Ezen készülékeknél döntő fontosságú, hogy az immunkémiailag aktív anyagok mennyisége pontosan ismert legyen. A találmány értelmében a tartókban lévő részecskéket oly módon hozzuk létre, hogy a második immunkémiailag aktív anyag oldatának vagy szuszpenziójának egy cseppjét – mikoris a csepp térfogatát pontosan ismerjük és az reprodukálható, előnyösen 0,025–0,70 ml – szabadesésben hagyjuk leesni egy hideg folyadékra keresztül, ami nem keveredik a vízzel és amely kisebb sűrűségű, mint a víz, majd a megfagyott pelleteteket összegyűjtjük a hideg folyadék fenékrészének felületén és fagyasztva szárítjuk. Ily módon szilárd,

stabil és többé-kevésbé gömb alakú részecskéket kapunk, amelyek a második immunkémiailag aktív anyagból pontosan ismert, reprodukálható mennyiséget tartalmaznak, előnyösen 3,6–5,2 mm-es átmérővel. Ebben az esetben a „lényegében gömb alakú” vagy „gömbszerű” kifejezés azt jelenti, hogy egy alakzatot kapunk oly módon, hogy egy csepp vizet hagyunk áthullani egy folyadékra, ami a cseppet megfagyasztja.

Előnyösnek tekinthető, ha a második immunkémiailag aktív anyag vizes oldatához vagy szuszpenziójához olyan anyagot adunk, amely szilárdságot biztosít a fagyasztva szárított részecskékeknek, ill. valamilyen merevítő anyagot, például olyan cukrokat, mint a szacharóz, mannóz, laktóz és mannit, vagy fehérjetartalmú termékeket, pl. szérum proteint, laktalbumin hidrolizátumot és kazein hidrolizátumot. A megfelelő részecske fogja tartalmazni a merevítő anyagot. Vízzel nem keveredő folyadékként használhatunk szénhidrogént vagy halogénezett szénhidrogént vagy ezek keverékét, pl. hexánt, kloroformot, heptánt, izooktánt, toluolt, hexán–kloroform keverékeket és benzol–hexán keverékeket vagy kriogén folyadékokat, mint pl. a folyékony oxigén. A vízoszlop alsó felületén a vízzel nem keveredő folyadék hőmérséklete előnyösen  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  alatt van. Abban az alakban, amelyben a második immunkémiailag aktív anyag a lezárt tartóban van, az anyag – a vizsgálat tárgyát képező anyag távollétében – nem léphet kölcsönhatásba a tartó belső falával és semlegesnek kell lennie az első immunkémiailag aktív anyaggal szemben a készülék tárolása és szállítása alatt normál feltételek mellett. Ebben a vonatkozásban a „nem mutathat kölcsönhatást” és a „semleges” kifejezések azt jelentik, hogy semmiféle módon nem jöhet létre kötés a tartó belső falával vagy az első immunkémiailag aktív anyaggal, legfeljebb olyan mértékben ami nem fejt ki negatív hatását a találmány szerinti készülékkel végzett meghatározások minőségére. „Normál feltételek” alatt olyan feltételeket értünk, amelyek szokásosak az összehasonlítható készülékek tárolásánál és szállításánál használatos megoldásokkal. Általában a tárolás és a szállítás alatt a javasolt hőmérséklet  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  között, előnyösen  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  között van, atmoszférikus nyomáson.

Hogy még jobb minőséget érjünk el a találmány szerinti készülékkel történő meghatározásoknál, a készüléket kiszárítjuk a záróelem és az immunkémiailag aktív anyag nélkül; majd ezt követően a fagyasztva szárított, többé-kevésbé gömb alakú részecskéket, amelyek a második immunkémiailag aktív anyagot tartalmazták, bevisszük a tartóba, lehetőleg száraz térbe, majd a tartókat a záróelemmel légmentesen lezárjuk, szintén lehetőleg száraz térben.

Gyakran a vizsgálati rendszer megkívánja egy puffer alkalmazását. Ezen célból a találmány szerinti eszköz tartója (tartói) tartalmazhat(nak) egy fagyasztva szárított, többé-kevésbé gömb alakú részecskét, ami tartalmazza a pufferanyagot, és amit ugyanúgy készítünk el, mint a második immunkémiailag aktív anyagot. Előnyösen, a részecske elkészítésénél a második immunkémiailag aktív anyag vizes oldatából vagy szuszpenziójából indulunk ki, amely kellő mennyiségben tartalmazza a pufferanyagot. Ekkor a fagyasztva szárított, többé-kevésbé gömb alakú második immunkémiailag aktív anyag ugyancsak tartalmazza a pufferanyagot.

