



C (15) International Utility
Patent No. 11 11 1001
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

G 01N 33/543

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	863319
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.08.86
(24) Alkupäivä - Löpdag	15.08.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	20.02.87
(44) Nähtävöksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.07.91
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	19.08.85 NL 8502271 P

(71) Hakija - Sökande

1. Akzo N.V., Velperweg 76, Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kuypers, Leonardus Paulus Clemens, Singel 40, Teeffelen, Netherlands, (NL)
2. Wolters, Gerrit, Mozartlaan 4, Oss, Netherlands, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Väline immunokemiallisen määrittämissuorittamiseksi
Medel för utförande av immunokemisk bestämning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 3311889 (C 07G 7/00), US A 4017597 (A 61k 43/00), US A 4162003 (B 65D 25/08),
US A 3862302 (F 26b 5/06)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu välineeseen immuno-
kemiallisen määrittämissuorittamiseksi,
jossa välineessä on vähintään yksi säi-
liö, joka on avonainen yläosastaan ja
jonka sisäosaan on kiinnitetty immuno-
kemiallisesti aktiivinen aine ja
joka suljetaan yläosastaan poistetta-
valla sulkijalla, ja tämä säiliö sisäl-
tää vähintään toisen immunokemiallises-
ti aktiivisen aineen, joka ilman koevä-
liainetta siinä muodossa, jossa mainit-
tu toinen immunokemiallisesti aktiivinen
aine on suljetussa säiliössä säilytyksen
ja kuljetuksen aikana normaaleissa olo-
suhteissa, ei ole vuorovaikutuksessa
säiliön sisäosan kanssa eikä reagoi sii-
hen kiinnitetyn immunokemiallisen aineen
kanssa, ja välineelle on luonteenomaista
se, että säiliö sisältää kiinteän, enem-
män tai vähemmän pallomaisen, kylmäku-
vatun partikkelin, joka sisältää toisen
immunokemiallisesti aktiivisen aineen.

Uppfinningen avser en anordning för ut-
förande av en immunokemisk bestämning
och den omfattar åtminstone en behållare,
vilken försetts med en öppning i
ovandelen och på vars insida anbringats
en immunokemiskt aktiv substans, och
vilken tillsluts i ovandelen medelst en
löstagbar förslutning, varvid behållaren
ytterligare innehåller åtminstone en
andra immunokemiskt aktiv substans,
vilken i frånvaro av testmedium och i
den form som den andra immunokemiskt
aktiva substansen innehålls i den till-
slutna behållaren, ej under uppbevaring
och transport uppvisar någon växelverkan
med insidan av behållaren och är inert
i förhållande till den på densamma an-
bringade immunokemiskt aktiva subs-
tansen, och att anordningen karakteri-
seras av att behållaren innehåller en
fast, mer eller mindre sfärisk, frys-
torkad patrikel, vilken innehåller den
andra immunokemiskt aktiva substansen.

Väline immunokemiallisen määrittämisen suorittamiseksi

5 Keksintö koskee välinettä immunokemiallisen määrittämisen suorittamiseksi, jossa välineessä on vähintään yksi säiliö, joka on avonainen yläosastaan ja jonka sisäosaan on kiinnitetty immunokemiallisesti aktiivinen aine (IASI).

10 Tämän tyyppinen väline, jossa mm. IASI on kiinnitetty säiliön sisäosaan immunokemiallisen määrittämisen suorittamiseksi tarvittavien toimintojen lukumäärän vähentämiseksi, on tunnettu. Toimintojen lukumäärän vähentäminen on tärkeää kahdessa suhteessa: ensiksi laitoksille, joiden on suoritettava suuria lukumääriä samaa määrittämistä ja toiseksi tee-se-itse -määrittämisessä, jossa mahdollisten virheiden lukumäärä on pienempi, jos suoritettavien toimintojen lukumäärä on pienempi. Siksi pyritään ahkerasti kehittämään välineitä, jotka vastaavat yllä mainittua tarvetta.

20 Esimerkiksi niin sanotun Sandwich-määrittämisen suorittamiseksi on yleensä tarpeen lisätä säiliöön koealustan lisäksi myös vähintään toista immunokemiallisesti aktiivista ainetta täsmällisesti tunnettu määrä. Tämän säiliön inkuboinnin ja pesun jälkeen määritettävä aine voidaan sitten yleensä määrittää kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti. Tämä toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen lisäys täsmällisinä määrinä on muodostaa virheiden lähteen ja, jos kyseessä ovat suuret lukumäärät, on työlästä. Siksi olisi edullista antaa käyttöön väline, jonka säiliö(t) sisältää myös mainitun toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen niin, ettei määrittämistä suorittavan henkilön enää tarvitse lisätä mainittua ainetta.

