



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 669 265 A5

⑤ Int. Cl.4: G 01 N 33/532
G 01 N 33/543

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 5434/85

⑦ Inhaber:
Celldynamics AG, Basel

㉑ Anmeldungsdatum: 18.12.1985

⑦ Erfinder:
Lefkovits, Hana, Bettingen

㉒ Patent erteilt: 28.02.1989

⑦ Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

④ Patentschrift
veröffentlicht: 28.02.1989

⑤ Multiindikator-Teststreifen für immunologische Analysen, ihre Herstellung und Verwendung.

⑥ Der Multiindikator-Teststreifen für immunologische Analysen, besteht aus (a) für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutralen, nicht adsorbierenden Trägerstreifen aus festem, zusammenhängendem, nicht brüchigem Material, auf welchen (b) viereckige Testflächen aus wasserunlöslichem, porösem, homogenem, adsorptionsfähigem, polymerem Material, von der Breite der Trägerstreifen, in voneinander getrennter Anordnung nebeneinander befestigt sind. An einem Ende der Streifen ist eine Grifffläche freigelassen, wobei besagte Testflächen jeweils (c) unterschiedliche Antigene in einheitlicher Verteilung tragen und die durch die Antigene nicht besetzten Bindungsstellen der Testflächen durch (d) für die Antigene nicht spezifische Proteine blockiert sind. Die Teststreifen werden für immunologische Analysen verwendet, durch Inkubierenlassen mit der zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit und dann mit der Lösung eines Konjugates aus komplementärem Antikörper und kovalent gebundenem Enzym, Radioisotop, fluoreszierendem Mittel oder Färbemittel.

PATENTANSPRÜCHE

1. Multiindikator-Teststreifen für immunologische Analysen, bestehend aus (a) für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutralen, nicht adsorbierenden Trägerstreifen aus festem, zusammenhängendem, nicht brüchigem Material, auf welchen (b) viereckige Testflächen aus wasserunlöslichem, porösem, homogenem, adsorptionsfähigem, polymerem Material, von der Breite der Trägerstreifen, in voneinander getrennter Anordnung nebeneinander befestigt sind, derart, dass an einem Ende der Streifen eine Grifffläche freigelassen ist, wobei besagte Testflächen jeweils (c) unterschiedliche Antigene in einheitlicher Verteilung tragen und die durch die Antigene nicht besetzten Bindungsstellen der Testflächen durch (d) für die Antigene nicht spezifische Proteine blockiert sind.

2. Teststreifen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die viereckigen Testflächen (b) aus wasserunlöslichen, natürlichen oder chemisch abgewandelten Kohlehydraten, insbesondere aus Cellulose, regenerierter Cellulose, Celluloseestern, Celluloseethern oder vernetzten Dextran- und Stärkeprodukten, oder aus vollsynthetischen polymeren Verbindungen, insbesondere aus der Reihe der Polyvinylverbindungen, der Polyacrylverbindungen oder der polymeren, organischen Kondensationsprodukte, bestehen.

3. Teststreifen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die viereckigen Testflächen (b) aus Nitrocellulose bestehen.

4. Teststreifen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerstreifen (a) aus einem nicht porösem Kunststoff oder aus Glas, Porzellan oder Holz bestehen.

5. Teststreifen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerstreifen (a) aus Polypropylen oder Polyethylen bestehen.

6. Verfahren zur Herstellung der Multiindikator-Teststreifen für immunologische Analysen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man je ein Blatt eines wasserunlöslichen, porösen, homogenen, adsorptionsfähigen, polymeren Materials in einer Lösung oder Suspension eines jeweils unterschiedlichen Antigens inkubieren lässt, die Blätter zur Blockierung von nicht besetzten Bindungsstellen in einer Lösung von für das Antigen nicht spezifischen Proteinen inkubieren lässt und danach trocknet, jedes Blatt in parallele Bahnen schneidet und je eine Bahn eines jeden der Blätter auf eine Trägerfolie aus festem, zusammenhängendem, nicht brüchigem, für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutralem, nicht adsorbierendem Material derart befestigt, dass die Bahnen parallel nebeneinander liegen, und den entstandenen Bahnen-Trägerfolieverbund in parallele Streifen, quer zur Längsrichtung der zuvor befestigten Bahnen schneidet, so dass jeder Streifen in nebeneinander angeordneten, voneinander getrennten viereckigen Testflächen die jeweiligen Antigene trägt.

