



Int. Cl. 2:

G 01 N 33/16

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



11

Patentschrift **24 24 465**

21

Aktenzeichen: P 24 24 465.3-52

22

Anmeldetag: 20. 5. 74

43

Offenlegungstag: 27. 11. 75

44

Bekanntmachungstag: 18. 11. 76

45

Ausgabetag: 23. 3. 78

Patentschrift stimmt mit der Auslegeschrift überein

30

Unionspriorität:

32 33 31

—

54

Bezeichnung:

Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis von Antigenen und deren Antikörpern im Festkörper-Radioimmuntest

73

Patentiert für:

Biotest-Serum-Institut GmbH, 6000 Frankfurt

72

Erfinder:

Schober, A., Dr.med.habil., 3400 Göttingen

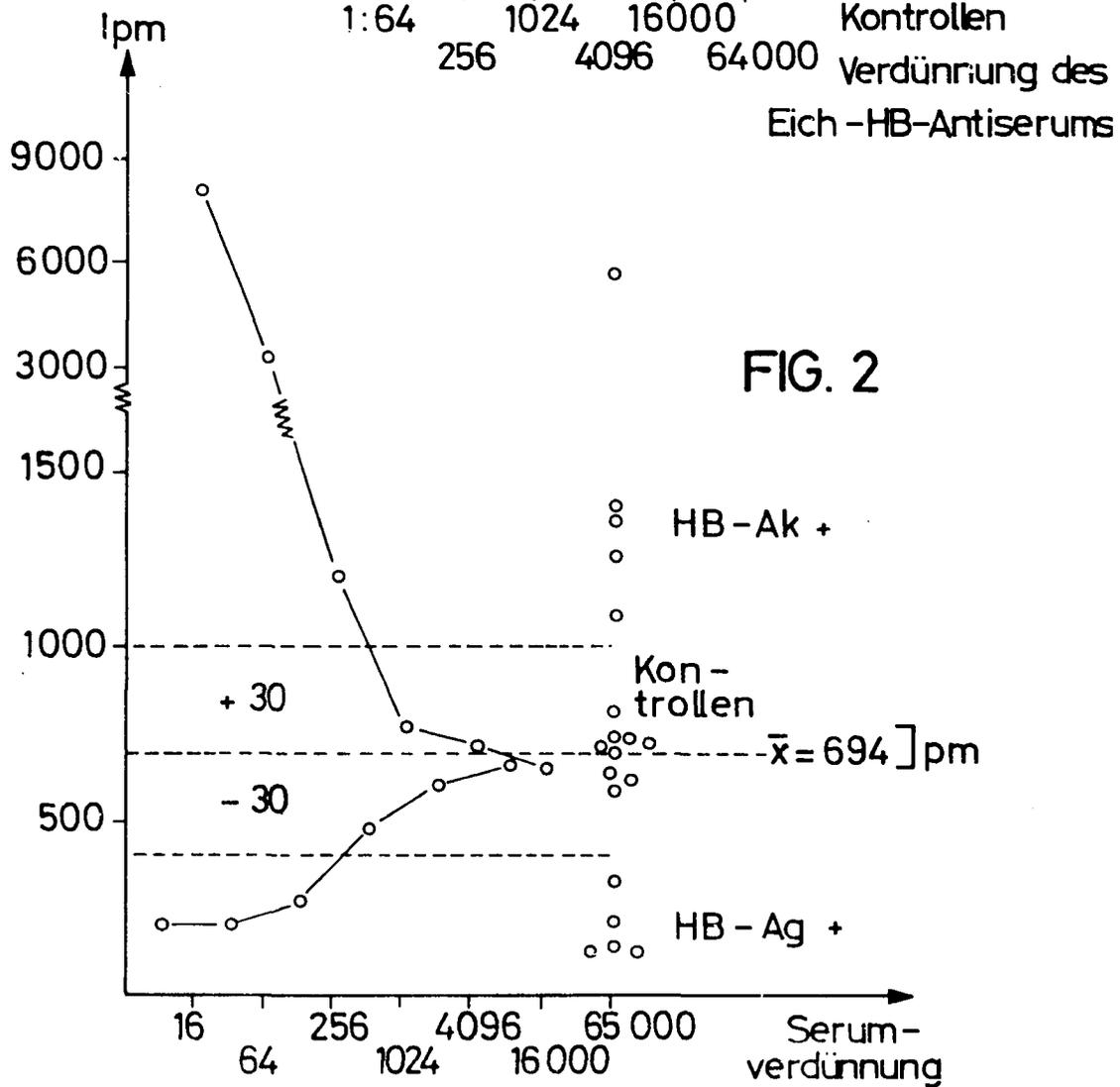
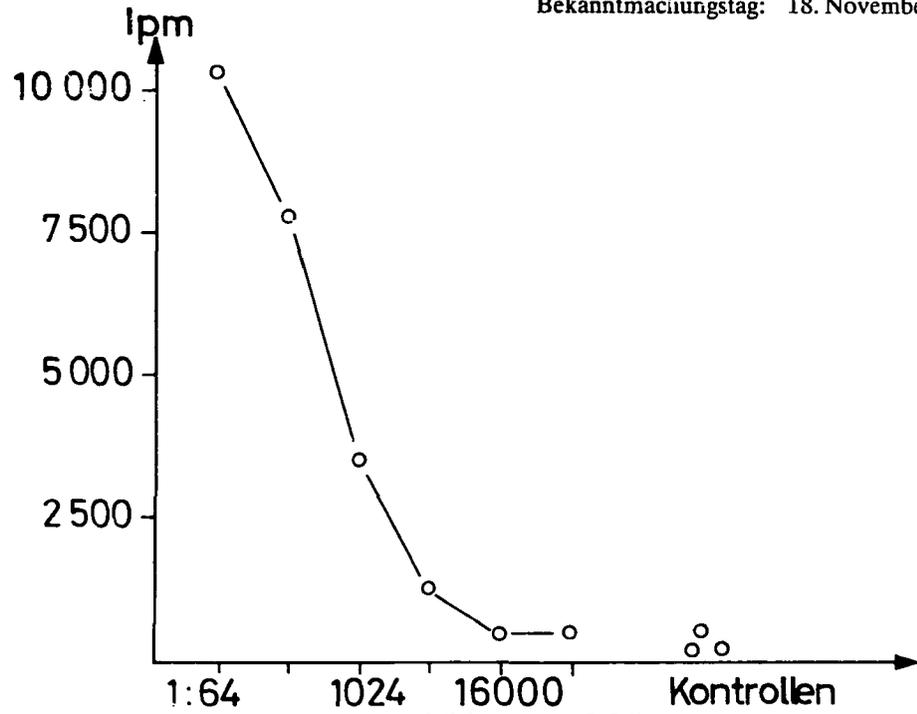
56