30 US-patenttijulkaisu 4 017 597 antaa käyttöön tämän ongelman ratkaisun. Toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine lisätään ensimmäisellä immunokemiallisesti aktiivisella aineella päällystettyyn säiliöön liukoisessa muodossa, jonka jälkeen toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine jäädytetään noin - 78°C:een 5 - 15 sekunnin kuluessa ja

35

kylmäkuivataan. Toista menetelmää, jossa toinen immuno-
kemiallisesti aktiivinen aine lisätään kiinteänä jauheena,
pidetään mahdollisena muttei käytännöllisenä. Vaikka yllä
oleva viite esittääkin ratkaisun ongelmaan välttää immuno-
kemiallisen määrityksen suorittavan henkilön tekemän toisen
immunokemiallisesti aktiivisen aineen lisäyksen tarvetta,
joukko haittoja syntyy samanaikaisesti.

Ensiksikin lyhyestä ajasta huolimatta toinen immuno-
kemiallinen aine on läsnä liukoisessa muodossa päällystetys-
sä putkessa jonkin aikaa. Jos ensimmäinen immunokemiallisesti
aktiivinen aine on vasta-aine ja toinen immunokemiallisesti
aktiivinen aine on vastaava antigeeni, jonkin verran kes-
kinäistä vuorovaikutusta tapahtuu. Lisäksi tapahtuu jonkin
verran vuorovaikutusta seinän ja toisen immunokemiallisesti
aktiivisen aineen välillä.

Toiseksi suurien putki- tai mikrotiitterilevymäärien
jäähdyttäminen -78°C :een 15 sekunnin kuluessa vaatii tek-
nisesti hienostuneita ja kalliita välineitä.

Lisäksi suurien putki- tai mikrotiitterilevymäärien
kylmäkuivaus vaatii hyvin suuria ja kalliita kylmäkuivaus-
tiloja.

Tämä keksintö antaa käyttöön välineen, jonka avulla
vältetään immunokemiallisen määrityksen suorittavan henki-
lön tekemän toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen
lisäyksen tarve ja yllä olevan viitteen haitat käyttämällä
kiinteää, enemmän tai vähemmän pallomaista, kylmäkuivattua
partikkelia, joka sisältää toisen immunokemiallisesti aktii-
visen aineen. Mainittu partikkeli valmistetaan ennen kuin
toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine saatetaan koske-
tukseen putken sisäseinän tai ensimmäisen immunokemialli-
sesti aktiivisen aineen kanssa.

Sen mukaisesti tämä keksintö koskee välinettä
immunokemiallisen määrityksen suorittamiseksi, jossa väli-
neessä on vähintään yksi säiliö, joka on avonainen yläosas-
taan ja jonka sisäosaan on kiinnitetty immunokemiallisesti

aktiivinen aine ja joka suljetaan yläosastaan poistettavalla sulkiijalla, ja tämä säiliö sisältää vähintään toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen, joka ilman koeväliainetta siinä muodossa, jossa mainittu toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine on suljetussa säiliössä säilytyksen ja kuljetuksen aikana normaaleissa olosuhteissa, ei ole vuorovaikutuksessa säiliön sisäosan kanssa eikä reagoi siihen kiinnitetyn immunokemiallisesti aktiivisen aineen kanssa, ja välineelle on tunnusomaista se, että säiliö sisältää kiinteän, enemmän tai vähemmän pallomaisen, kylmäkuivatun partikkelin, joka sisältää toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen.

Kuten aikaisemmin mainittiin, partikkeli valmistetaan ennen kuin toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine (IAS 2) saatetaan kosketukseen putken sisäseinän tai ensimmäisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen (IAS 1) kanssa. Tällä vältetään yllä mainitut haitat. Lisäksi keksinnön mukaisella välineellä on parempi merkitsevyys, mikä tarkoittaa sitä, että keksinnön mukaisen välineen toteamisraja on parempi kuin US-patenttijulkaisun 4 017 595 mukaisen välineen toteamisraja. Vaikkakaan tätä parannusta ei ennen täysin ymmärretty, sitä pidetään hyvin hämmästyttävänä.

On käynyt ilmi, että keksinnön mukaisella välineellä suoritettujen määritysten selektiivisyys, herkkyys ja spesifisyys ovat jopa pitkäaikaisen säilytyksen jälkeenkin samaa luokkaa kuin määritysmenetelmässä, joka suoritetaan tunnettulla välineellä, jossa IAS2 lisätään määrityksen aikana.