7. Verfahren zur Herstellung eines Teststreifen-Sets, dadurch gekennzeichnet, dass man mehrere Teststreifen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 nebeneinander und parallel zueinander durch ein in bezug auf die Antigene leeres Ende auf eine gemeinsame Unterlage befestigt.

8. Verwendung eines Teststreifens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Identifizierung und Quantifizierung eines spezifischen Antikörpers (B) in einer zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit durch eine immunologische Analyse, dadurch gekennzeichnet, dass man besagten, unterschiedliche Antigene (A) tragenden Teststreifen in der zu untersuchenden, allenfalls den Antikörper (B) enthaltenden Flüssigkeit inkubieren lässt und danach von den nicht gebundenen Komponenten der Flüssigkeit durch Waschen befreit, den Teststreifen in einer Lösung eines Konjugates

(CD), welches aus einem für den in der Flüssigkeit zu bestimmenden Antikörper (B) komplementären Antikörper (C) und einem an letzteren kovalent gebundenen Enzym, radioaktiven Isotop, fluoreszierenden Mittel oder Färbemittel (D) besteht, inkubieren lässt und danach von dem nicht gebundenen Anteil des Konjugates (CD) durch Waschen befreit, und die Anwesenheit und Menge des Antikörpers (B) unter Ausnutzung der enzymatischen Reaktion, der Radioaktivität, der Fluoreszenz bzw. der Farbe der Komponente (D) des auf dem Teststreifen gebildeten Stoffes (ABCD) bestimmt.

BESCHREIBUNG

Die Verfahren und Methoden sowohl der Radioimmunoassay (RIA) als auch der Enzymimmunoassay (EIA) sind aus methodologischen Aspekten der Grundlagenforschung entwickelt worden [E. Engvall und P. Perlmann, *Immunochemistry* 8 (1971), 1971]; sie sind allgemein bekannt.

Ganz allgemein sind für diese Verfahren und Methoden drei Schritte charakteristisch:

1. Eine relevante Substanz wird kovalent oder durch Adsorptionskräfte an einen festen Träger gebunden. Die relevante Substanz weist eine stabile, dreidimensionale Struktur auf und wird im folgenden als Antigen bezeichnet.

2. Die gegebenenfalls den entsprechenden Antikörper enthaltende, zur Bestimmung vorgesehene Probe wird mit dem Antigen-gebundenen Träger in Kontakt gebracht; auf diese Weise wird die Bindung eines komplementären Antikörpermoleküls (wenn in der Probe Antikörper vorhanden sind) an das Antigen bewirkt.

3. Die Bindung des in der Probe enthaltenen Antikörpers an das entsprechende Antigen wird durch Zugabe einer weiteren bzw. zweiten komplementären Struktur bestimmt. Diese komplementäre Struktur ist meist ein Antikörper, der entweder mit einem Enzym oder einem radioaktiven Isotop konjugiert ist.

Der feste Träger besteht in den meisten Fällen aus dem eigentlichen Teströhrchen, aus Latex-Partikeln, Sephadex-Perlen, Glas-Perlen, Nitrocellulose-Blättern oder auch aus intakten Zellen und Geweben [K. Catt und G. W. Tregear, *Science* 158 (1967), 1570; H. Towbin und Mitarb., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76, (1979), 4350]. Das Antigen, das an diesen Träger gebunden werden soll, kann ein beliebiges Molekül, eine subzelluläre Struktur, eine Organelle, ein Enzym, ein Hormon, Lymphokine usw. sein, aber auch eine körpereigene Substanz. Selbst Antikörper können sich unter Umständen als Antigene verhalten. Der in der Probe enthaltene Antikörper ist eine Struktur, die es zu bestimmen gilt. Dieses Molekül kann sowohl in humanem oder tierischem Serum oder einer anderen Körperflüssigkeit als auch im Zellkulturüberstand vorhanden sein.