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-OS 22 62 479

DE 24 24 465 C 3

FIG. 1



Patentansprüche:

1. Verfahren zum Nachweis von Antigenen und deren Antikörpern durch einen Festkörper-Radioimmunttest, bei dem man eine Probe eines unbekanntes Serums mit den Wandungen eines Behälters in Berührung bringt, die einen Überzug mit bekanntem Antigengehalt haben, anschließend inkubiert, absaugt und wäscht, dann ein radioaktiv markiertes, hochreines Antigen zugibt, nochmals inkubiert, absaugt und wäscht und danach die Radioaktivität der beschichteten Teile in einem γ -Strahlenmeßgerät mißt, dadurch gekennzeichnet, daß man zum gleichzeitigen Nachweis von Antigenen mit mindestens einer Bindungsstelle oder von deren Antikörpern, die mindestens zwei Bindungsstellen im Molekül aufweisen, die Probe des unbekanntes Serums zunächst mit einer bekannten Menge des Antikörpers inkubiert und das erhaltene Gemisch erst dann mit den Wandungen des Behälters in Berührung bringt, die einen Überzug mit bekanntem Antigengehalt haben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man für die erste Inkubation 10 bis 15% der maximal vom Überzug des Reaktionsbehälters fixierbaren Menge des Antikörpers verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man 1 bis 16 Stunden bei Temperaturen von 20 bis 50°C, vorzugsweise 1 Stunde bei 37°C oder 12 Stunden bei 20°C inkubiert.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß man bei Verwendung von Mikrotiterplatten diese am Ende des Verfahrens zerschneidet und die Radioaktivität der Einzelteile mißt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als zu untersuchendes Material nicht gerinnbares Vollblut, Plasma, Serum oder andere Körperflüssigkeiten verwendet.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Nachweis von Antigenen und deren Antikörpern durch einen Festkörper-Radioimmunttest, bei dem man eine Probe eines unbekanntes Serums mit den Wandungen eines Behälters in Berührung bringt, die einen Überzug mit bekanntem Antigengehalt haben, anschließend inkubiert, absaugt und wäscht, dann ein radioaktiv markiertes, hochreines Antigen zugibt, nochmals inkubiert, absaugt und wäscht und danach die Radioaktivität der beschichteten Teile in einem γ -Strahlenmeßgerät mißt.

Es ist bekannt, daß man das Vorliegen von Antigenen oder von deren Antikörpern in einer unbekanntes Probe durch direkte oder indirekte Radioimmunprüfung nachweisen kann (vgl. z. B. Catt, K. und Tregar, G. W., Science 158 (1967), Seiten 1570 – 1572, »Solid-Phase Radioimmunoassay in Antibody-Coated Tubes«). Aus der DT-OS 22 62 479 ist auch eine Testvorrichtung für eine direkte Radioimmunprüfung auf Antigene oder

deren Antikörper bekannt. Es ist jedoch bisher noch nicht gelungen, Antigene oder ihre Antikörper radioimmunologisch gleichzeitig in einem einzigen Testverfahren nachzuweisen. Es stellte sich daher die Aufgabe, in einem verhältnismäßig kurzzeitigen Verfahren durch einen kombinierten Radioimmunttest Antigene und deren Antikörper gleichzeitig nachzuweisen.

Diese Aufgabe wird ausgehend von dem bekannten Verfahren der eingangs genannten Art dadurch gelöst, daß man zum gleichzeitigen Nachweis von Antigenen mit mindestens einer Bindungsstelle oder von deren Antikörpern, die mindestens zwei Bindungsstellen im Molekül aufweisen, die Probe des unbekanntes Serums zunächst mit einer bekannten Menge des Antikörpers inkubiert und das erhaltene Gemisch erst dann mit den Wandungen des Behälters in Berührung bringt, die einen Überzug mit bekanntem Antigengehalt haben.

Das erfindungsgemäß zu untersuchende, sogenannte »unbekannte« Serum kann ein nicht gerinnbares Vollblut, Plasma, Serum oder eine andere Körperflüssigkeit, z. B. Urin oder Speichel, sein.

Für die erste Inkubationsstufe des Verfahrens verwendet man vorzugsweise 10 bis 15% der maximal vom Überzug des verwendeten Reaktionsbehälters fixierbaren Menge des Antikörpers. Als Reaktionsbehälter können beispielsweise Mikrotiterplatten, Teströhrchen oder andere geeignete Vorrichtungen zur Anwendung gelangen. Man inkubiert z. B. 1 bis 16 Stunden innerhalb eines Temperaturbereiches von 20 bis 50°C, vorzugsweise 1 Stunde bei 37°C oder 12 Stunden bei 20°C. Längere Inkubationszeiten stören das Verfahren nicht.