Välineessä on vähintään yksi säiliö. Jos välineessä on yksi säiliö, väline saattaa muodostua koeputkesta, jonka sisäosaan on laitettu IAS1:tä ja joka sisältää toisen IAS:n, joka ei ole vuorovaikutuksessa sisäseinän kanssa eikä reagoi IAS1:n kanssa ja jonka yläosa suljetaan kannen avulla. Tämän tyyppiset koeputket ja kannet ovat sinänsä tunnettuja ja ne voivat olla lasisia tai synteettisistä polymeereistä, kuten polystyreenistä, valmistettuja. Koeputki on edullisesti läpinäkyvä. Kansi ja koeputki voivat olla samaa

materiaalia, mutta tämä ei ole mitenkään välttämätöntä. Koeputken muoto ja mitat voivat vaihdella suuresti. Koeputken pohjan muoto voi olla suorakulmainen, kartionmuotoinen tai puolipallonmuotoinen, edullisesti putken pohja on puolipallonmuotoinen. Putken korkeus voi vaihdella esimerkiksi 1 - 10 cm ja sisähalkaisija 0,3 - 5 cm ja on edullisesti 0,5 - 3 cm. Kansi voidaan asettaa paikoilleen sinänsä tunnetulla tavalla edellyttäen, että paikoilleen-asetusmenetelmä on sellainen, että kansi on poistettava ja että kansi sulkee koeputken ilmatiiviisti.

Väline voi hyvin edullisesti sisältää myös useita säiliöitä, joiden lukumäärä voi vaihdella suuresti, esimerkiksi 2 - 1000 ja edullisesti 10 - 500 ja erityisesti 25 - 200. Säiliöt voidaan hyvin edullisesti yhdistää toisiinsa käyttäen samaa materiaalia josta itse säiliöt on valmistettu. Mitä materiaaliin tulee, yhden säiliön sisältävän välineen yhteydessä yllä kuvattu pätee. Myös tässä säiliön mitat voivat vaihdella suuresti. Yleensä mainittujen säiliöiden mitat ovat pienemmät kuin yhdestä säiliöstä muodostuvan välineen mitat. Korkeus voi vaihdella 0,2 - 4 cm ja edullisesti 0,3 - 2 cm ja sisähalkaisija 0,3 - 2 cm, edullisesti 0,4 - 1,0 cm. Hyvin edullinen useita säiliöitä sisältävä väline on niin sanottu mikrotiitterilevy, jossa jokainen säiliö suljetaan erillisellä sulkijalla. Edullisesti käytetään mikrotiitterilevyä, jossa on toisiinsa yhdistetyt sulkijat. Tähän tarkoitukseen edullinen väline on levy, jossa on nuppeja (studs), jotka ovat 1 - 3 mm korkuisia ja sulkevat säiliöt ilmatiiviisti. Erityisesti levyä, jossa on silikonikumiset nupit, voidaan edullisesti käyttää tähän tarkoitukseen.

Säiliön tai säiliöiden sisäseinä sisältää immunokemiallisesti aktiivisen aineen (IASI), joka on kiinnitetty siihen sinänsä tunnetulla tavalla, kuten kovalenttisella kytkennällä tai adsorptiolla. Tämä voidaan edullisesti tehdä laittamalla IASI-liuos tai -suspensio säiliöön (säiliöihin) ja poistamalla liuos tai suspensio säiliöstä jonkin ajan,

esimerkiksi 3 - 24 tunnin kuluttua. Adsorption seurauksena IAS1 jää jäljelle kiinnittyen säiliön (säiliöiden) sisäseinän pintaan. Yleensä enintään 80 % säiliön (säiliöiden) sisäseinän pinnasta peitetään IAS1:llä, jottei IAS1 irtoaisi säiliön (säiliöiden) sisäseinän pinnalta sulkijaa suljetaessa.

Jos välineessä on useita säiliöitä, säiliöiden sisäpinta voi sisältää IAS1:n ja kaikki säiliöt voivat sisältää IAS2:n; tämä ei kuitenkaan ole välttämätöntä. Voi olla edullista, että välineessä on yksi tai muutamia säiliöitä, jotka eivät sisällä IAS1:tä tai IAS2:ta tai IAS1:tä ja IAS2:ta tai näiden yhdistelmää, joissa tyhjäkokeet voidaan suorittaa. Määritysten kalibroimiseksi jotkut säiliöt voivat sisältää IAS2:ta sisältävän partikkelin lisäksi kiinteään, enemmän tai vähemmän pallomaisen, kulmäkuivatun partikkelin, joka sisältää määritettävää ainetta.

