

(19)



(10) **LT 2000 071 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2000 071**

(51) Int. Cl. (2006): **G01N 33/543**

(22) Paraiškos padavimo data: **2000 07 18**

G01N 33/48

G01N 33/558

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 11 27**

G01N 33/569

G01N 33/571

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

G01N 33/576

G01N 30/00

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/27802**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 12 29**

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2000 07 18**

(30) Prioritetas: **007651, 1998 01 15, US**

(71) Pareiškėjas:

ABBOTT LABORATORIES, Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500, US

(72) Išradėjas:

**Toru YOSHIMURA, JP
Toshihiro OGASAWARA, JP
Michihiro SAITO, JP
John P. GROFF, US**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

—

(54) Pavadinimas:

Polikatijonų neutralizavimas chromatografijos įtaise, skirtame neapdorotam kraujui analizuoti

(57) Referatas:

Pateikiamas chromatografinio testavimo įtaisas ir būdas, skirtas neapdoroto kraujo mėginiams analizuoti, panaudojant eritrocitus atskiriantį agentą eritrocitams agreguoti ir leisti plazmai arba serumui slinkti dėl kapiliarinio poveikio ir neutralizavimo agentą bet kokiems poveikiams, kuriuos gali turėti eritrocitus atskiriantis agentas į įtaisą ir būdą, neutralizuoti.

POLIKATIJONŲ NEUTRALIZAVIMAS CHROMATOGRAFIJOS ĮTAISE SKIRTAME NEAPDOROTAM KRAUJUI ANALIZUOTI

Išradimo technikos sritis

Šis išradimas yra susijęs su chromatografinio testavimo įtaisais ir analitės nustatymo būdu neapdoroto kraujo mėginyje, o konkrečiau su įtaisu ir būdu, naudojant eritrocitus atskiriantį agentą eritrocitams agreguoti ir neutralizavimo agentą bet kokiems neigiamiems efektams, kuriuos gali duoti eritrocitus atskiriantis agentas į testavimo sistemą, pašalinti.

Ankstesnis technikos lygis

Modernūs klinikinės diagnostikos metodai yra paprastai atliekami imant kraujo mėginius. Deja, eritrocitai trukdo daugeliui diagnostinių nustatymų. Nustatant analizę, eritrocitai gali inhibuoti surišimą tarp specifiskai susirišančių poros narių. Be to, eritrocitai pasižymi fermentiniu aktyvumu, kuris, priklausomai nuo naudojamo testo, gali trukdyti signalo gavimui. Dar daugiau, greitame teste, kuriame naudojamas chromatografinio testavimo įtaisas, ypačingai chromatografinio imunotestavimo įtaisas, eritrocitai gali trukdyti skysčio slinkimui, kurio reikia, kad įtaise vyktų reakcijos. Dėl šių ir kitų priežasčių daugelis tyrimų atliekami su plazma arba serumu, kurie turi būti pirmiausia išskiriami iš kraujo mėginio.

Eritrocitų atskyrimui nuo plazmos iš kraujo mėginio yra žinoma daug metodikų. Gerai žinomas šioje srityje būdas yra centrifugavimas, kuriame plazma (prieš sukrešėjimą) ir serumas (po sukrešėjimo) yra išskiriami iš kraujo. Šioje procedūroje eritrocitai nusėda ant mėgintuvėlio dugno, o serumas yra atskiriamas nudekantuoju arba koku nors kitu būdu. Tačiau toks kraujo sluoksniavimas centrifugavimo būdu turi daug nepatogumų. Bendrai paėmus, centrifugavimas reikalauja, kad būtų imami dideli kraujo mėginiai. Be to, šis būdas užima daug laiko ir reikalauja gremėzdiškos

laboratorinės įrangos, dažniausiai nesančios gydymo įstaigoje. Pagaliau papildomos manipuliacijos su krauju didina sąlyčio su kraujo kilmės patogenais riziką.

Norint sumažinti arba pašalinti centrifugavimo poreikį, buvo sukurti testavimo įtaisai, kuriuose naudojamos gradientinės membranos arba sulaikančios membranos atskirti eritocitams nuo skystosios kraujo dalies. Taip pat buvo naudojami imobilizuoti anti-eritocitiniai antikūnai.

Kitos žinomos metodikos eritrocitams atskirti nuo plazmos arba serumo yra: (1) kraujo mėginio sumaišymas su eritocitus surišančiu agentu, mišinio nufiltravimas per kietą drėgmę sugeriantį elementą, prie kurio yra prijungtas bent vienas specifiškai surišančios poros narys sulipusiems eritrocitams pašalinti; (2) kraujo perleidimas per stiklinį mikropluoštinį filtrą, kuriame gali būti arba nebūti įterptas sulipinantis agentas; (3) panaudojimas barjero arba išskiriančio sluoksnio iš polisacharidinės medžiagos, kad eritrocitai nepatektų ir netrukdytų signalo detektavimui arba vizualizavimui ant sausos testavimo justelės; ir (4) naudojimas pagrindo, turinčio polikatijoninį paviršių, kuris suriša eritocitus, bet nesurیشa plazmos.

Dauguma iš šių eritocitų atskyrimo nuo plazmos metodikų yra brangiai kainuojančios, komplikotos, gali nepilnai atskirti eritrocitus ir gali sukelti hemolizę. Hemolizė duoda nespecifinį surišimą arba didelius fonus, sukeliančius testo jautrumo sumažėjimą. Tai gali būti dėl laisvo hemoglobino, kuris nuspalvina detektavimo zoną taip, kad ši zona gali įgyti spalvą nuo rožinės iki tamsiai kaštoninės. Dėl šios priežasties hemoglobino spalvos buvimas detektavimo zonoje gali visiškai arba dalinai nustelbti vizualinį cheminį signalą. Be to, atskiriančio agento, tokio kaip polikatijonas, panaudojimas testavimo sistemoje linkęs trukdyti sistemai, apart eritocitų, dažniausiai dėl kitų reagentų arba rišiklių agregacijos.

Taigi, egzistuoja poreikis sukurti prietaisą ir būdą analitei nustatyti kraujo mėginyje nepaveikiant nepalankiai testavimo sistemos. Toks prietaisas ir būdas turėtų būti tinkamas įvairaus dydžio neapdoroto kraujo mėginiams, įskaitant mažus mėginius.

Išradimo santrauka

Šis išradimas yra susijęs su chromatografiniu įtaisu, apimančiu apibrėžiantį skysčio kelią chromatografinį nešiklį, galintį palaikyti kapiliarinį tekėjimą, minėto kraujo mėginio uždėjimo vietą skysčio kelyje, duodančią sąlytį su chromatografiniu nešikliu, detektavimo vietą ant chromatografinio nešiklio, esančią toliau nuo uždėjimo vietos, difuziškai prijungtą žymėtą medžiagą, esančią pasroviui nuo uždėjimo vietos, difuziškai prijungtą eritrocitus atskiriantį agentą plazmos arba serumo išskyrimui iš kraujo mėginio, esantį prieš srovę nuo detektavimo vietos, ir difuziškai prijungtą neutralizuojantį agentą, galintį susijungti su atskiriančiu agentu, esantį pasroviui nuo prijungto atskiriančio agento ir prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos, tokiu būdu neutralizuojant minėto atskiriančio agento teigiamą krūvį. Pageidautina, kad eritrocitus atskiriantis agentas būtų prie uždėjimo vietos taip, kad eritrocitai būtų atskiriami nuo serumo arba plazmos prieš pradedant serumui arba plazmai slinkti chromatografiniu nešikliu.