Die zweite komplementäre Struktur ist in den meisten Fällen ein Antikörper mit Spezifität für eine Struktur des in der Probe enthaltenen Antikörpers. An diese zweite komplementäre Struktur ist ein Enzym oder radioaktives Isotop gebunden; die Verbindung des Antikörpers und des Enzyms bzw. des radioaktiven Isotopes wird im folgenden Konjugat genannt. Zur Messung gelangen die Farbveränderungen nach Zugabe eines geeigneten Substrates bzw. der radioaktive Zerfall.

Daraus wurde in den letzten Jahren ein Verfahren entwickelt, welches in der Literatur als «Dot-Immunoassay» von Gordon bekannt ist [europäische Patentanmeldung 63 810; J. Gordon und M. Rosenthal, *J. Rheumatol.* 12 (1985), 257-264]. Nach diesem Verfahren werden die Antigensub-

stanzen in Form von kleinen Tröpfchen (0,5 µl) auf einen Nitrocellulosestreifen aufgetragen; die Auswertung der Ergebnisse wird mit Vorteil durch Densitometrie vorgenommen.

Überraschenderweise wurde nun ein Verfahren gefunden, durch welches neuartige Multiindikator-Teststreifen erhalten werden, welche von den den Streifen von Gordon innewohnenden Beschränkungen frei sind und die serienweise Durchführung von immunologischen Analysen auf besonders elegante und sichere Art ermöglichen. Insbesondere können dabei alle analytischen Schritte, unter gleichen Bedingungen für alle Antikörper-Antigen-Bindungen, gleichzeitig durchgeführt werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung der Multiindikator-Teststreifen ist dadurch gekennzeichnet, dass man je ein Blatt eines wasserunlöslichen, porösen, homogenen, adsorptionsfähigen, polymeren Materials in einer Lösung oder Suspension eines jeweils unterschiedlichen Antigens (oder einer jeweils unterschiedlichen, in einem lebenden Organismus als Antigen wirkenden Substanz) (A₁), (A₂), (A₃) usw. inkubieren lässt, die Blätter zur Blockierung von nicht besetzten Bindungsstellen in einer Lösung von für das Antigen oder die Substanz nicht spezifischen Proteinen inkubieren lässt und danach trocknet, jedes Blatt in parallele Bahnen schneidet und je eine Bahn eines jeden der Blätter auf einer Trägerfolie aus festem, zusammenhängendem, nicht brüchigem, für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutralem, nicht adsorbierendem Material derart befestigt, dass die Bahnen parallel nebeneinander liegen, und den entstandenen Bahnen-Trägerfolieverbund in parallele Streifen, quer zur Längsrichtung der zuvor befestigten Bahnen schneidet, so dass jeder Streifen in nebeneinander angeordneten, voneinander getrennten viereckigen Testflächen die Antigene (A₁), (A₂), (A₃) usw. trägt.

Erhalten werden also Multiindikator-Teststreifen, bestehend aus (a) für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutralen, nicht adsorbierenden Trägerstreifen aus festem, zusammenhängendem, nicht brüchigem Material, auf welchen (b) viereckige Testflächen aus wasserunlöslichem, porösem, homogenem, adsorptionsfähigem, polymerem Material, von der Breite der Trägerstreifen, in voneinander getrennter Anordnung nebeneinander befestigt sind, derart, dass an einem Ende der Streifen eine Grifffläche freigelassen ist, wobei besagte Testflächen jeweils (c) ein unterschiedliches Antigen (oder eine unterschiedliche, in einem lebenden Organismus als Antigen wirkende Substanz) (A₁), (A₂), (A₃) usw. in einheitlicher Verteilung tragen und die durch das Antigen (A₁), (A₂), (A₃) usw. nicht besetzten Bindungsstellen der Testflächen durch (d) für das Antigen oder die Substanz nicht spezifische Proteine blockiert sind.

Die neuen Teststreifen (mit den adsorbierten Antigenen oder in einem lebenden Organismus als Antigen wirkenden Substanzen (A₁), (A₂), (A₃) usw.) werden zur Identifizierung und Quantifizierung eines spezifischen Antikörpers (B) in einer zu untersuchenden biologischen Flüssigkeit verwendet, indem man besagten oder besagte Teststreifen in der zu untersuchenden, allenfalls den Antikörper (B) enthaltenden Flüssigkeit inkubieren lässt und danach von den nicht gebundenen Komponenten der Flüssigkeit durch Waschen befreit, den oder die Teststreifen in einer Lösung eines Konjugates (CD), welches aus einem für den in der Flüssigkeit zu bestimmenden Antikörper (B) komplementären Antikörper (C) und einem an letzteren kovalent gebundenen Enzym, radioaktiven Isotop, fluoreszierenden Mittel oder Färbemittel (D) besteht, inkubieren lässt und danach von dem nicht gebundenen Anteil des Konjugates (CD) durch Waschen befreit, und die Anwesenheit und Menge des Antikörpers (B) unter Ausnutzung der enzymatischen Reaktion, der Radioakti-