Antigen und Antikörper, die nach dem Verfahren gemäß der Erfindung nachgewiesen werden können, sind z. B. Viren und Virusuntereinheiten wie Hepatitis-B-Antigene oder -Antikörper und die Coxsackieviren A und B, Bakterien, Membranen, Zellwände, verschiedene Hormone, z. B. Insulin, Arzneimittel wie Antibiotika, Gammaglobuline usw.

Die zum Waschen oder Spülen verwendeten Flüssigkeiten sollen vorzugsweise einen neutralen pH-Wert aufweisen.

Da eine enge Beziehung des HB-Antigens zur Hepatitis-B als erwiesen gelten kann und HB-Antigen-positives Blut bekanntlich den Erreger der Hepatitis-B übertragen kann, der beim Empfänger, sofern er nicht immun ist, zu einer klinisch feststellbaren oder auch zu einer klinisch nicht feststellbaren Infektion führt, ist es von großer Wichtigkeit, festzustellen, ob im Blut von Spendern HB-Antigen vorhanden ist. Der HB-Antikörper hat klinische Bedeutung, weil er in einem hohen Prozentsatz in der Rekonvaleszenzphase einer Hepatitis-B-Infektion nachgewiesen werden kann. Es ist auch noch nicht bekannt, ob Blutkonserven, deren Serum HB-Antikörper enthält, auch den Erreger der Hepatitis-B übertragen können. Auch der möglichst empfindliche Nachweis des HB-Antikörpers ist daher ein wichtiges Anliegen in der Klinik. Nachstehend wird das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise an einem Verfahren zum Nachweis von HB-Antigen und -Antikörper erläutert.

Beispiel

A. Direkter Radioimmunttest auf HB-Antikörper, dessen grundsätzliche Verfahrensmerkmale bekannt sind

Zerschneidbare Mikrotiterplatten, beispielsweise der Firma Cooke, werden mit einem Gemisch gereinigten

HB-Antigens beider Subtypen D und Y (Schöber, A., Thomssen, R. und U. Kaboth, Deutsche Medizinische Wochenschrift 97 (1972), S. 1579–1583, »Serologische Subtypen des Hepatitis-B-Antigens [Australia-Antigen]«) beschichtet. Das Gemisch ist alkalisch (0,01 M-Tris-Puffer, pH 9,5) und enthält etwa 300 ng HB-Antigen-Protein pro ml.

Die Reinigung des HB-Antigens aus Vollserum erfolgte nach dem sogenannten R_0 -S-Verfahren (R_0 = Dichte, S = Sedimentation), d. h. einer kombinierten Dichtegleichgewichts- und Sedimentationsgradientenzentrifugation, vorgenommen in Caesiumchlorid. Kriterien der Reinheit der Präparate sind ihre fehlende Reaktion mit Anti-Humanserum im Immundiffusionstest sowie das Nichtreagieren von im Versuchstier mit diesen Präparaten erzeugten Antikörpern mit menschlichen Serumproteinen.

Das zur Beschichtung verwendete HB-Antigen wird mindestens 6 Stunden bei 20°C in den Nöpfchen der Mikrotiterplatten belassen, danach abgesaugt. Nach fünfmaliger Spülung mit neutralem Puffer (0,01 M-Tris-Puffer, pH 7,5) werden Proben einer Verdünnungsreihe eines Eich-HB-Antiserums, das möglichst nur die spezifische Subtypendeterminante Anti-a enthält, einpipettiert. Nach einer Inkubation von z. B. 1 Stunde bei 37°C oder 12 Stunden bei 20°C wird der Inhalt erneut abgesaugt und die Platte gespült. Es wird dann 125 J markiertes HB-Antigen (hergestellt nach W. M. Hunter und F. C. Greenwood, Nature 194 [1962], S. 495), ebenfalls ein Gemisch beider Subtypen, das zwischen 20 000 und 40 000 Impulse pro Minute (IpM)/0,1 ml liefert, zugegeben und 1 Stunde bei 37°C oder 12 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach erneutem Absaugen