Šis išradimas taip pat yra skirtas analitės buvimo mėginyje, pageidautina kraujo mėginyje, nustatymo būdui, kuris apima pateikimą apibrėžiančio skysčio kelią chromatografinio nešiklio, galinčio palaikyti kapiliarinį tekėjimą, kuriame yra išdėstyta (a) minėto kraujo mėginio uždėjimo vieta skysčio kelyje, duodanti sąlytį su minėtu chromatografiniu nešikliu, (b) detektavimo vieta ant chromatografinio nešiklio, esanti toliau nuo uždėjimo vietos, (c) difuziškai prijungta žymėta medžiaga, esanti pasroviui nuo uždėjimo vietos, (d) difuziškai prijungtas eritrocitus atskiriantis agentas plazmos arba serumo išskyrimui iš kraujo mėginio, esantis prieš srovę nuo detektavimo vietos, ir (e) difuziškai prijungtas neutralizuojantis agentas, galintis susijungti su atskiriančiu agentu, esantis pasroviui nuo prijungto atskiriančio agento ir prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos, tokiu būdu neutralizuojant minėto atskiriančio agento teigiamą krūvį; uždėjimo vietos ir kraujo mėginio suleidimą į sąlytį taip, kad eritrocitus atskiriantis agentas išskiria plazmą arba serumą iš kraujo mėginio, o neutralizuojantis agentas

neutralizuoja atskiriančio agento teigiamą krūvį, kai mėginys slenka srauto keliu; ir analizės nustatymą kraujo mėginyje.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1 pavaizduotas ši išradimo chromatografinio testavimo įtaiso tinkamiausias įgyvendinimo variantas.

Smulkus išradimo aprašymas

Šis išradimas yra paremtas pastebėjimu, kad eritrocitai neapdoroto kraujo mėginiuose trukdo nustatyti analizės buvimą arba jos kiekį kraujo mėginyje, ką kitu atveju labai nesunku padaryti panaudojant testavimo sistemas. Pavyzdžiui, imunotestavimo atveju mažai tikėtina, kad neapdoroto kraujo mėginys, suleistas į sąlytį su uždėjimo vieta, slinks juostelė dėka kapiliarinio poveikio, nes tam trukdo eritrocitų buvimas. Šiame išradime tokia problema yra įveikiama nepažeidžiant testo sistemos jautrumo.

Toliau duodami apibrėžimai gali būti naudingi šio išradimo įgyvendinimo variantams suprasti.

“Analitė” arba “dominanti analitė” reiškia norimą nustatyti arba išmatuoti junginį arba kompoziciją, kurie turi bent vieną epitopą arba rišančią vietą. Analitė gali būti bet kokia medžiaga, kuriai yra gamtoje esantis analitę specifiskai surišantis narys arba kuriai gali būti pagamintas analitę specifiskai surišantis narys. Analitėmis yra, bet jomis neapsiribojama, toksinai, organiniai junginiai, baltymai, peptidai, mikroorganizmai, aminorūgštys, nukleorūgštys, hormonai, steroidai, vitaminai, vaistai (įskaitant vartojamus terapiniams tikslams bei vartojamus uždraustiems tikslams) ir bet kurios iš aukščiau minėtų medžiagų metabolitai arba antikūnai prieš šias medžiagas. Terminas “analitė” taip pat apima bet kokias antigenines medžiagas, haptenus, antikūnus, makromolekules ir jų derinius.

“Chromatografinis nešiklis” reiškia bet kokią tinkamą porėtą, absorbuojančią, drėgmę sugeriančią, izotropinę arba kapiliarinę medžiagą,

kurioje yra įtaiso detektavimo vieta ir per kurią gali judėti analitė arba tiriamasis mėginys dėl kapiliarinio arba įsiurbiančio poveikio. Specialistams bus suprantama, kad chromatografinis nešiklis gali būti padarytas iš vienos medžiagos arba daugiau nei vienos medžiagos (pvz., skirtingos zonos, dalys, sluoksniai, plotai arba vietos gali būti padarytos iš skirtingų medžiagų) taip, kad įvairiarūšiai sluoksniai užtikrina tiriamojo mėginio perėjimą iš vienos medžiagos į kitą. Tekančių skysčių sąlytis leidžia pereiti mažiausiai kelioms mėginio komponentams, t.y. analitei, tarp poringos medžiagos zonų ir geriausia, kai šis perėjimas yra vienodas per sąlyčio tarp įvairių zonų ribą. Chromatografiniais nešikliais gali būti naudojamos gamtinės, sintetinės arba gamtinės sintetiškai modifikuotos medžiagos; jie apima, jais neapsiribojant, popierių (pluoštinį) arba celiuliozinių medžiagų, kaip antai popieriaus, membranas (mikroporines); celiuliozę ir celiuliozės darinius, tokius kaip celiuliozės acetatas ir nitroceliuliozė; stiklo pluoštą; kaip natūralų (pvz. medvilnę), taip ir sintetinį (pvz. nailoną) audinį; poringus gelius; ir pan.

“Žymė” reiškia bet kokią medžiagą, kuri gali duoti signalą, nustatomą vizualiniais arba instrumentiniais būdais. Įvairios žymės, tinkamos naudoti šiame išradime, apima žymes, kurios duoda signalus arba cheminiais, arba fizikiniais būdais. Jų pavyzdžiais yra fermentai ir substratai, chromagenai, fluorescuojantys junginiai, chemiluminescuojantys junginiai, spalvotos arba nudažomos organinio polimero latekso dalelės ir liposomos arba kitos pūslelės, turinčios tiesiogiai matomų medžiagų. Geriausia šiame išradime naudoti radioaktyvias žymes, metalų koloidines daleles arba nemetalų koloidines daleles. Tinkamiausios žymės yra koloidinio aukso ir latekso dalelės.

“Žymėtoji medžiaga” arba “konjugatas” reiškia medžiagą, kurioje yra detektuojama žymė, prijungta prie specifiskai surišančio nario. Prijungimas gali būti kovalentinis arba nekovalentinis ryšys, o taip pat gali būti nukleorūgščių hibridizacija. Žymė suteikia žymėjimui medžiagai galimybę duoti signalą, kuris yra tiesiogiai arba netiesiogiai susijęs su analitės kiekiu tiriamajame mėginyje. Žymėtosios medžiagos specifiskai surišančio nario

komponentas yra parinktas taip, kad jis tiesiogiai arba netiesiogiai susijungtų su analite.