A találmány szerinti eszköz tartói tartalmazhatnak több immunkémiailag aktív anyagot is (IAS 3, IAS 4

stb.), feltéve, hogy ezek az anyagok kielégítik ugyanazokat a kritériumokat, mint a második immunkémiai-  
lag aktív anyag, és feltéve, hogy ezek az anyagok abban  
a formában, ahogy bevezetésre kerülnek, ugyancsak  
semlegesegek egymással és a második immunkémiai-  
lag aktív anyaggal szemben a már ismertetett feltételek  
mellett. Az IAS 3, IAS 4 stb. anyagokat hasonló módon  
kezeljük, mint a második immunkémiai-  
lag aktív anyagot és így nyerjük a fagyaszttva szárított, lényegében  
gömb alakú IAS 3, IAS 4 stb. részecskéket. Az a vizs-  
gálati módszer, amelynek során a találmány szerinti  
készülék a tartókkal, amelyek a második és harmadik  
immunkémiai-  
lag aktív anyagokat tartalmazzák, igen jól  
alkalmazható inhibíciós vizsgálatokban, amikor a har-  
madik immunkémiai-  
lag aktív anyag olyan anyagot tartal-  
maz, ami immunkémiai-  
lag egyenértékű vagy immu-  
nológiai-  
lag kiegészíti az immunkémiai-  
lag aktív any-  
got, amelyet meg kívánunk határozni. Egy másik vizsgálati  
módszerben, amely-  
nél a találmány szerinti készülék elő-  
nyösen alkalmazható, mint pl. a szendvics-vizsgálat, egy  
második immunkémiai-  
lag aktív részecske elegendő.

A találmány szerinti készülék alkalmazásával, az első  
és a második immunkémiai-  
lag aktív anyagok (esetleg a  
harmadik immunkémiai-  
lag aktív anyag) és a választott  
vizsgálati módszer függvényében antitestek, antigének  
és haptének határozhatók meg.

A szendvics vizsgálat során az első és a második  
immunkémiai-  
lag aktív anyagok az antitestek, ha egy  
antigént kell meghatározni, és antigének vagy anti-anti-  
testek, ha egy antitestet kell meghatározni. Az első és  
második immunkémiai-  
lag aktív anyag is lehet polikloná-  
lis vagy monokloná-  
lis antitest, azzal a feltételezéssel,  
hogy amennyiben az első és a második immunkémiai-  
lag aktív anyag a meghatározandó antigén elleni monokloná-  
lis antitest, az első immunkémiai-  
lag aktív anyag anti-  
testjeinek gyakran a második immunkémiai-  
lag aktív  
anyag antitestekétől eltérő antigén determináns ellen  
kell irányulniuk. Amennyiben a meghatározandó anyag-  
nak két vagy több azonos antigén determinánsa van,  
vagy amennyiben olyan meghatározandó anyag, amely  
bár maga nem tartalmaz azonos determinánst, de a vizs-  
gálandó közegben csomó formájában jelen van oly mó-  
don, hogy ez a csomó két vagy több azonos antigén  
determinánst tartalmaz, az első és a második immunké-  
miai-  
lag aktív anyag lehet monokloná-  
lis antitest, ami  
ugyanazon antigén determinánssra irányul.

A kompetitív vizsgálat során a második immunké-  
miai-  
lag aktív anyag antigén vagy haptén, ha az első  
immunkémiai-  
lag aktív anyag monokloná-  
lis vagy poli-  
kloná-  
lis antitest, és monokloná-  
lis vagy poli-  
kloná-  
lis anti-  
test, ha az első immunkémiai-  
lag aktív anyag antigén  
vagy haptén.

Ha az első immunkémiai-  
lag aktív anyag az inhibi-  
ciós vizsgálatnál monokloná-  
lis vagy poli-  
kloná-  
lis anti-  
test, a második immunkémiai-  
lag aktív anyag is mono-  
kloná-  
lis vagy poli-  
kloná-  
lis anti-  
test és a harmadik immu-  
n-  
kémiai-  
lag aktív anyag antigén kell, hogy legyen. Ezzel  
szemben, ha a második immunkémiai-  
lag aktív anyag  
antigén vagy haptén és a harmadik immunkémiai-  
lag aktív anyag antitest kell, hogy legyen, ha az első immu-  
n-  
kémiai-  
lag aktív anyag antigén haptén.

Ebben az esetben is az előbb említett módszert alkal-  
mazzuk, ha az első és a második immunkémiai-  
lag aktív  
anyag monokloná-  
lis antitest.