vität, der Fluoreszenz bzw. der Farbe der Komponente (D) des auf dem oder den Teststreifen gebildeten Stoffes (ABCD) bestimmt.

Im folgenden wird die Erfindung ausführlicher erläutert.

Das Blatt, das zur Aufnahme und Bindung der Antigene dient, kann ganz allgemein aus jedem geeigneten, d. h. wasserunlöslichen, porösen, homogenen, adsorptionsfähigen, polymeren Material bestehen. Es eignen sich dazu unter anderen, ohne dass diese Aufzählung abschliessenden Charakter haben soll: natürliche und chemisch abgewandelte Kohlehydrate, z. B. Cellulose, regenerierte Cellulose (Cellulose-Chemiefasern), Celluloseester, wie Celluloseacetat, Nitrocellulose usw., Celluloseether wie hochveretherte Methylcellulose, Ethylcellulose usw., vernetzte Dextran- und Stärkeprodukte, sodann vollsynthetische polymere Verbindungen, z. B. aus der Reihe der Polyvinylverbindungen wie Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol usw., aus der Reihe der Polyacrylverbindungen wie die Polyacrylate und Polymethacrylate, die Polyacrylamide usw., oder aus der Reihe der polymeren organischen Kondensationsprodukte, z. B. Polyamide, Polyurethane, Polyester, Polyepoxide usw.

Bevorzugt werden Blätter aus Nitrocellulose, deren natürliche Adsorptionsfähigkeit und Bindungsfähigkeit für Antigene den Zwecken der Erfindung durchaus genügen. Beispielsweise können Blätter aus Nitrocellulose vom Typus HAWG der Firma Millipore Corporation (Bedford, MA/USA) verwendet werden; es eignen sich unter anderen solche mit einer durchschnittlichen Porengrösse von 0,01 bis 10 µm, z. B. von 0,5 µm.

Die Trägerfolie, auf welcher die einzelnen Antigenbahnen gebunden werden, kann ganz allgemein aus jedem geeigneten, d. h. festen, zusammenhängenden, nichtbrüchigen Material, das zudem für die zu analysierende biologische Flüssigkeit neutral und nicht adsorbierend sein soll, bestehen. Es eignen sich dazu unter anderen Folien aus entsprechenden Kunststoffen, aus Glas, Porzellan, Holz und dergl. Bevorzugt werden dünne Folien aus nicht porösem Polyethylen oder Polypropylen.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird folgendermassen vorgegangen (Fig. 1):

1. Der feste Träger, am besten ein Nitrocellulose-Blatt der Firma Schleicher und Schuell GmbH (Dassel, BRD) von 21 × 21 cm, wird mit der Lösung oder Suspension der Antigen-substanz getränkt. Die Bindungskapazität des Trägers hängt von der Beschaffenheit der Antigen-substanz ab und liegt in der Grössenordnung von 100 µg/cm² und mehr. Die Lösung oder Suspension enthält die Antigen-substanz meist im Überschuss, so dass mehrere Nitrocellulose-Blätter in ein und derselben Lösung oder Suspension nacheinander behandelt werden können.

2. Das Nitrocellulose-Blatt wird nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden aus der Lösung oder Suspension der Antigen-substanz herausgenommen und in eine Lösung von Rinderserumalbumin oder Kaninchenserum eingetaucht, um die eventuell nicht besetzten Bindungsstellen zu blockieren. Danach wird das Blatt getrocknet.

3. Das Nitrocellulose-Blatt wird in ca. 3 mm breite Bahnen geschnitten. Aus einem Blatt erhält man ca. 60 Bahnen.

4. Die Schritte 1-3 werden mit weiteren Antigen-substanzen und jeweils einem neuen Nitrocellulose-Blatt wiederholt. Bindungsbedingungen, Temperatur und pH-Wert können der jeweiligen Antigen-substanz individuell angepasst werden.