“Specifiškai surišantis narys” reiškia specifiškai susirišančios poros, t.y. dviejų skirtingų molekulių, kur viena iš molekulių specifiškai rišasi su antrąja molekule cheminiais arba fizikiniais būdais, narij. Jeigu specifiškai surišantis narys yra imunoreagentas, jis gali būti, pavyzdžiui, antikūnas, antigenas, haptenas arba jo kompleksas, ir jeigu yra naudojamas antikūnas, jis gali būti monokloninis arba polikloninis antikūnas, rekombinantinis baltymas arba antikūnas, chimerinis antikūnas, jų mišinys(-ai) arba fragmentas(-ai), o taip pat antikūno ir kitų specifiškai surišančių narių mišinys. Konkrečiais specifiškai surišančių narių pavyzdžiais yra biotinas ir avidinas, antikūnas ir jį atitinkantis antigenas (abu neturintys ryšio su tiriamu mėginiu), viengrandė nukleorūgštis ir jos komplementas ir pan.

“Sulaikanti medžiaga” reiškia vieną arba daugiau specifiškai surišančių narių, prijungtų viduje arba ant chromatografinio nešiklio dalies, sudarant vieną arba daugiau “sulaikymo vietų”, kur analizė, žymėtasis reagentas ir/arba kontrolinis reagentas imobilizuojasi ant chromatografinio nešiklio. Prijungimo būdas nėra labai svarbus šiame išradime. Sulaikanti medžiaga palengvina detektuojamo signalo stebėjimą, atskirdama analizę ir/arba žymėtąją medžiagą nuo nesujungtų testavimo reagentų ir likusių tiriamojo mėginio komponentų. Sulaikanti medžiaga gali būti imobilizuota ant chromatografinio nešiklio prieš bandymo atlikimą arba atliekant bandymą, panaudojant bet kokį tinkamą prijungimo būdą. Be to, sulaikanti medžiaga gali būti pateikiama vienoje detektavimo vietoje arba keliose vietose ant chromatografinio nešiklio arba jo viduje. Sulaikanti medžiaga gali būti pateikiama įvairiausiomis konfigūracijomis, gaunant įvairius detektavimo arba matavimo formatus. Pavyzdžiui, sulaikanti medžiaga gali būti raidės, skaičiaus, ženklų, simbolio arba bet kokio jų derinio konfigūracijos.

Konkrečiau kalbant, šiame išradime pateikiamas chromatografinio testavimo įtaisas analizės buvimo nustatymui mėginyje, pageidautina kraujo mėginyje. Geriausia, kad įtaisas būtų chromatografinės juostelės formos, turinčios chromatografinį nešiklį, kuris apibrėžia skysčio judėjimo kelią ir gali

palaikyti kapiliarinį tekėjimą, kraujo mėginio uždėjimo vietą ir detektavimo vietą, nutolusią nuo uždėjimo vietos, analitės buvimui arba jos kiekiui kraujo mėginyje nustatyti. Pageidautina, kad įtaise taip pat būtų žymėtoji medžiaga (arba konjugatas), difuziškai prijungta prie chromatografinio nešiklio. Tinkamiausiame įgyvendinimo variante žymėtoji medžiaga prisijungs prie analitės arba konkuruos su analite dėl prisijungimo detektavimo vietoje. Pageidautina, kad įtaise būtų du papildomi agentai, difuziškai prijungti prie chromatografinio nešiklio: (1) eritrocitus atskiriantis agentas, esantis prieš srovę (čia ir toliau kapiliarinio poveikio sukulto mėginio judėjimo kryptis yra vadinama "pasroviui", o priešinga kryptis vadinama "prieš srovę") nuo detektavimo vietos, kuris gali išskirti plazmą arba serumą iš kraujo mėginio, ir (2) neutralizuojantis agentas, esantis pasroviui nuo eritrocitus atskiriančio agento ir prieš srovę nuo detektavimo vietos, kad būtų neutralizuojamas bet koks, ypatingai nepalankus, eritrocitus atskiriančio agento efektas į chromatografijos sistemą.

Šio išradimo kontekste terminas "difuziškai prijungtas", taikomas duotam reagentui, gali būti apibrėžiamas kaip bet koks šiame išradime naudojamas reagentas, įskaitant (bet neapsiribojant) žymėtąją medžiagą, specifiškai surišantį narį, eritrocitus atskiriantį agentą arba neutralizavimo agentą, ir reiškia, kad reagentas(-ai) yra prijungti tokiu būdu, kuris leidžia prijungtam(-iems) reagentui(-ams) judėti pagal srovę.

Šio išradimo tikslams gali būti naudojama bet kokia testavimo sistema. Tinkamiausios yra imunotestavimo sistemos, įskaitant (bet neapsiribojant) šoninio srauto sistemas, vertikalaus srauto sistemas, įsisiurbimo sistemas ir įmerkiamus strypelius. Toliau duodamas žinomų testavimo sistemų bendras aprašymas.

Paprastai chromatografinėje juostelėje ant chromatografinio nešiklio yra apibrėžta bent jau mėginio uždėjimo vieta ir detektavimo vieta. Mėginio tirpalas, šiuo atveju pageidautina, kad tai būtų kraujo mėginys, kuriame galima įtarti, kad yra dominanti analizė, uždėjus jį ant uždėjimo vietos, slenka chromatografiniu nešikliu dėl kapiliarinio poveikio, o žymėtoji medžiaga arba konjugatas, kuris yra laikomas žymėjimo priemonėse, išdėstytose ant

chromatografinio nešiklio iš anksto, yra sukaupti detektavimo vietoje tiesiogine arba atvirkštine proporcija nustatomos medžiagos buvimui arba kiekiui mėginio tirpale, kurį veikia surišimo reakcija (tokia kaip imunologinė reakcija), taip, kad mėginio tirpale nustatomos medžiagos buvimas arba kiekis gali būti nustatomas matuojant tokiu būdu susikaupusios žymėtosios medžiagos arba konjugato buvimą arba kiekį. Yra žinomi įvairūs chromatografinių juostelių tipai, ir visos šios žinomos chromatografinės juostelės, įskaitas tas, kurios bus aprašytos vėliau, gali būti naudojamos šiame išradime. Čia naudojamas terminas "chromatografinio testavimo įtaisas" reiškia chromatografinę juostelę, kuri yra pagaminta taip, kad ji gali būti naudojama testavimui ir gali būti laikoma bei transportuojama.

Toliau aprašomas tipiškas chromatografinės juostelės pavyzdys. Mėginio uždėjimo vieta gali būti toje pačioje vietoje, kurioje yra žymėtoji medžiaga, bet geriau, kai ji yra prieš srovę nuo žymėtosios medžiagos. Kai mėginio tirpalas, kuriame įtariama, kad gali būti analizės, suleidžiamas į sąlytį su mėginio uždėjimo vieta, mėginio tirpalas slenka chromatografiniu nešikliu kartu su analite dėl kapiliarinių jėgų veikimo. Paprastai analizė yra junginys, kuris susiriša specifiniu būdu su sulaikančia medžiaga, fiksuota detektavimo vietoje, arba ji yra junginys, kuris susiriša specifiniu būdu su konjugatu, kuris specifiškai susiriša su sulaikančia medžiaga detektavimo vietoje. Pavyzdžiui, analizė yra antikūnas, kai sulaikanti medžiaga yra antigenas arba konjugatas turintis antigeną, ir analizė yra antigenas, kai sulaikanti medžiaga yra antikūnas arba konjugatas turintis antikūną. Dar kitas pavyzdys: analite gali būti nukleorūgštis, kuri jungiasi prie komplementaraus konjugato ir rišančios medžiagos.