Säiliöiden tulisi sisältää IAS2 sellaisessa muodossa, ettei vuorovaikutusta tapahdu säiliöiden sisäosan eikä IAS1:n kanssa säilytyksen ja kuljetuksen aikana normaaleissa olosuhteissa. Tätä tarkoitusta varten IAS2 käsitellään ennen kuin se saatetaan kosketukseen säiliön sisäseinän ja IAS1:n kanssa. Lisäksi tämän kaltaisissa välineissä on tärkeää, että täsmällisesti tunnetut määrät immunokemiallisesti aktiivista ainetta ovat läsnä. Tämän keksinnön mukaisen välineen säiliöiden sisältämät partikkelit muodostetaan antamalla pisaran vesipitoista IAS2-liuosta tai -suspensiota pisaran tilavuuden ollessa täsmällisesti tunnettu ja toistettava, edullisesti 0,025 - 0,070 ml, pudota vapaasti kylmän, veteen sekoittumattoman ja tiheydeltään vettä pienemmän nesteen läpi, ja kerätään jäätyneet napit kylmän nesteen pohjalta ja kylmäkuivataan. Tällä tavoin saadaan kiinteitä, pysyviä, enemmän tai vähemmän pallomaisia partikkeleja, jotka sisältävät täsmällisesti tunnetun, toistettavan määrän IAS2:ta ja joiden halkaisija on edullisesti noin 3,6 - 5,2 mm. Tässä yhteydessä "enemmän tai

vähemmän pallomainen" tarkoittaa sitä muotoa, joka saadaan antamalla vesipisaran pudota pisaran jäädyttävän nesteen läpi.

On edullista lisätä IAS2:n vesipitoiseen liuokseen tai suspensioon ainetta, joka parantaa kylmäkuivattujen partikkeleiden lujuutta, tämä tarkoittaa koviketta, esimerkiksi sokereita, kuten sakkaroosia, mannoosia, laktoosia ja mannitolia, ja proteiinituotteita, kuten seerumin proteiinia, laktalbumiinin hydrolysaattia ja kaseiinin hydrolysaattia. Vastaava partikkeli sisältää kovikkeen.

Veteen sekoittumattomina nesteinä voidaan käyttää hiilivetyä tai halogenoitua hiilivetyä tai näiden seosta, kuten heksaania, kloroformia, heptaania, iso-oktaania, tolueenia, heksaanikloroformiseoksia, tai kryogeenisiä nesteitä, kuten nestetyppeä tai nestehappea. Nestepatsaan pohjalla veteen sekoittumattoman nesteen lämpötila on edullisesti alle -50°C .

Siinä muodossa, jossa IAS2 on suljetussa säiliössä, IAS2 ilman testiväliainetta ei saisi olla vuorovaikutuksessa säiliön sisäseinän kanssa eikä reagoida IAS1:n kanssa säilytyksen ja kuljetuksen aikana normaaleissa olosuhteissa. Tässä yhteydessä "ei olla vuorovaikutuksessa" ja "ei reagoida" tarkoittavat sitä, ettei millään tavalla tapahdu sitoutumista säiliön sisäseinään tai IAS1:een tai sitoutumista tapahtuu vain siinä määrin, ettei sillä ole huomattavaa vastakkaista vaikutusta keksinnön mukaisella välineellä suoritettujen määritysten laatuun. "Normaalit olosuhteet" tarkoittavat sellaisia olosuhteita, jotka tavallisesti vallitsevat vastaavien tunnettujen välineiden säilytyksen ja kuljetuksen aikana. Yleensä säilytyksen ja kuljetuksen aikana ylläpidetään $-25 - +37^{\circ}\text{C}$:een ja edullisesti $-20 - +20^{\circ}\text{C}$:een lämpötilaa normaalissa ilmanpaineessa.

Välineellä suoritettavien määritysten laadun parantamiseksi edelleen väline kuivataan ilman sulkijoita ja IAS2:ta; sitten kulmäkuivatut, kiinteät, enemmän tai

vähemmän pallomaiset partikkelit, jotka sisältävät IAS2:ta, laitetaan säiliöihin edullisesti kuivassa huoneessa ja lopuksi säiliöt suljetaan ilmatiiviisti sulkijalla myös edullisesti kuivassa huoneessa.