5. Eine feste Kunststoffolie (beispielsweise aus Polypropylen, Hersteller: Papyrus AG, Basel) von 10 × 20 cm wird mit einem Doppelklebeband versehen, und je eine Bahn der

mit der Antigensubstanz behandelten Nitrocellulose-Blätter wird auf die Kunststoffolie aufgeklebt. Die Zwischenabstände der einzelnen Bahnen können frei gewählt werden; vorteilhaft ist jedoch eine enge Anordnung mit einem Abstand von ca. 1 mm.

6. Die auf solche Weise behandelte Kunststoffolie wird danach vertikal in einzelne Streifen geschnitten. Jeder Streifen (ca. 3–4 mm breit) enthält alle zuvor benutzten Antigensubstanzen. Auf das ganze Nitrocellulose-Blatt errechnet, ergibt dies 60 mit entsprechenden Bahnen beklebte Kunststoffolien und davon $60 \times 60 = 3600$ Teststreifen.

Ein typischer Teststreifen ist 8 cm lang, 3 mm breit und weist 10 Flächen von je 3×3 mm mit einem Zwischenabstand von jeweils 1 mm auf, wobei die untere Hälfte des Streifens alle 10 Teststreifen beherbergt und die obere Hälfte als Grifffläche dient.

Der Teststreifen wird für die immunologische Analyse (EIA) wie folgt verwendet:

- In die Testflüssigkeit wird ein Streifen eingetaucht und eine Stunde inkubieren gelassen.
- Nichtgebundene Komponenten der Testflüssigkeit werden durch Eintauchen des Streifens in mit Wasser oder einer Pufferlösung gefüllte Behälter entfernt.
- Der Streifen wird in ein Antikörper-Enzym-Konjugat eingetaucht und eine Stunde inkubieren gelassen.
- Der nichtgebundene Anteil des Konjugates wird durch Waschen des Streifens in einem mit Wasser oder einer Pufferlösung gefüllten Behälter entfernt.
- Der Streifen wird in eine Substratlösung eingetaucht. Nach dem Reaktionsablauf werden die Verfärbung (oder andere Veränderungen) der einzelnen Flächen des Streifens gemessen.

Beispielsweise wird jeder Teststreifen in ein Röhrchen mit verdünntem Serum (meistens Verdünnungen 1/100 bis 1/1000) eingetaucht und eine Stunde unter gelegentlicher Bewegung der Streifen inkubieren gelassen. Anschliessend wird der Streifen in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,5 (TBS-Puffer) gewaschen und in der Lösung eines Enzym-Antikörper-Konjugates (Verdünnung 1/1000) eine weitere Stunde inkubiert. Nach 15 Minuten Waschvorgang in TBS-Puffer wird der Streifen in ein für das Enzym spezifisches Substrat eingetaucht und nach 15 Minuten Reaktionsablauf gewaschen, getrocknet und ausgewertet.

Gegenüber dem bereits erwähnten sogenannten Dot-Immunoassay bzw. dem Verfahren nach Gordon zeichnen sich die erfindungsgemässen Teststreifen und ihre Verwendung durch folgende Vorteile aus:

1a) Die kleinen viereckigen Testflächen weisen eine grösstmögliche Homogenität auf und es kommen daher keine Randeffekte auf, wie dies bei dem Tröpfchen-Verfahren von Gordon der Fall sein kann.

b) Die auf den Streifen befestigten Testflächen sind zwar beispielsweise 3×3 mm gross, sie können aber durchaus auf eine Grösse von z. B. $0,3 \times 0,3$ mm miniaturisiert werden. Dem Gordon-Verfahren sind jedoch durch die Tröpfchenkoaleszenz in dieser Hinsicht Grenzen gesetzt.

c) Gemäss dem Gordon-Verfahren können zwar viele Tröpfchen nebeneinander aufgetragen werden, die Auftragsweise (Adsorption) jedoch muss für alle Tröpfchen gleich sein. Das Gordon-Verfahren ist also nicht angezeigt in Fällen, in welchen ein Antigen (z. B. doppelstrangige DNS) das Zustandekommen einer kovalenten Bindung erfordert. Bei Anwendung hoher «Einbacktemperaturen» müssen alle Tröpfchen das gleiche Verfahren unterlaufen, während bei dem neuen Verfahren jedes Blatt individuell und beliebig behandelt werden kann. Ein Antigen mit geringer Bindungs-

fähigkeit kann in diesem Verfahren durch wiederholte Tränkung eine verbesserte Gesamtbindung erreichen. Mit dem Dot-Immunoassay ist dies schwierig zu bewerkstelligen.