Kai mėginio uždėjimo vieta yra prieš srovę nuo žymėtosios medžiagos, žymėtoji medžiaga gali būti greta mėginio uždėjimo vietos arba padėtyje, nutolusioje nuo mėginio uždėjimo vietos.

Žymėtąją medžiagą galima pridėti įvairiais būdais, pavyzdžiui, padedant ją į tam tikrą padėtį už chromatografinės juostelės detektavimo vietos ribų po mėginio tirpalo pridėjimo.

Kadangi žymėtoji medžiaga yra tokia, kuri juda dėl mėginio tirpalo kapiliarinio poveikio, žymėtoji medžiaga juda pasroviui, kai į mėginio pridėjimo priemonės pridėdama mėginio tirpalo.

Detektavimo vieta paprastai yra pasroviui nuo žymėtosios medžiagos ir tam tikru atstumu nutolusi nuo žymėtosios medžiagos. Detektavimo vietoje prie chromatografinio nešiklio yra prijungta sulaikanti medžiaga, kuri specifiniu būdu susijungia tik su analite arba konjugatu, arba specifiškai susijungia su kiekviena iš nustatomų medžiagų ir žymėtąją medžiagą. Dėl šios priežasties viename įgyvendinimo variante analizė (kartais prijungta prie žymėtosios medžiagos), stumiama mėginio tirpalo kapiliarinio poveikio, susiriša su sulaikančia medžiaga arba su konjugatu, kuris savo ruožtu susiriša su sulaikančia medžiaga. Žymėtoji medžiaga prisijungia prie tokiu būdu prijungtos nustatomos medžiagos, ir taip sukaupiama žymėtoji medžiaga detektavimo priemonėse, gaunant atsaką į analizės buvimą arba kiekį. Kitu atveju žymėtoji medžiaga ir analizė, stumiamos kapiliarinio poveikio, prisijungia konkurentiškai prie sulaikančios medžiagos, tokiu būdu veikdamos žymėtosios medžiagos susikaupimą atvirkštine proporcija nustatomos medžiagos kiekiui.

Būna atveju, kai tam tikra žymėtoji medžiaga susijungia ir su sulaikančia medžiaga (arba konjugatu, kuris savo ruožtu susijungia su sulaikančia medžiaga), ir su analite, bet ne vienu metu, ir tokiu atveju pirmiausia prie žymėtosios medžiagos prisijungia analizė, o likusi žymėtoji medžiaga, kuri neprisijungė prie nustatomos medžiagos, prisijungia prie sulaikančios medžiagos. Tada analizės buvimas arba kiekis gali būti nustatomas matuojant susikaupusią žymėtąją medžiagą detektavimo priemonėse.

Jeigu yra reikalas, prieš srovę nuo detektavimo vietos yra išdėstomos įvairios medžiagos. Pavyzdžiui, tokiu judamu būdu gali būti patalpintas konjugatas.

Kai kuriais atvejais pasroviui nuo pirmosios detektavimo vietos gali būti išdėstytos viena arba daugiau kitų detektavimo vietų. Be to, pasroviui nuo detektavimo vietos chromatografinis nešiklis gali būti toliau prailgintas taip,

kad mėginio tirpalas visiškai susinaudotų, arba į nešiklį gali būti pridėta medžiagos, skirtos mėginio tirpalui sugerti.

Taigi, dominančios analitės buvimas mėginio tirpale arba jos kiekis gali būti nustatomas matuojant žymėtosios medžiagos, sukauptos detektavimo vietoje, buvimą arba kiekį. Atskiru atveju tai gali būti nustatoma vizualiai.

Numatoma, kad šis išradimas bus naudojamas bet kokiems kraujo mėginiams, įskaitant serumą ir plazmą, bet geriau jį naudoti kraujo mėginiams, turintiems eritrocitų, t.y. neapdorotam kraujui.

Prieš nustatant dominančią analizę kraujo mėginyje, pageidautina pašalinti eritrocitus, kad testas būtų norimo jautrumo. Taigi, pagal šį išradimą prie chromatografinio nešiklio yra prijungtas eritrocitus atskiriantis agentas. Geriau, kai eritrocitus atskiriantis agentas yra difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio. Eritrocitus atskiriantis agentas gali būti prijungtas prie chromatografinio nešiklio bet kurioje vietoje, kuri funkcionuos atskirdama eritrocitus nuo plazmos arba serumo. Geriau, kai jis yra difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio prieš srovę nuo detektavimo vietos. Geriausia, kai eritrocitus atskiriantis agentas yra difuziškai prijungtas mėginio uždėjimo vietoje. Ši vieta yra tinkamiausia todėl, kad eritrocitų agregacija sukelia tuoj pat, kai tik jie uždedami ant chromatografinio nešiklio, ir gaunamas minimalus, jei toks išvis yra, trukdymas serumo arba plazmos slinkimui nešikliu veikiant kapiliarinėms jėgoms.

Šio išradimo eritrocitus atskiriantis agentas gali būti bet kokia medžiaga, galinti agreguoti eritrocitus. Tinkamiausiais agentais yra teigiamą krūvį turinčios medžiagos, tokios kaip polikacijonai, įskaitant, pvz., poli-L-lizino hidrobromidą; poli(dimetilalilamonio) chloridą (Merquat®-100, Merquat® 280, Merquat® 550); poli-L-arginino hidrochloridą; poli-L-histidiną; poli(4-vinilpiridiną), poli(4-vinilpiridino) hidrochloridą, susiūto poli(4-vinilpiridino) metilchlorido ketvirtinę druską; poli(4-vinilpiridin-ko-stireną); poli(4-vinilpiridinio poli(hidrofluoridą)); poli(4-vinilpiridinio-p-toluensulfonata); poli(4-vinilpiridinio-tribromidą); poli(4-vinilpirolidon-ko-2-dimetilaminoetilo metakrilata); susiūtą polivinilpirolidoną; polivinilpirolidoną, poli(melamin-ko-

formaldehida); dalinai metilintą heksadimetrino bromidą; poli(Glu,Lys) 1:4 hidrobromidą; poli(Lys,Ala) 3:1 hidrobromidą; poli(Lys,Ala) 2:1 hidrobromidą; sukcinilintą poli-L-liziną; poli(Lys,Ala) 1:1 hidrobromidą ir poli(Lys,Trp) 1:4 hidrobromidą. Tinkamiausias polikatijonas yra poli(dimetilalilamonio) chloridas (Merquat®-100).