Hogy a detektálás lehetőségét biztosítsuk, a második

immunkémiai-  
lag aktív anyagot el kell látni egy jelölésre  
alkalmas anyaggal, vagy pedig a vizsgálati anyag inkubá-  
ciós ideje és a tartó kiöblítése után érintkezésbe kell  
hozni egy olyan anyaggal, ami kötődik a második  
immunkémiai-  
lag aktív anyaghoz és el van látva egy jelöl-  
ésre alkalmas anyaggal. Előnyösen magát a második  
immunkémiai-  
lag aktív anyagot kell ellátni a jelölésre  
alkalmas anyaggal. Ez az anyag lehet izotóp vagy en-  
zim, festékanyag, vagy valamilyen fluoreszkáló anyag,  
fém-szól vagy festékanyag-szól, ami kötődik a második  
immunkémiai-  
lag aktív anyaghoz.

A találmány szerinti készülék alkalmazásával az im-  
munkémiai meghatározást általában az alábbi módon  
végezzük el. A záróelem eltávolítása után vizsgálandó  
folyadékot viszünk be a tartóba. Ezt követően egy bizo-  
nyos ideig inkubálunk. Az inkubációt követően a folya-  
dékot eltávolítjuk és a tartót kiöblítjük, ezután a vizsgá-  
lat eredménye meghatározható, ha a jelölésre használt  
anyag izotóp, festékanyag, fluoreszkáló anyag vagy  
fémrészecske. Amennyiben a jelölő anyag enzim, egy  
szubsztrátumot is kell alkalmazni, amelyet az enzim  
detektálható anyaggá alakít át.

A találmány szerinti készülékkel az immunkémiai  
meghatározások oly módon végezhetők el, hogy speci-  
fikusság, érzékenység és szelektivitás tekintetében sem-  
miképpen nem maradnak el azoktól az ismert készülé-  
kekkel végzett meghatározásoktól, amelyek során a más-  
odik – és esetleg a harmadik – immunkémiai-  
lag aktív  
anyagot a meghatározás alatt vagy röviddel az előtt  
adagoljuk be, még abban az esetben sem, ha a készüléket  
hónapokig tárolták.

A találmányt részletesebben az alábbi példák segítsé-  
gével ismertetjük.

#### 1. példa

Négy polisztirol mikrotiter lapból, amelyek nyolc  
sorban tizenkét kúposan hengeres tartót alkalmaznak,  
(magasságuk 10 mm, felső átmérőjük 6,5 mm és alsó  
átmérőjük 6 mm volt) és fenékrészüket laponos volt kiké-  
pezve, néhány tartót feltöltöttünk 0,135 ml vizes oldat-  
tal, ami az első immunkémiai-  
lag aktív anyagot tartal-  
mazta. 16 óra elteltével a folyadékot eltávolítottuk, a  
mikrotiter lemezeket 24 órán át 20 °C hőmérsékleten  
levegőn megszárazítottuk; a levegő relatív nedvességtar-  
talma kevesebb volt, mint 20%. Az 1. és 2. mikrotiter  
lemezeket azonnal felhasználtuk a meghatározásokhoz,  
amelyek során, miután a vizsgálandó anyagot bevittük  
a tartóba, az 1. mikrotiter lemez tartóiba egy cseppet  
vittünk be a második immunkémiai-  
lag aktív anyag vizes  
oldatából és a 2. mikrotiter lemez tartójába a második  
immunkémiai-  
lag aktív anyagot tartalmazó részecskéket  
vittünk be. Ezt úgy végeztük, hogy egy cseppből indul-  
tunk ki, amely ugyanolyan térfogatú és a második im-  
munkémiai-  
lag aktív anyag koncentrációja ugyanaz,  
mint azé a cseppé, amit az első mikrotiter lemez tartó-  
jába vittünk be.

A 3. és 4. mikrotiter lemez tartóiba a második immu-  
n-  
kémiai-  
lag aktív anyagot tartalmazó részecskéket vittünk  
be száraz térben, amelyet ugyancsak oly módon készí-  
tettünk el, hogy egy cseppből indultunk ki, amely azonos  
térfogatú volt és azonos koncentrációban tartalmazta a  
második immunkémiai-  
lag aktív anyagot, mint azzal a  
cseppel, amit az első mikrotiter lemez tartó-  
jába vittünk be. Egyes tartókba harmadik immunkémiai-  
lag aktív  
anyagot is bevittünk.