5 Usein koeysteemi on puskuroitava kokeen aikana. Tätä tarkoitusta varten keksinnön mukaisen välineen säiliö(t) voi(vat) edullisesti sisältää kylmäkuivatun, enemmän tai vähemmän pallomaisen partikkelin, joka sisältää puskuriainetta ja joka valmistetaan samalla tavalla kuin IAS2-partikkeli. Edullisinta kuitenkin on, että partikkeli valmistetaan käyttäen vesipitoista IAS2-liuosta tai -suspensiota, joka sisältää riittävän määrän haluttua puskuriainetta. Sitten myös kylmäkuivattu, enemmän tai vähemmän pallomainen IAS2-partikkeli sisältää puskuriaineen.

15 Keksinnön mukaisen välineen säiliö(t) voi(vat) edullisesti sisältää useita immunokemiallisesti aktiivisia aineita (IAS3, IAS4 jne) edellyttäen, että mainitut aineet täyttävät IAS2:lle asetetut vaatimukset ja etteivät aineet siinä muodossa, jossa ne laitetaan, myöskään reagoi toistensa eivätkä IAS2:n kanssa jo kuvatuissa olosuhteissa. IAS3, IAS4 jne käsitetään edullisesti samalla tavalla kuin IAS2, jolloin saadaan kylmäkuivattuja, enemmän tai vähemmän pallomaisia IAS3-, IAS4- jne partikkeleita. Koemenetelmä, jossa keksinnön mukaista välinettä, jossa on IAS2- ja IAS3-partikkelin sisältäviä säiliöitä, voidaan edullisesti käyttää, on inhibitiokoe, jossa IAS3 sisältää ainetta, joka on immunologisesti ekvivalentti tai immunologisesti täydentävä sen immunologisesti aktiivisen aineen kanssa, joka halutaan määrittää. Muissa koemenetelmissä, joissa keksinnön mukaista välinettä voidaan käyttää, kuten Sandwich-kokeessa ja kompetitiivisessä kokeessa, riittää yksi ainoa IAS2-partikkeli.

35 Keksinnön mukaisella välineellä IAS1:stä ja IAS2:sta (ja mahdollisesti IAS3:sta) ja valitusta koemenetelmästä riippuen voidaan määrittää vasta-aineita, antigeeneja ja hapteeneja.

Sandwich-kokeessa IAS1 ja IAS2 ovat vasta-aineita, jos määritetään antigeenia, ja antigeeneja tai anti-vasta-aineita, jos määritetään vasta-ainetta. IAS1 ja IAS2 voivat olla sekä poly- että monoklonaalisia vasta-aineita, kun
5 ymmärretään, että jos IAS1 ja IAS2 ovat määritettävää anti-geenia vastaan muodostettuja monoklonaalisia vasta-aineita, IAS1-vasta-aineet tulisi usein tuottaa eri antigeenideterminanttia vastaan kuin IAS2-vasta-aineet. Jos määritettävässä aineessa on kaksi tai useampia identtisiä antigeenideterminantteja tai jos määritettävä aine, vaikka siinä itsessään
10 ei olekaan kahta identtistä determinanttia, on koeväliaineessa ryhmän muodossa siten, että ryhmässä on kaksi tai useampia identtisiä antigeenideterminantteja, IAS1 ja IAS2 voivat olla samaa antigeenideterminanttia vastaan muodostettuja
15 monoklonaalisia vasta-aineita.

Kompetetiivisessä kokeessa IAS2 on antigeeni tai hapteeni, jos IAS1 on mono- tai polyklonaalinen vasta-aine, kun taas IAS2 on mono- tai polyklonaalinen vasta-aine, jos IAS1 on antigeeni tai hapteeni.

20 Jos IAS1 on mono- tai polyklonaalinen vasta-aine inhibitiokokeessa, IAS2:n tulisi myös olla mono- tai polyklonaalinen vasta-aine ja IAS3:n antigeeni, kun taas IAS2:n tulisi olla antigeeni tai hapteeni ja IAS3:n vasta-aine, jos IAS1 on antigeeni tai hapteeni. Myös tässä pätee yllä
25 mainittu preferenssi, jos IAS1 ja IAS2 ovat monoklonaalisia vasta-aineita.

Jotta osoitus olisi mahdollinen, IAS2:n tulisi sisältää leima-aine tai koeväliaineen kanssa inkuboinnin ja säiliön pesun jälkeen IAS2 tulisi saattaa kosketukseen IAS2:een
30 sitoutuvan ja leima-aineen sisältävän aineen kanssa. Edullisesti itse IAS2 sisältää leima-aineen. Leima-aine voi olla IAS2:een sidottu isotooppi, tai entsyymi, väriaine, fluoresoiva aine, metallisooli tai väriainesooli.