Gali būti naudojami bet kokie šio išradimo eritrocitus atskiriančio agento kiekiai, kurie funkcionuoja atskirdami eritrocitus nuo likusios mėginio dalies. Pageidautina, kad eritrocitus atskiriančio agento būtų nuo maždaug 0,04 % iki maždaug 1,3 % (masė/tūryje), geriau nuo maždaug 0,13 % iki maždaug 0,33 % (masė/tūryje) ir visų geriausia - nuo maždaug 0,20 % iki maždaug 0,33 % (masė/tūryje).

Eritrocitus atskiriančio agento teigiamas krūvis yra linkęs agreguoti bet kokias neigiamą krūvį turinčias medžiagas, esančias ant juostelės. Pavyzdžiui, eritrocitus atskiriantis agentas taip pat gali agreguoti prie chromatografinio nešiklio prijungtą žymėtąją medžiagą arba konjugatą, trukdydamas prisijungti analitei prie konjugato arba konkurenciniame testavime - žymėtajai medžiagai ir dominančiai analitei prisijungti prie sulaikančios medžiagos detektavimo vietoje arba prie konjugato. Tokiu būdu iškyla pavojus imunotestavimo sistemos jautrumui ir tikslumui.

Dėl šios priežasties, kai eritrocitus atskiriantis agentas yra teigiamą krūvį turinti medžiaga, šiame išradime pageidautina naudoti neutralizuojantį agentą. Neutralizuojantis agentas gali neutralizuoti eritrocitus atskiriančio agento teigiamą krūvį, tokiu būdu pašalindamas arba bent jau sumažindamas neigiamą įtaką testavimo sistemai, kurią sukelia eritrocitus atskiriantis agentas. Geriau, kai neutralizuojantis agentas yra difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio. Neutralizuojantis agentas gali būti difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio bet kurioje vietoje, kur jis funkcionuos neutralizuodamas eritrocitus atskiriantį agentą, bet geriau, kai jis yra prijungtas pasroviui nuo eritrocitus atskiriančio agento ir prieš srovę nuo detektavimo vietos, o visų geriausia, kai jis yra toje pačioje chromatografinės juostelės vietoje kaip ir difuziškai prijungta žymėtoji medžiaga.

Neutralizuojantis agentas gali būti bet koks polianijonas, galintis neutralizuoti eritrocitus atskiriančio agento teigiamą krūvį. Tinkamiausiais polianijonais yra poli(akrilo rūgštis), poli(akrilo rūgšties Na druska), poli(metilmetakrilo rūgštis), poli(Na-4-stireno sulfonatas), poli(vinilsulfonrūgštis), poli-L-asparto rūgštis ir karboksimetilceliuliozė, o visų tinkamiausias yra dekstrano sulfatas.

Gali būti naudojami bet kokie neutralizuojančio agento kiekiai, kurie funkcionuoja neutralizuodami eritrocitus atskiriančio agento teigiamus krūvius. Paprastai neutralizuojančio agento koncentracija priklauso nuo naudojamos eritrocitus atskiriančio agento koncentracijos. Pageidautina, kad neutralizuojančio agento būtų nuo maždaug 0,33 % iki maždaug 20 % (masė/tūryje), geriau nuo maždaug 0,34 % iki maždaug 10 % (masė/tūryje) ir visų geriausia - nuo maždaug 0,34 % iki maždaug 10 % (masė/tūryje).

Fig.1 pavaizduotas imunochromatografinio testavimo įtaiso įgyvendinimo variantas pagal šį išradimą. Į įtaisą 10 įeina chromatografinis nešiklis 20. Ant chromatografinio nešiklio 10 yra numatyta kraujo mėginio uždėjimo vieta 30. Šiame tinkamiausiame įgyvendinimo variante eritrocitus atskiriantis agentas, t.y. Merquat® 100, yra uždėjimo vietoje 30. Greta uždėjimo vietos 30 yra konjugato tarpiklis 40, turintis konjugato, t.y. seleno žymėtos rišančios medžiagos ir neutralizavimo agento, t.y. dekstrano sulfato. Toliau pasroviui yra detektavimo vieta 50, kur atlikus bandymą pasirodys kontrolinis tarpiklis 60, o jeigu yra analizuojamoji medžiaga - testavimo tarpiklis 70.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante ant uždėjimo vietos gali būti užpilama buferio, geriausia po to, kai uždedamas mėginys. Buferis padeda palaikyti priimtina skysčio slinkimo greitį per chromatografinį nešiklį. Buferiu gali būti bet kokia medžiaga, kuri gali judėti dėl kapiliarinio poveikio pagal srauto kelią, įskaitant (bet neapsiribojant) fosfatinį buferį, fosfatinį buferį su valgomąja druska, Tris-HCl buferį, karbonatinį buferį, citratinį buferį, HEPES (2-hidroksipiperazin-N'-2-etansulfonrūgšties) buferį, MOPS (3-(N-morfolino)-propansulfonrūgšties) buferį, MES (2-(N-morfolino)etansulfonrūgšties) buferį ir pan. Nors koncentracija ir pH gali būti bet kokie, kurie tinka norimo

testavimo įtaisui, geriau, kai moliaringumas yra nuo maždaug 10 mM iki maždaug 100 mM, o pH yra maždaug 5-9, geriausia 6-8. Geriausia naudoti 50 mM fosfatinį buferį, pH 7,4.

Šiame išradime naudojamas skysčio tūris priklauso nuo įtaiso dydžio. Pageidautina naudoti pakankamai skysčio, kad būtų užtikrintas skysčio slinkimas įtaisu iki detektavimo vietos. Pageidautina, kad skysčio tūris būtų nuo maždaug 25 μ l iki maždaug 100 μ l, ir geriausia, kai jo yra nuo maždaug 40 μ l iki maždaug 60 μ l. Tokiu būdu, jeigu reikia, galima pridėti nuo maždaug 10 μ l iki maždaug 40 μ l, geriausia nuo maždaug 20 μ l iki maždaug 30 μ l, buferio.

Šis išradimas taip pat yra skirtas analitės buvimo kraujo mėginyje nustatymo būdai. Geriausia šiame būde naudoti šio išradimo chromatografinį imunotestavimo įtaisą. Konkrečiau kalbant, šis būdas apima: (1) pateikimą apibrėžiančio skysčio kelią chromatografinio nešiklio, galinčio palaikyti kapiliarinį tekėjimą, kuriame yra kraujo mėginio uždėjimo vieta, duodanti sąlytį su chromatografiniu nešikliu, detektavimo vieta ant chromatografinio nešiklio, esanti toliau nuo uždėjimo vietos, difuziškai prijungta žymėtoji medžiaga (arba konjugatas), kuri susiriša arba konkuruoja su analite dėl prisijungimo prie detektavimo vietos, difuziškai prijungtas eritrocitus atskiriantis agentas plazmos arba serumo išskyrimui iš minėto kraujo mėginio, esantis prieš srovę nuo detektavimo vietos, ir konjugatas, prijungtas prie chromatografinio nešiklio; (2) uždėjimo vietos sąlytį su kraujo mėginiu taip, kad eritrocitus atskiriantis agentas atskiria eritrocitus nuo kraujo mėginio plazmos arba serumo, o neutralizuojantis agentas neutralizuoja atskiriančio agento teigiamą krūvį; ir (3) analitės buvimo kraujo mėginyje nustatymą.