Ezt követően a 3 és 4 mikrotiter lemezeket lezártuk száraz térben a csonkokkal ellátott záróelemmel, ezek szilikongumból készültek és 2,5 mm-nyire álltak ki; ezek a csonkok a mikrotiter lemezek tartóit légmentesen zárták le, a tárolás 1 hétig vagy 3 hónapig tartott, 18 °C hőmérsékleten és atmoszférikus nyomáson.

Az oldatból, amely pontosan ismert mennyiségben tartalmazott második immunkémiai aktív anyagot; pufferoldatot és szacharózt, egy cseppentő pipettával 0,05 ml cseppeket juttatunk be szabadeséssel egy Dewar-palackba, ami 80 cm<sup>3</sup> folyékony nitrogénnel volt feltöltve. A palack fenekén szilárd, közelítőleg gömb alakú fagyasztva szárított részecskék gyűltek össze. Ezeket a részecskéket használtuk fel a 2, 3 és 4 mikrotiter lemezek tartóiba. A harmadik immunkémiai aktív anyagokat tartalmazó részecskéket hasonló módon készítettük el.

A vizsgálatokat a következő módon végeztük el. Miután bevittük a vizsgálat tárgyát képező közeget, ami a vizsgálandó anyagból pontosan ismert mennyiséget tartalmazott, 37 °C hőmérsékleten egy bizonyos ideig inkubáltunk, ezt követte a puffer oldatos öblítése és a detektálás. Amennyiben jelölésre enzimet (peroxidáz enzimet) használtunk, további inkubációs lépésre került sor, amelynek során a detektálást megelőzően egy peroxidtartalmú szubsztrátumot használtunk. A detektálást

mindegyik példa esetében kolorimetrikus eljárással végeztük.

Az 1., 4., 7. és 10. példákat, amelyekben a HBs Ag (hepatitis B felület antigén) meghatározása ment végbe, hasonló módon fogantatosítottuk, megjegyezve, hogy az 1. példánál a második immunkémiai aktív anyagot tartalmazó cseppet, a 4., 7. és 10. példában pedig a második immunkémiai aktív anyagot tartalmazó részecskéket használtuk. Az időtartam, ami után a vizsgálatot elvégeztük, miután a részecskéket bejuttattuk a tartóba, változott. Ugyanez vonatkozik a 2., 5., 8. és 11., valamint a 3., 6., 9. és 12. csoportokhoz tartozó példákra, amelyekben HCG (humán korio gonadotropin) és tesztoszteron került meghatározásra. Minden példa szerinti vizsgálatot tízszer végeztünk el, az a mennyiség, ami az 1. táblázat utolsó oszlopában van feltüntetve, 10 meghatározás átlagértéke.

Ahogy az eredményből kitűnik, a találmány szerinti készülékkel végzett meghatározások minősége ugyanaz, mint az ismert készülékekkel végzett meghatározások. A találmány szerinti készülék még azzal a további előnnyel is rendelkezik, hogy annak a személynek, aki a meghatározásokat végzi, nem kell bejuttatnia pontosan ismert mennyiségben a második immunkémiai aktív anyagot a tartó(k)ba.

1. táblázat

Példa	mikrotiter lemez	első immunkémiai aktív anyag	második immunkémiai aktív anyag	izotópos jelölés anyaga	a vizsgálat típusa	vizsgálati közeg	harmadik immunkémiai aktív anyag	inkubációs idő	talált mennyiség
1.	1	M anti-HBs	anti-HBs	enzim	szendvics	0,1 szérum	N.A.	1 óra	1,0 mg/ml
2.	1	HCG	anti-HCG	arany-szol	kompetitív	0,1 ml vizelet	N.A.	1 óra	1010 IU/1
3.	1	anti-T	anti-T	festék-anyag	inhibíció	0,1 ml PBS	I-BSA cseppekben adagolva	2 óra	250 ml
4.	2	M anti-HBs	anti-HBs	enzim	szendvics	0,1 ml szérum	N.A.	1 óra	1,0 mg/ml
5.	2	HCG	anti-HCG	arany-szol	kompetitív	0,1 ml vizelet	N.A.	1 óra	1012 IU/1
6.	2	anti-T	anti-T	festék-anyag	inhibíció	0,1 ml PBS	T-BSA	2 óra	252 mg/ml
7.	3	M anti-HBs	anti-HBs	enzim	szendvics	0,1 ml szérum	N.A.	1 óra	1,0 mg/ml
8.	3	HCG	anti-HCG	arany-szol	kompetitív	0,1 ml vizelet	N.A.	1 óra	980 IU/1
9.	3	anti-T	anti-T	festék-anyag	inhibíció	1 ml PBS	T-BSA	2 óra	245 mg/ml
10.	4	M anti-HBs	anti-HBs	enzim	szendvics	0,1 ml szérum	N.A.	1 óra	1,0 mg/ml
11.	4	HCG	anti-HCG	arany-szol	kompetitív	0,1 ml vizelet	N.A.	1 óra	1013 IU/1
12.	4	anti-T	anti-T	festék-anyag	inhibíció	0,1 ml PBS	T-BSA	2 óra	257 mg/ml