2. Der Vorteil der neuen Teststreifen bei ihrer Verwendung für die eigentliche Analyse besteht darin, dass sie aus einem relativ steifen Material bestehen und somit mühelos zu handhaben sind; am einen Ende kann man den Streifen anfassen, mit einem Code versehen, beschriften und beliebig manipulieren. Die Teststreifen können in Röhrchen eingetaucht, einzelne Streifen oder Gruppen von Streifen von Hand oder mittels eines «Kamms» aus der Lösung (Röhrchen oder anderen Behältern) herausgenommen, unter dem Wasserstrahl oder durch Eintauchen in eine Waschflüssigkeit gewaschen werden usw. Die für das Dot-Immunoassay zu verwendenden Streifen hingegen werden in horizontalen Behältern inkubiert; die einzelnen Streifen müssen mit einer Pinzette oder einer anderen Vorrichtung angefasst werden; die Waschvorgänge sind dementsprechend kompliziert und umständlich.

3. Bei der Auswertung mit blossen Auge sind beide Verfahren, d. h. das Dot-Immunoassay und das vorliegende Verfahren, gleichwertig. Bei der Auswertung durch Densitometrie hingegen ist die Ausrichtung des Messungsstrahls im neuen System problemlos, da eine einheitliche Verteilung des Antigens auf der ganzen Breite des Streifens gewährleistet ist. Bei dem Dot-Immunoassay von Gordon muss der Messungsstrahl genau durch die Mitte des Tupfens gehen oder aber den ganzen Tupfen erfassen und integrieren, ansonsten die Messung fehlerhaft ist.

Darüberhinaus besteht nun die Möglichkeit, neue Antigene, die sich noch in der Erforschungsphase befinden, neben den bereits bekannten Antigenen in die Analyse miteinzubeziehen und dadurch eine höhere Zuverlässigkeit der Aussage zu erreichen.

Betrachtet man abschliessend die Herstellung der Teststreifen und ihre Verwendung mitsamt der anschliessenden Auswertung der Ergebnisse, so hat die Erfindung insgesamt im Vergleich mit den herkömmlichen Methoden eine nicht zu erwartende, drastische Vereinfachung aller massgeblichen Schritte mit sich gebracht. Zum ersten Mal eröffnet sich dadurch eine praktische Möglichkeit, aus einer Sammlung vorgefertigter Antigenbahnen Teststreifen von jeder beliebigen Antigenzusammensetzung für einzelne Patientengruppen oder spezielle Bedingungen (Epidemien, geo-spezifische Gegebenheiten) sofort und auf einfache Art anzufertigen.

Beispiel 1

10 Nitrocellulose-Blätter von 21×21 cm werden in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,5 (TBS-Puffer) eingetaucht. Gleichzeitig werden in 10 Kunststoffbehälter von 23×23 cm je 50 ml der folgenden Antigenlösungen mit einer Pipette gegeben: (a) Kaninchen-Immunglobulin, (b) Lysat von HeLa-Zellen, (c) Nuklearantigen, (d) Lachs-DNS, (e) Mitochondrien, (f) Streptolysin O, (g) Histon, (h) einstrangiges DNS, (i) normales Kaninchenserum, (j) Kontroll-TBS-Puffer.

Jedes einzelne der befeuchteten Nitrocellulose-Blätter wird in einen der Kunststoffbehälter (a) bis (j) eingelegt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Nitrocellulose-Blätter (a) bis (h) werden anschliessend (gewünschtenfalls nach Trocknung) in 3%iges normales Kaninchenserum eingetaucht, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Nitrocellulose-Blatt (i) wird im ursprünglichen Behälter belassen. Blatt (j) kommt mit dem Kaninchenserum nicht in Kontakt und dient als nicht-blockierte Kontrolle. Nach 30 Minuten werden alle Blätter aus den Lösungen genommen

und luftgetrocknet. Blatt (d) wird in einem Heissluftschrank bei 80 °C getrocknet.