Pageidautina, kad eritrocitus atskiriantis agentas būtų teigiamą krūvį turinti medžiaga, o skysčio slinkimo kelyje būtų difuziškai prijungtas neutralizuojantis agentas, kuris gali susirišti su minėtu eritrocitus atskiriančiu agentu, ir jis būtų pasroviui nuo minėto eritrocitus atskiriančio agento ir prieš srovę nuo detektavimo vietos, tokiu būdu neutralizuojant minėto atskiriančio agento teigiamą krūvį.

Taigi, tinkamiausiame fig.1 parodytame įgyvendinimo variante kraujo mėginys uždedamas ant uždėjimo vietos 30, ir eritrocitus atskiriantis agentas atskiria eritrocitus juos agreguodamas ir leisdamas plazmai arba serumui slinkti dėl kapiliarinio poveikio chromatografiniu nešikliu 20. Neutralizuojantis agentas, esantis konjugato tarpiklyje 40, neutralizuoja eritrocitus atskiriančio agento poveikį įtaise 10, o konjugatas ir analizė prisijungia prie konjugato, esančio konjugato tarpiklyje 40. Prie konjugato prisijungusi analizė toliau slenka pasroviui iki detektavimo vietos 50. Jeigu yra dominanti analizė, pasirodo testavimo tarpiklis 70. Parodymui, kad testavimas vyksta teisingai, išryškėja kontrolinis tarpiklis 60 nepriklausomai nuo to, ar yra dominanti analizė, ar jos nėra.

Pageidautina, kad šio išradimo įtaisas turėtų nereaktingą dangtelį arba įdėtį. Būtų geriausia, kad įdėtis apimtų bent jau chromatografinį nešiklį ir būtų galima išvengti kontakto su juo ir galimo užteršimo imant rankomis. Dangtelyje taip pat gali būti pakelta zona greta uždėjimo vietos tam tikro mėginio tūrio paėmimui ir/arba palaikymui palengvinti. Be to, dangtelyje gali būti raidės, skaičiaus, ženklo, simbolio arba bet kokio jų derinio formos išpjauta zona arba zonos. Šiame įgyvendinimo variante išpjauta zona arba zonos sudaro konkrečių detektavimo vietų vaizdą, o juostelė yra visiškai uždara. Geriau, kai gana didelė juostelės dalis yra įpakuota, nes taip apsisaugoma nuo uždedamo mėginio sąlyčio su detektavimo vietomis dar jam nepraėjus per juostelę.

Šio išradimo įtaisas ir būdas gali būti naudojami bet kokioje testavimo sistemoje, kurioje kraujo mėginyje yra dominanti analizė. Tinkamiausių sistemų pavyzdžiais yra (bet jais neapsiribojama) hepatito C virusas ("HCV"), hepatito A virusas ("HAV"), žmogaus imunodeficito virusas ("ŽIV"), hepatito B paviršinis antikūnas ("HBsAb"), hepatito B paviršinis antigenas ("HBsAg"), hepatito B giluminis antikūnas ("HBcAb"), hepatito B giluminis antigenas ("HBcAg"), karcinoembrioninis antigenas ("CEA"), alfa-fetoproteinas ("AFP"), kasos vėžio markeris ("CA19-9"), sifilis, tuberkuliozė, maliarija, leišmanija ir dengė karštligė.

Toliau duodami pavyzdžiai plačiau iliustruoja šį išradimą, bet jokių būdu neturi būti aiškinami kaip ribojantys jo apimtį.

P a v y z d ž i a i

1 pavyzdys

Polikacijonų sukeltos eritrocitų ageragacijos ir Se-konjugato ageragacijos palyginimas

Šiame išradime eritrocitų (erc) ageragacija kraujyje yra pageidautina, o seleno konjugato - nepageidautina. Buvo išbandyti įvairūs katijonai, kurie galėtų sukelti pakankamą erc ageragaciją ir minimaliai agreguotų seleno konjugatą.

ŽIV-1 rekombinantinio baltymo seleno konjugatas buvo pagamintas tokiu būdu: pirmiausia buvo pagamintas seleno koloidas, veikiant 32 mM seleno oksidą 91 mM L-askorbo rūgštimi vandeniniame tirpale 72 val. 42 °C temperatūroje. Šis seleno koloidas buvo praskiestas iki optinio tankio 30, esant 550 nm bangos ilgiui, po to 20 minučių kambario temperatūroje veikiamas 40 µg/ml rekombinantinio ŽIV-1 apvalkalo baltymo 30 mM Tris buferyje, pH 7,4. Po to šis seleno koloidu žymėto ŽIV-1 baltymo konjugatas buvo praskiestas iki optinio tankio 30, esant 550 nm bangos ilgiui, 10 mM Tris buferiu, pH 7,4, turinčiu 0,1 % kazeino, ir inkubuotas 20 minučių kambario temperatūroje. Tada konjugato tirpalas centrifuguotas esant 1970 x g 20 minučių 4 °C temperatūroje, nuopilas atskirtas, o nuosėdos išmestos. Po to į nuopilą pridėta viena dešimtoji jo tūrio 30 mM Tris buferio, pH 7,4, turinčio 2 % kazeino. Pabaigoje šis konjugato tirpalas buvo praskiestas iki optinio tankio 10, esant 550 nm bangos ilgiui, 50 mM Tris buferiu, pH 7,4, turinčiu 0,1 % kazeino, 2 % sacharozės ir 2 % laktozės.

Buvo pagaminti tokių katijonų 0,25 % (m/t) tirpalai: poli-L-lizino hidrobromido, molekulinė masė (MM) 37000; poli-L-arginino hidroklorido, MM 12100, 42400 ir 92000; poli-L-histidino, MM 18400; heksadimetрино bromido; poli(lizinas, alaninas) 3:1 hidrobromido, MM 35000; poli(lizinas,

alaninas) 2:1 hidrobromido, MM 49300; poli(lizinas, alaninas) 1:1 hidrobromido, MM 41600;

poli(lizinas, triptofanas) 1:4 hidrobromido, MM 38000; (visi šie polikatijonai buvo gauti iš Sigma, St. Louis, MO); poli(dialildimetilamonio chlorido), MM 10^5 - 10^6 (Merquat[®]-100, Calgon, Pittsburgh, PA).

Šių polikatijonų sugebėjimas agreguoti arba erc kraujyje, arba seleno konjugatą buvo stebėtas atskirose reakcijose, pridėdant 350 µl 0,25 % įvairių katijonų tirpalo į tokį pat tūrį arba kraujo, arba seleno konjugato. Tirpalai buvo sumaišomi ir laikomi kambario temperatūroje 10 minučių, po to vizualiai įvertinama agregacija. Rezultatai reziumuoti 1 lentelėje. Vienas pliusas (+) rodo silpną agregaciją, 2+ rodo vidutinę agregaciją, o 3+ ir 4+ rodo stiprią agregaciją.