PBS = foszfát-pufferes fiziológiai sóoldat hepatitis B felület antigén  
 HBs = antitest (bárány) HBsAg ellen  
 HCG = humán korio gonadotropin

anti-HCG = antitest (nyúl) T ellen HBsAg =  
 T-BSA = számos T molekula szarvasmarha szérum albumin anti-molekulához van kapcsolva  
 N.A. = nem alkalmazható

## 2. példa

Két mikrotiter lemezből 23 tartót bevontunk M-anti HBsAG anyaggal, mint az 1. példánál. Ezt követően 0,050 ml vizes oldatot – amely anti HBsAG-t tartalmazott és peroxidáz-enzimmal volt jelölve – juttatunk be 0 °C hőmérsékleten az egyik mikrotiter lemez bevonattal ellátott tartóiba. Tizenöt másodpercen belül az oldat lefagyott –78 °C-ra, ezt követően a mikrotiter lemez 16 óráig fagyaszttva – szárítva lett. A másik mikrotiter lemez bevonattal ellátott tartójába anti-HBsAg-t tartalmazó részecskét, peroxidáz-enzimmal jelölve vittünk be. A részecskéket az 1. példában leírt módon készítettük el. Ezt követően enzim immunvizsgálatokat végeztünk el mindkét mikrotiter lemezben tizenkilenc különféle emberi szérummal, amelyek nem tartalmaznak HBsAg-t és két esetben emberi szérummal, amelyek 0,1 egység/ml ill. 1,0 egység/ml HBsAg-t tartalmaztak. A vizsgálat és a detektálás az 1. példának megfelelően ment végbe.

A szignifikancia mértékét az

$$\frac{x - Y}{Z}$$

képletből számítottuk ki, ahol  $x = 0,1$  vagy  $1,0$  egység HBsAG/ml tartalmú szérumoknál mért értékek átlaga,  $y = a$  HBsAg-t nem tartalmazó szérumoknál mért értékek átlaga és  $Z = Y$  átlagszórása.

A 2. táblázatban azokat az eredményeket foglaltuk össze, amelyek világosan mutatják, hogy a detektálási határ alacsonyabb a találmány szerinti készüléknél, mint az US-PS 4 017 597 szerinti készüléknél, minél magasabb a szignifikancia mértéke, annál alacsonyabb a detektálási határ.

2. táblázat

	Detektálási határ	
	0,1 egység HBsAg/ml	1,0 egység HBsAg/ml
A találmány szerinti berendezésnél	8	88
Az USA szabadalom szerinti berendezésnél	3	41

Egység/ml = a HBsAg egysége a Paul Ehrlich Intézet (Frankfurt, NSZK) meghatározása alapján, egy ml-re vonatkoztatva.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Berendezés immunkémiai vizsgálatokhoz legalább egy tartóval, amelynek tetején nyílás van kialakítva és a tartó belseje immunkémiaileg aktív anyaggal van bevonva, a tartó teteje eltávolítható záróelemmel van lezárva, a tartó ezen túlmenően tartalmaz egy második immunkémiaileg aktív anyagot, amely – a vizsgálandó anyag távollétében – abban az alakban, amely ez a második immunkémiaileg aktív anyag a tartóban jelen van, a tárolás és a szállítás alatt nem léphet kölcsönhatásba a tartó belsejével normál feltételek mellett és semleges a felvitt immunkémiaileg aktív anyaggal szemben, *azzal jellemezve*, hogy a tartó tartalmaz egy szilárd, közel gömb alakú, fagyaszttva szárított részecskét, amely magában foglalja a második immunkémiaileg aktív anyagot és kívánt esetben puffer- és/vagy mercvítőanyagokat.
2. Az 1. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a berendezésben egyetlen tartó van.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a berendezésben a tartók száma 2 és 1000 között van.
4. A 3. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy a berendezés egy mikrotiter lemezt tartalmaz.
5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti berendezés, *azzal jellemezve*, hogy záróelemként egy lemez szolgál, ami a tartók zárását biztosító csomkokkal van ellátva.