60 Polypropylenfolien von 10 × 20 cm werden mit doppelseitigem Klebeband 665 (Hersteller: Minnesota Mining and Manufacturing Co., St. Paul, MN/USA) versehen. Die beklebte Fläche entspricht 4 × 20 cm. Jedes der 10 Nitrocellulose-Blätter wird mit einer Präzisionsschneidemaschine in 3 mm breite Bahnen geschnitten. Aus jedem der 10 Nitrocellulose-Blätter erhält man auf diese Weise 60 Bahnen. In der Reihenfolge (a) bis (j) werden die einzelnen Bahnen auf die Polypropylenfolie aufgeklebt. Die so erstellten Folienmatrizen werden sodann vertikal in 3 mm breite Streifen geschnitten (Abb.3). Auf diese Weise erhält man 3600 Teststreifen.

Beispiel 2

Das Verfahren bis zur Herstellung der Streifen ist jenem von Beispiel 1 identisch. Je 12 fertige Streifen werden in Form eines Kamms zusammengefasst und auf eine Pappunterlage aufgeklebt (Abb. 4), so dass 12 Proben parallel und gleichzeitig analysiert werden können.

Beispiel 3

Der Ablauf des Verfahrens ist jenem von Beispiel 1 identisch. Die Antigensubstanzen sind jedoch folgende Moleküle: (a) Antikörper gegen Maus- μ -Kette, (b) Antikörper gegen Maus- γ_1 -Kette, (c) Antikörper gegen Maus- γ_{2a} -Kette, (d) Antikörper gegen Maus- γ_{2b} -Kette, (e) Antikörper gegen Maus- λ -Kette, (f) Antikörper gegen Maus- κ -Kette. Alle diese Antikörper wurden in Ratten produziert. Für die Bestimmung des Immunglobulinisotyps wurden die Teststreifen in Hybridom-Zellkulturen [G. Köhler und C. Milstein, Nature (London) 56 (1975), 495] und für dessen Bestimmung in kleinen Volumen miniaturisierte Streifen verwendet. Die Miniaturisierung besteht darin, einerseits Bahnen von 1,5 mm Breite und ausserdem zwei Folien verschiedener Farbe Rücken an Rücken aufzukleben, um auf diese Weise beide Seiten des Streifens für die Analyse verwenden zu können. Die verschiedene Folienfarbe dient als Farbcode. Als Streifenbreite wurde 1,5 mm gewählt.

Beispiel 4

Vier Röhrchen (Innendurchmesser 7 mm) werden mit je 2 ml TBS (Tris-gepufferte isotonische Salzlösung, pH 7,5), enthaltend 3% Kaninchenserum, gefüllt. Zu zwei Röhrchen werden je 20 μ l und zu den anderen zwei Röhrchen je 2 μ l Testserum zugegeben. Je ein Teststreifen wird in ein Röhrchen eingetaucht und 1 Stunde bei Zimmertemperatur unter gelegentlicher Bewegung inkubieren gelassen. Anschliessend werden die Streifen aus den Röhrchen herausgenommen und 15 Minuten in Überschuss TBS (Becherinhalt 100 ml) gewaschen. Inzwischen werden vier Röhrchen mit Konjugatlösung (in Kaninchen produzierte Antikörper mit einer Spezifität gegen menschliche Immunglobuline, mit Peroxidase gekoppelt, im Handel von Dakopatts, Kopenhagen/Dänemark, erhältlich) vorbereitet. Zwei der Röhrchen werden mit einer Verdünnung (in TBS + 3% Kaninchenserum) 1/100 und die anderen zwei mit 1/1000 versehen (je 2 ml). Die gewaschenen Streifen werden nach folgendem Schema in die Konjugatlösungen eingetaucht: Serum 1/100, Konjugat 1/100; Serum 1/100, Konjugat 1/1000; Serum 1/1000, Konjugat 1/100; Serum 1/1000, Konjugat 1/1000. Nach 45 Minuten werden die Streifen aus der Konjugatlösung herausgenommen und der nichtgebundene Anteil des Konjugats in Überschuss TBS gewaschen (Becherinhalt 100 ml). Inzwischen werden vier Röhrchen mit Substratlösung vorbereitet. Für 10 ml Substratlösung werden 0,6 ml 4-Chlornaphthol-Stocklösung (die Stocklösung beinhaltet 3 mg 4-Chlornaphthol in 1 ml Methanol) und 4 μ l H₂O₂ (30%)

zu 9,4 ml TBS zugegeben. Je 2 ml Substrat werden in jedes Röhrchen pipettiert, und je ein Streifen in deren Inhalt eingetaucht. Nach 15 Minuten werden die Streifen aus dem Röhrchen entfernt und in destilliertem Wasser gewaschen.