und Spülen werden die Mikrotiterplatten zerschnitten und die Radioaktivität in einem γ -Strahlen-Meßgerät gemessen. Bei niedrigen Serumverdünnungen des Eich-HB-Antikörpers erhält man eine hohe Impulszahl, die in den weiter verdünnten Proben abnimmt und schließlich die Impulswerte der gleichzeitig mitgeführten negativen Kontrollen erreicht (Fig. 1). Die Spezifität dieses direkten HB-Antikörpertests ließ sich einerseits durch Hemmversuche sichern. Dabei wird das auf HB-Antikörper zu untersuchende Material mit einer bestimmten Menge von HB-Antigen versetzt und inkubiert, z. B. 1 Stunde bei 37°C, wobei Röhrchen oder Mikrotiterplatten verwendet werden, die nicht mit HB-Antigen beschichtet sind. Nach dieser Inkubation wird das Gemisch in HB-Antigen-beschichtete Platten inkubiert, danach wird abgesaugt und gewaschen. Anschließend wird 125 J-markiertes HB-Antigen zugegeben und wieder inkubiert. Nach Absaugen und Waschen erfolgt die Messung der Radioaktivität. Wenn in dem zu untersuchenden Material HB-Antikörper vorhanden sind, dann werden diese Antikörper durch das zugefügte Antigen abgebunden und können deshalb in der zweiten Inkubation nicht mehr an das an der festen Oberfläche vorhandene Antigen gebunden werden. (Deshalb die Bezeichnung »Hemmtest«.)

Weiter ließ sich zeigen, daß im Testserum möglicherweise vorliegende Antiglobuline oder Anti- β -Lipoproteine nicht zu falsch positiven Ergebnissen führen. Untersuchungen haben gezeigt, daß alle erhaltenen Impulswerte als spezifisch für HB-Antikörper anzusehen sind, die reproduzierbar über dem 2,0fachen des Mittelwertes der negativen Kontrolle liegen, wie die nachfolgende Tabelle 1 zeigt:

Tabelle 1

Beziehung zwischen Spezifität und Mittelwert \bar{X} der negativen Kontrollen

Faktor	Zahl der Seren	Spezifisch	%
$< \bar{X}$	183	0	0
$\bar{X} - 1,5\bar{X}$	169	0	0
$1,5\bar{X} - 2\bar{X}$	17	6	33
$2\bar{X} - 2,5\bar{X}$	5	5	100
$> 2,5\bar{X}$	48	48	100
	422		

B. Der unter A beschriebene Test eignet sich zum kombinierten HB-Antigen- und Antikörpernachweis, wenn man eine Vorinkubation des zu untersuchenden Serums mit einer vorgegebenen, relativ niedrigen HB-Antikörpermenge durchführt. Enthält das Testserum HB-Antigen, wird im anschließend nach A durchgeführten Festkörper-Radioimmuntest eine Impulsreduktion gegenüber den negativen Kontrollen beobachtet, während beim Vorliegen ausreichender Mengen von HB-Antikörpern eine Impulserhöhung feststellbar ist, da die Impulszahl sich dem vorgegebenen Antikörper hinzuaddiert (vgl. hierzu Fig. 3).

Zur Vorinkubation wird vorzugsweise eine Antikörpermenge verwendet, die zwischen 10 und 15% der maximal fixierbaren Radioaktivität liefert, d. h. im Sättigungsbereich des betreffenden Eich-Antikörpers bei niedriger Serumverdünnung vorliegt. Etwa 3500 Ansätze mit negativen Kontrollen haben ergeben, daß die Standardabweichung 1 Sigma ungefähr 10% beträgt, wenn die erwähnten 10 bis 15% Antikörperbindung

Impulse zwischen 500 und 1500 je Minute liefern. Eine etwas höhere Standardabweichung der negativen Kontrollen (> 10%) ergibt sich bei Impulszahlen unter 500 je Minute. Als Sicherheitsschwelle wurden 3 Sigma gewählt, d. h. HB-Antigen liegt vor, wenn die Impulsreduktion reproduzierbar über 30% der negativen Kontrollen beträgt, HB-Antikörper, wenn eine Impulserhöhung von über 30% zu verzeichnen ist (Fig. 2). Auch hier hat eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C bei den verschiedenen Inkubationsschritten ausgezeichnete Ergebnisse geliefert.