1 lentelė

Polikatijonas	Molekulinė masė	Agregacija	
		Eritrocitai	Sė-konjugatas
Poli-L-Lys HBr	37000	2+	2+
Merquat [®] -100	10^5 - 10^6	2+	2+
Poli-L-Arg HCl	12100	2+	2+
Poli-L-Arg HCl	42400	2+	2+
Poli-L-Arg HCl	92000	2+	2+
Poli-L-His	18400	+	4+
Heksadimetrino Br		+	+
Poli(Lys,Ala) 3:1 HBr	35000	2+	2+
Poli(Lys,Ala) 2:1 HBr	49300	+	2+
Poli(Lys,Ala) 1:1 HBr	41600	+	2+
Poli(Lys,Trp) 1:4 HBr	38000	3+	3+

Polikatijonas, kuris sukelia erc agregaciją (2+ arba didesnę), sukeldamas minimalią seleno konjugato agregaciją (2+ arba mažesnę), turėtų būti tinkamas. Polikatijonai, turintys 2+ abiejose kategorijose, atitinka šį kriterijų. Tolimesniam darbui pasirinkta poli-L-lizino HBr ir Merquat[®]-100; efektyviausias yra Merquat[®]-100.

2 pavyzdys

Apsisaugojimas nuo konjugato agregacijos panaudojant neutralizavimą polianijonais

A. Konjugato slinkimas ir apsisaugojimas nuo agregacijos naudojant dekstrano sulfatą. Naudojant poli-L-liziną kaip polikacijoninį erc agreguojantį reagentą, buvo tiriamos įvairios polianijono dekstrano sulfato koncentracijos, norint nustatyti, ar teigiamas polikacijono krūvis gali būti neutralizuotas dekstrano sulfatu, tokiu būdu išvengiant polikacijono sukeltos seleno konjugato agregacijos. Dekstrano sulfatas buvo dedamas po to, kai polikacijonas jau sukėlė erc agregaciją, bet prieš polikacijono sąveiką su seleno konjugatu. Toliau aprašytame eksperimente įvertintas polikacijono ir dekstrano sulfato poveikis į seleno konjugato agregaciją ir po to jo sugebėjimas slinkti imunochromatografinė juostele.

Buvo sukomponuota imunochromatografinė juostelė, susidedanti iš mėginio tarpiklio, neutralizacijos tarpiklio, konjugato tarpiklio ir detektavimo tarpiklio. Mėginio tarpiklis buvo pagamintas išmirkant 4 mm pločio ir 20 mm ilgio stiklo pluošto filtrą (Lypore 9524, Lydall, Rochester, NH) vandeniniame 0,33 % poli-L-lizino hidrobromido MM 3700 (Sigma, St. Louis, MO) tirpale, po to išdžiovinant jį vakuumu.

Neutralizavimo tarpikliai, turintys įvairias dekstrano sulfato koncentracijas, buvo pagaminti išmirkant 4 mm pločio ir 13 mm ilgio filtrus, padarytus iš medienos ir poliesterio (Sontara 8801, Du Pont, Wilmington, Delaware) vandeniniuose tirpaluose, turinčiuose 0 %, 1,1 %, 3,3 % arba 10 % dekstrano sulfato, MM 5000 (Sigma, St. Louis, MO). Išmirkyti tarpikliai buvo džiovinami vakuumu.

Konjugato tarpiklis buvo pagamintas išmirkant 4 mm pločio ir 4,3 mm ilgio stiklo pluošto filtrą (Lypore 9524, Lydall, Rochester, NH) seleno koloidu žymėto ŽIV-1 rekombinantinio baltymo konjugate, pagamintame ir praskiestame taip, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Išmirkytas konjugato tarpiklis buvo džiovinamas vakuumu.

Detektavimo juostelė buvo 4 mm pločio ir 40 mm ilgio nitroceliuliozinis membraninis filtras (catalogue #H964G1, Millipore, Bedford, MA). Ant šios nitroceliuliozinės membranos buvo uždėtas ŽIV-1 apvalkalo antigenas, imant 5 mg/ml 100 mM Tris buferyje, pH 7,4, turinčiame 1 % sacharozės,

koncentraciją, taip, kad skersai juostelę pasidarytų linija, esanti maždaug 1 cm atstumu nuo membranos galo. Šis liniuotas ruožas buvo užfiksuojamas poliesterio laminatu (code # 7733, Adhesives Research Inc., Glen Rock, PA). Juostelė padžiovinama, kad antigenas prisitvirtintų prie nitroceliuliozės.

Imunochromatografinės juostelės (4 mm pločio) buvo sumontuojamos panaudojant aukščiau aprašytus komponentus, uždedant juos vieną ant kito išilgai su 1 mm persiklojimais tarp atskirų dalių, imant 20 mm ilgio mėginio tarpiklį viename gale, po to dedant vieną iš 13 mm ilgio neutralizavimo tarpiklių, po to 4,3 mm ilgio konjugato tarpiklį ir gale 40 mm ilgio detektavimo juostelę. Sumontuota juostelė padengiama poliesterio laminatu (code # 8648, Adhesives Research Inc., Glen Rock, PA) nuo detektavimo tarpiklio viršaus iki 10 mm atstumo nuo juostelės galo, paliekant maždaug 10 mm nepadengto mėginio tarpiklio. Po to ant imunochromatografinių juostelių, turinčių neutralizavimo tarpiklius su 0 %, 1,1 %, 3,3 % ir 10 % dekstrano sulfato, mėginio tarpiklių uždedama po 80 µl plazmos. Raudono seleno konjugato agregacija ir jo sugebėjimas slinkti juostele buvo stebimas vizualiai.

Rezultatai, parodyti toliau duodamoje 2 lentelėje, parodė, kad nesant dekstrano sulfato, skirto polikatijonų tirpalo krūviui neutralizuoti, seleno konjugatas agreguojasi ir negali slinkti juostele. Stebima atvirkštinė priklausomybė tarp konjugato agregacijos ir slinkimo; 3,3 % arba didesnės dekstrano sulfato koncentracijos pakanka, kad būtų išvengiama konjugato agregacijos ir užtikrinamas slinkimas juostele.

2 lentelė

Dekstrano sulfato koncentracija	Konjugato agregacija	Konjugato slinkimas
0 %	++	-
1,1 %	+	+/-
3,3 %	-	+
10 %	-	+

B. Eritrocitų agregacija esant dekstrano sulfatui. Norint įvertinti dekstrano sulfato poveikį į erc agregaciją, buvo pakartotas aukščiau aprašytas eksperimentas mėginiu naudojant kraują ir imant 10 % dekstrano

sulfato turintį 4,3 mm ilgio ir 4 mm pločio neutralizavimo tarpiklį. Sumontavus imunochromatografinę juostelę taip, kaip aprašyta aukščiau, naudojant šį neutralizavimo tarpiklį, ant mėginio tarpiklio uždedama 80 µl neapdoroto kraujo. Po 15 min. vizualiai stebima erc agregacija ir išmatuojamas išsiskyrusios plazmos sugebėjimas slinkti juostele. Erce agregavosi, buvo sulaikyti mėginio tarpiklyje ir neslinko juostele, tuo tarpu kai plazma per 15 minučių nukeliavo juostele 33 mm. Tai rodo, kad polikatijonas mėginio tarpiklyje dar gali sukelti erc agregaciją kraujo mėginyje, o polianijono (dekstrino sulfato) buvimas neutralizavimo tarpiklyje erc agregacijai netrukdo.