Die Farbreaktion wird entweder mit dem blossen Auge oder mit dem Densitometer abgelesen. Eine blaugefärbte Fläche gibt eine positive Reaktion an. In der Regel werden sich nur einige der Flächen färben. Diese sind dann für den entsprechenden Antikörper positiv.

Beispiel 5

Ein Test mit neun Seren und einer negativen Kontrolle wurde durchgeführt. Die negative Kontrolle besteht aus 3% Kaninchenserum, und die eventuelle Färbung einzelner Flächen des Streifens gibt Auskunft über eine unspezifische Bindung des Konjugats. Von den neun Seren waren drei positive Kontrollen. Unter positiver Kontrolle versteht man Seren, in welchen Antikörper im voraus nach einer anderen Methode nachgewiesen worden sind. In diesem Falle handelte es sich um ein Serum, das positiv für anti-DNS-Antikörper war, ein anderes Serum war positiv für Streptolysin-Antikörper und das dritte Serum positiv für den Rheumafaktor. Sechs Seren waren vorher nicht-analytierte Patientenserum, in welchen eine unabhängige Bestimmung der Antikörper erst nach der Analyse mit dem Teststreifen erfolgte, um die Korrelation zwischen dem neuen Multiindikator-Teststreifen und bisherigen Tests festzustellen. Die Vergleichstests waren der Crithidia-Test für die anti-DNS-Antikörper [L. A. Aarden und R. Smeenk, Immunological Methods, Herausgeber I. Lerkovits und B. Pernis, Bd. 2, Seite 75 (1981)], der Hämolyse-inhibition-Test für die Streptolysin-Antikörper [K. Kalbak, Acta Med. Scand. 130 (1984), 358] und ein Enzymimmunoassay in Mikrotiterplatten für den Rheumafaktor [A. Faith und Mitarb., J. Immunol. Methods 55 (1982), 169].

Für den vorliegenden Test wurden zwei Serumverdünnungen (1/100, 1/1000) und zwei Konjugatverdünnungen (1/100, 1/1000) verwendet. Nach der Durchführung des Tests wurden alle vier Streifen in Betracht gezogen, um falsch positive und falsch negative Aussagen zu vermeiden.

Falsch positiv ist der Test, wenn die Färbung durch eine unspezifische Bindung erzeugt wird; dies kann unter Umständen entweder bei zu hoher Konzentration an irrelevanten Serumproteinen oder bei zu hoher Konzentration an Konjugat vorkommen. Falsch negativ ist der Test, wenn die zu erfolgende Färbung wegen zu hoher Verdünnung der spezifischen Serumkomponenten oder aber des Konjugats nicht eintritt.

Die Ergebnisse des obenbeschriebenen Tests lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

- a) Die drei positiven Kontrollen waren positiv für entsprechende Reaktionen auch im Multiindikator-Teststreifen.
- b) Bei den sechs unbekanntem Seren erzielte man folgende Ergebnisse:

Serum 1: positiv für Streptolysin,
 Serum 2: positiv für Streptolysin,
 Serum 3: negativ für alle getesteten Antigene,
 Serum 4: positiv für den Rheumafaktor,
 Serum 5: negativ für alle getesteten Antigene,
 Serum 6: positiv für Streptolysin, den Rheumafaktor und anti-DNS.

Alle sechs Seren wurden ausserdem auch durch die oben erwähnten Standardverfahren analysiert und es wurden identische Aussagen wie mit dem Multiindikator-Teststreifen erzielt. Die Korrelation zwischen den bisherigen Methoden und dem neuen Test ist also zufriedenstellend.

- c) Die negative Kontrolle (Kaninchenserum) gab negative Ergebnisse für alle Antigene.