Keksinnön mukaisella välineellä suoritettu immunokemiallinen määrittäminen suoritetaan yleensä seuraavasti. Koenesteli-
35 lisätään säiliöön sen jälkeen, kun sulki on poistettu.

Sitten inkuboidaan jonkin aikaa. Inkuboinnin jälkeen neste poistetaan ja säiliö pestään, jonka jälkeen kokeen tulos voidaan määrittää, jos leima-aine on isotooppi, väriaine, fluoresoiva aine tai metallipartikkeli. Jos leima-aine on entsyymi, pitäisi lisätä myös substraatti, jonka entsyymi muuttaa havaittavaksi aineeksi.

Keksinnön mukaisella välineellä voidaan suorittaa immunokemiallisia määrityksiä, jotka spesifisyyden, herkyyden ja selektiivisyyden suhteen eivät ole huonompia kuin välineillä, joihin IAS2 ja mahdollisesti IAS3 lisätään määrittäksen aikana tai vähän ennen määrittystä silloinkaan, kun keksinnön mukaista välinettä on säilytetty kuukausia. Seuraavat esimerkit selittävät keksintöä yksityiskohtaisemmin.

Esimerkki 1

Neljällä polystyreenimikrotiitterilevyllä, jotka sisältävät kahdeksan 12 kartiomaisesti sylinterinmuotoisen tasapohjaisen säiliön (korkeus 10 mm, ylähalkaisija 6,5 mm, alahalkaisija 6 mm), muodostamaa riviä, joukko säiliöistä täytettiin 0,135 ml:lla vesipitoista, IAS1:tä sisältävää liuosta. 16 tunnin kuluttua neste poistettiin ja mikrotiitterilevyjä kuivattiin 24 tunnin ajan 20°C:ssa ilmassa suhteellisen kosteuden ollessa alle 20 %. Mikrotiitterilevyt 1 ja 2 käytettiin välittömästi joukkoon määrityksiä, joissa koeväliaineen säiliöihin lisäyksen jälkeen mikrotiitterilevyn 1 säiliöihin lisättiin pisara vesipitoista IAS2-liuosta ja mikrotiitterilevyn 2 säiliöihin IAS2:ta sisältävä partikkeli, joka oli valmistettu alla kuvatulla tavalla käyttäen pisaraa, jonka tilavuus ja IAS2-pitoisuus olivat samat kuin mikrotiitterilevyn 1 säiliöihin lisätyn pisaran. Mikrotiitterilevyjen 3 ja 4 säiliöihin lisättiin kuivassa huoneessa IAS2:ta sisältävät partikkelit, jotka myös oli valmistettu alla kuvatulla tavalla käyttäen pisaraa, jonka tilavuus ja IAS2-pitoisuus olivat samat kuin mikrotiitterilevyn 1 säiliöihin lisätyn pisaran. Joihinkin säiliöihin lisättiin myös IAS3:a sisältäviä partikkeleita. Sitten

mikrotiitterilevyt 3 ja 4 suljettiin samassa kuivassa huoneessa sulkijalla, jossa oli 2,5 mm:n silikonikumiset nokat, jotka sulkivat mikrotiitterilevyjen säiliöt ilmatiiviisti, ja niitä säilytettiin 1 viikon tai 3 kuukauden ajan, vastavasti, 18°C:ssa normaalissa ilmanpaineessa.

Täsmällisesti tunnetun määrän IAS2:ta, puskuria ja sakkaroosia, sisältävän liuoksen 0,05 ml:n tippojen annettiin kulkea tippapipetin avulla vapaasti pudoten nestetypellä (80 cm) täytetyn Dewar-pullon läpi. Kiinteät, enemmän tai vähemmän pallomaiset partikkelit kerättiin pohjalta ja kylmäkuivattiin. Näitä partikkeleita käytettiin mikrotiitterilevyjen 2,3 ja 4 säiliöissä. IAS3:a sisältävät partikkelit valmistettiin samalla tavalla.

Määritykset suoritettiin seuraavalla tavalla. Kun koeväliaine, joka sisälsi tarkasti tunnetun määrän määritettävää ainetta, oli lisätty, levyä inkuboitiin jonkin aikaa 37°C:ssa; tämän jälkeen seurasi pesu puskurilla ja osoitus. Jos entsyymiä (peroksidaasia) käytettiin leima-aineena, ennen osoitusta suoritettiin vielä inkubointivaihe peroksidia sisältävää substraattia käyttäen. Osoitus tapahtui eri esimerkeissä kolorimetrisesti.