Wie vorstehend bereits ausgeführt, liefert der beschriebene Test eindeutig spezifische Ergebnisse. Der Unterschied zwischen dem kombinierten Test und dem direkten Antikörper-Radioimmuntest liegt dabei darin, daß der im Testserum vorliegende Antikörper sich hierbei dem vorgegebenen Antikörper hinzuaddiert. Da der HB-Antigennachweis im kombinierten Test durch Reduktion der vorgegebenen Antikörpermenge erfolgt, ist die bereits beschriebene Spezifität der HB-Antikör-

24 24 465

5

perbestimmung zugleich Grundlage des spezifischen HB-Antigennachweises. Eine unspezifische Antikörperreduktion durch andere Antikörper kann ausgeschlossen werden. Eine Ausnahme bilden die im Probenmaterial möglicherweise vorliegenden Antikörper, die gegen den HB-Antikörper selbst gerichtet sind. Die Testdurchführung wird in der nachstehenden Tabelle 2 bildlich erfaßt. Es sei dabei auch darauf hingewiesen, daß für eine sichere Mittelwertbildung bei den negativen

6

Kontrollen mindestens 8 Seren mitgeführt werden sollten.

Zwar ist es bei der praktischen Anwendung der kombinierten Tests besonders vorteilhaft, daß die Reaktion (ohne Messung) in gut 3 Stunden abgeschlossen werden kann, wenn jedoch ausreichend Zeit zur Verfügung steht, ist es vorteilhaft, die Inkubationsdauer nach Zugabe des markierten Antigens auf 90 bis 120 Minuten zu verlängern.

Hierzu 3 Blatt Zeichnungen

TABELLE 2 Ag = Antigen Ak = Antikörper

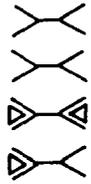
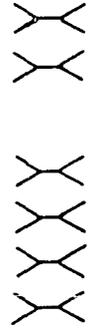
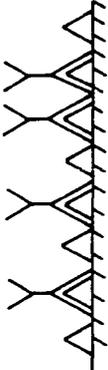
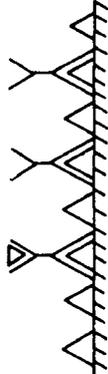
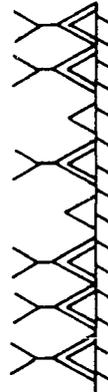
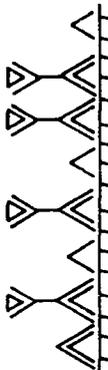
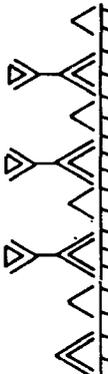
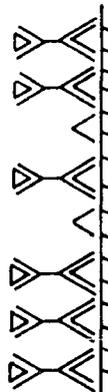
Test - Durchführung	negative Kontrolle : Ag - negativ und Ak - negativ	Ag - positives Serum Ag : Δ	Ak - positives Serum Ak : X
1. In leere Mikrotiter - platte : Serumprobe + Eich - Ak - Serum ; Inkubation ;			
2. Probe vom 1. Inkubationsgemisch in Ag - beschichtete Mikrotiterplatte ; Inkubation ; Absaugen u. Waschen ;			
3. Zugabe von ¹²⁵ J - markiertem Ag : Δ ; Inkubation ; Absaugen u. Waschen ;			
4. Messung der Radioaktivität ; Verhältnis der Zählraten :	4	2	6

FIG. 3