Esimerkit 1, 4, 7, 10, joissa määritettiin HBsAg:ta, suoritettiin identtisesti, kun ymmärretään, että esimerkiksi 1 käytettiin IAS2:ta sisältävää nestepisaraa ja esimerkeissä 4, 7 ja 10 IAS2:ta sisältäviä partikkeleja, kokeen suorittamisen ajankohdan partikkelien säiliöihin lisäyksestä vaihdellessa. Sama pätee esimerkkiryhmiin 2, 5, 8 ja 11 ja 3, 6, 9 ja 12, joissa määritettiin HCG:tä ja testosteronia, vastaavasti. Jokainen esimerkki suoritettiin 10 kertaa; saatu pitoisuus, joka on esitetty taulukon 1 viimeisessä sarakkeessa, on näiden 10 määrittelyn keskiarvo.

Kuten tuloksien perusteella tulisi olla selvää, keksinnön mukaisella välineellä suoritettujen määrittelysten laatu on sama kuin tunnetuilla välineillä suoritettujen määrittelysten laatu. Keksinnön mukaisen välineen lisäetu on se, ettei määrittelyn suorittavan henkilön tarvitse lisätä täsmällisesti tunnettua määrää IAS2:ta säiliöön (säiliöihin).

Taulukko 1

Esi- merk- ki	Mikro- tiitteri- levy	IAS1	IAS2	Leima- aine	Kokeen tyyppi	Koe- väliaine	IAS3	Inkubointi- aika	Saatu pitoisuus
1	1	M anti- HBs	anti- HBs	ent- syymi	Sand- wich	0,1 ml seerumia	N.A.	1 h	1,0 ng/ml
2	1	HOG	anti- HOG	kulta- sooli	kompete- tiivinen	0,1 ml virtsa	N.A.	1 h	1010 IU/l
3	1	anti-T	anti-T	väri- aine	inhibitio	0,1 ml PBS	T-BSA (lisätty pi- saramuodossa)	2 h	250 ng/ml
4	2	M anti- HBs	anti- HBs	ent- syymi	Sand- wich	0,1 ml seerumia	N.A.	1 h	1,0 ng/ml
5	2	HOG	anti- HOG	kulta- sooli	kompete- tiivinen	0,1 ml virtsa	N.A.	1 h	1012 IU/l
6	2	anti-T	anti-T	väri- aine	inhi- bitio	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h	252 ng/ml
7	3	M anti- HBs	anti- HBs	ent- syymi	Sand- wich	0,1 ml seerumia	N.A.	1 h	1,0 ng/ml
8	3	HOG	anti- HOG	kulta- sooli	kompete- tiivinen	0,1 ml virtsa	N.A.	1 h	980 IU/l
9	3	anti-T	anti-T	väri- aine	inhi- bitio	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h	245 ng/ml
10	4	M anti- HBs	anti- HBs	ent- syymi	Sand- wich	0,1 ml seerumia	N.A.	1 h	1,0 ng/ml
11	4	HOG	anti- HOG	kulta- sooli	kompete- tiivinen	0,1 ml virtsa	N.A.	1 h	1013 IU/l
12	4	anti-T	anti-T	väri- aine	inhi- bitio	0,1 ml PBS	T-BSA	2 h	257 ng/ml

PBS = fosfaatilla puskuroitu fysiologinen suolaliuos

anti-HOG = vasta-aine (kanin) HOG:tä vastaan

T = testosteroni

HBsAg = hepatiitti-B-pinta-antigeeni

anti-HBs = vasta-aine (lampaan) HBsAg:tä vastaan

M anti-HBs = monoklonaalinen vasta-aine (hiiren)
HBsAg:tä vastaan

HOG = ihmisen koriongonadotropiini

anti-T = vasta-aine (kanin) T:tä vastaan

T-BSA = useita T-molekyyliä, jotka on kytketty
naudan seerumin albumiinimolekyyliin

N.A. = ei käytetty

Esimerkki 2

Kahden mikrotiitterilevyn 23 säiliötä päällystettiin M-anti-HBsAg:llä kuten esimerkissä 1. Tämän jälkeen 0,050 ml vesipitoista liuosta, joka sisälsi peroksidaasilla leimattua anti-HBsAg:tä, lisättiin yhden mikrotiitterilevyn päällystettyihin säiliöihin 0°C:ssa. Liuos jäädettiin 15 sekunnin kuluessa -78°C:een, jonka jälkeen mikrotiitterilevyä kylmäkuivattiin 16 tunnin ajan. Toisen mikrotiitterilevyn päällystettyihin säiliöihin lisättiin partikkeli, joka sisälsi peroksidaasilla leimattua anti-HBsAg:tä ja joka oli valmistettu kuten esimerkissä 1. Tämän jälkeen suoritettiin entsyymi-immunologiset määritykset molemmilla mikrotiitterilevyillä 19 eri ihmisen seerumia, jotka eivät sisältäneet HBsAg:tä, käyttäen ja kahdesti seerumeilla, jotka sisälsivät 0,1 U/ml ja 1,0 U/ml HBsAg:tä, vastaavasti. Määritys ja osoitus suoritettiin kuten esimerkissä 1.

Merkitsevyys laskettiin kaavasta

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

jossa X = seerumeille, jotka sisälsivät 0,1 tai 1,0 U HBsAg/ml, mitattujen arvojen keskiarvo, Y = seerumeille, jotka eivät sisältäneet HBsAg:tä, mitattujen arvojen keskiarvo, ja Z = Y:n standardipoikkeama.

Taulukossa 2 esitetään tulokset, jotka selvästi osoittavat, että keksinnön mukaiselle välineelle saatu toteamisraja on matalampi kuin US-patenttijulkaisun 4 017 597 mukaisella välineellä saatu toteamisraja (mitä suurempi merkitsevyys on, sitä matalampi toteamisraja).

Taulukko 2

	0,1 U HBsAg/ml	1,0 U HBsAg/ml
keksintö	8	88
US-patenttijulkaisu		
4 017 597	3	41

U/ml ovat Paul Ehrlich Instituutin (Frankfurt, Saksan Liittotasavalta) määrittelemät HBsAg-yksiköt millilitraa kohti.

Patenttivaatimukset

1. Väline immunokemiallisen määrityksen suoritamiseksi, jossa välineessä on vähintään yksi säiliö, joka on avonainen yläosastaan ja jonka sisäosaan on kiinnitetty immunokemiallisesti aktiivinen aine ja joka suljetaan yläosastaan poistettavalla sulkijalla, ja tämä säiliö sisältää vähintään toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen, joka ilman koeväliainetta siinä muodossa, jossa mainittu toinen immunokemiallisesti aktiivinen aine on suljetussa säiliössä säilytyksen ja kuljetuksen aikana normaaleissa olosuhteissa, ei ole vuorovaikutuksessa säiliön sisäosan kanssa eikä reagoi siihen kiinnitetyn immunokemiallisesti aktiivisen aineen kanssa, t u n n e t t u siitä, että säiliö sisältää kiinteän, enemmän tai vähemmän pallomaisen kylmäkuivatun partikkelin, joka sisältää toisen immunokemiallisesti aktiivisen aineen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että partikkeli sisältää myös puskuriaineen.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että partikkeli sisältää myös kovikkeen.

4. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että välineessä on säiliö.

5. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että välineessä on 2 - 1000 säiliötä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että välineessä on mikrotiittorilevy.

7. Patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukainen väline, t u n n e t t u siitä, että sulkija on levy, jossa on nuppeja, jotka sulkevat säiliöt.

Patentkrav

1. Anordning för utförande av en immunokemisk bestämning, vilken anordning har åtminstone en behållare med en öppning i ovandelen och på vars insida anbringats en immunokemiskt aktiv substans och vars ovansida tillsluts med en löstagbar förslutare, och denna behållare innehåller åtminstone en annan immunokemiskt aktiv substans, vilken i frånvaro av testmedium och i den form som sagda andra immunokemiskt aktiva substans innesluts i den tillslutna behållaren, inte under uppbevaring och transport under normala förhållanden uppvisar någon växelverkan med insidan av behållaren och är inert i förhållande till den immunokemiskt aktiva substans som anbringats därpå, k ä n n e t e c k n a d därav, att behållaren innehåller en fast, mer eller mindre sfärisk frys-torkad partikel, vilken innehåller den andra immunokemiskt aktiva partikeln.
2. Anordning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att partikeln dessutom innehåller ett buffertmedel.
3. Anordning enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att partikeln dessutom innehåller ett styvningsmedel.
4. Anordning enligt ett eller flere av ovanstående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d därav, att anordningen innehåller en behållare.
5. Anordning enligt ett eller flere av ovanstående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d därav, att anordningen innehåller 2 - 1000 behållare.
6. Anordning enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att anordningen innehåller en mikrotiterplatta.
7. Anordning enligt patentkravet 5 eller 6, k ä n n e t e c k n a d därav, att förslutaren är en platta, som försetts med knoppar som försluter behållarna.