C. Apsisaugojimas nuo konjugato agregacijos panaudojant polianijonus. Buvo tirtas kitų anijonų sugebėjimas apsaugoti seleno konjugatą nuo agregacijos pagal 2A pavyzdyje aprašytą metodiką. 15,5 mm ilgio ir 4 mm pločio mėginio tarpiklis buvo išmirkytas vandeniniame tirpale, turinčiame 0,26 % Merquat®-100, po to išdžiovintas 55 °C temperatūroje. Neutralizavimo tarpiklis nebuvo naudojamas, o vietoj to seleno konjugatas buvo skiedžiamas 10 mM Tris buferiu, pH 7,4, turinčiu 1 % kazeino, 2 % sacharozės, 2 % laktozės ir 0 %, 1,1 % arba 3,3 % polianijoninio dekstrano sulfato, MM 5000 (Sigma, St. Louis, MO), arba 0 %, 0,5 %, 1 % arba 2 % vieno iš šių polianijonų (visi iš Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI): poli(akrilo rūgšties), MM 5000; poli(natrio-4-stirensulfonato), MM 70000; poli(vinilsulfonrūgšties natrio druskos); poli(metilmetakrilo rūgšties), MM 9500; poli(akrilo rūgšties natrio druskos), MM 2100. Konjugato tarpikliai buvo išmirkomi įvairiuose seleno konjugato tirpaluose ir išdžiovinami vakuume. Detektavimo juostelė buvo pagaminta taip pat kaip ir 2A pavyzdyje ir sumontuotos imunochromatografinės juostelės. Ant kiekvienos chromatografinės juostelės, turinčios konjugato tarpiklius su įvairiais polianijonais, mėginio tarpiklio uždedama po 50 µl plazmos. Raudono seleno konjugato agregacija stebėta vizualiai. Santykinis konjugato agregacijos laipsnis, stebimas esant įvairioms tirtųjų polianijonų koncentracijoms, parodytas 3 lentelėje.

3 lentelė

Seleno konjugato agregacija

Polianijonas	Polianijono koncentracija				
	0 %	0,5 %	1-1,1%	2 %	3,3 %
Dekstrano sulfatas	++	nt	+	nt	-
Poli(akrilo rūgštis)	++	-	-	-	nt
Poli(Na-4-stirensulfonatas)	++	++	++	+	nt
Poli(vinilsulfonrūgštis)	++	+/-	-	-	nt
Poli(metilmetakrilo rūgštis)	++	-	-	-	nt
Poli(akrilo rūgštis Na druska)	++	+	+/-	-	nt

nt = netirta

Kaip ir prieš tai aprašytame pavyzdyje, seleno konjugatas agregavosi, jeigu nebuvo polianijono teigiamam polikatijono (reikalingo erc agreguoti, jeigu tiriamas neapdorotas kraujas) krūviui neutralizuoti mėginio tarpiklyje. Visi konjugato tarpiklyje panaudoti polikatijonai (bent viena iš tirtųjų jų koncentracijų) apsaugojo nuo konjugato agregacijos. Šis eksperimentas taip pat parodė, kad polianijonams nereikia atskiro tarpiklio, bet jie gali būti sudedami su seleno konjugatu konjugato tarpiklyje.

3 pavyzdys

Dekstrano sulfato panaudojimo neutralizavimo tarpiklyje palyginimas su panaudojimu konjugato tarpiklyje ŽIV-1 antikūnų testavime

Imunochromatografinės juostelės, turinčios arba neturinčios 4 mm pločio ir 4,3 mm ilgio stiklo pluošto (Lypore 9524, Lydall, Rochester, NH) neutralizavimo tarpiklį, buvo pagamintos taip pat, kaip ir 2A pavyzdyje. Kai buvo naudojamas neutralizavimo tarpiklis, jis buvo išmirkomas vandeniniame tirpale, turinčiame 3,3 % dekstrano sulfato, po to išdžiovinamas vakuume. Juostelėse be neutralizacijos tarpiklio seleno konjugatas buvo praskiedžiamas 10 mM Tris buferiu, pH 7,4, turinčiu 1 % kazeino, 2 % sacharozės, 2 % laktozės ir 3,3 % dekstrano sulfato, šiame tirpale išmirkomas konjugato tarpiklis, po to išdžiovinamas vakuume. Mėginio tarpiklis buvo naudotas toks pats kaip ir 2A pavyzdyje, išskyrus tai, kad jis buvo išmirkytas 0,2 % Merquat®-100 vandeniniame tirpale.

Žmogaus serumas, turintis ŽIV-1 antikūnų, buvo praskestas 1:2048 arba ŽIV neigiamu žmogaus krauju (skaičiuojant pagal plazmos tūrį) su 50 % hematokrito reikšme, arba ŽIV neigiama žmogaus plazma. Buvo padaryti trys tolimesni serijiniai 1:2 skiedimai, skiedikliu vėlgi naudojant arba neapdorotą kraują, arba plazmą. Ant imunochromatografinių juostelių, pagamintų su dekstrano sulfatu atskirame neutralizavimo tarpiklyje, arba dekstrano sulfatu seleno konjugato tirpale ir esančiu konjugato tarpiklyje, mėginio tarpiklių uždedama po 80 µl neigiamo neapdoroto kraujo arba praskiestos neapdoroto kraujo įvairios koncentracijos ŽIV-1 teigiamų mėginių. Aštuoniasdešimt µl neigiamos plazmos arba iš ŽIV-1 teigiamos plazmos praskiestų mėginių serijos buvo tiriama tik ant chromatografinių juostelių su dekstrano sulfatu konjugato tarpiklyje. Rezultatai buvo atskaitomi praėjus 15 minučių po mėginių uždėjimo (4 lentelė). Teigiamas rezultatas davė raudoną spalvą ant detektavimo juostelės, kur raudonas seleno ŽIV-1 antigeno konjugato ir ŽIV-1 antikūno kompleksas prisijungė prie ŽIV-1 antigeno ant juostelės liniuotosios dalies. Neigiamas rezultatas ant detektavimo juostelės šioje srityje spalvos nedavė.

4 lentelė

	Dekstrano sulfatas neutralizavimo tarpiklyje	Dekstrano sulfatas konjugato tarpiklyje	
Mėginio praskiedimas	Kraujas	Kraujas	Plazma
1:2048	+	+	+
1:4096	+	+	+
1:8192	-	+	+
1:16384	nt	-	-
Neigiama kontrolė	-	-	-

nt = netirta

4 lentelės rezultatai rodo, kad ŽIV-1 antikūnus galima nustatyti neapdoroto kraujo mėginyje imunochromatografinės juostelės testu, naudojant polikatijonu Merquat®-100 eritrocitams agreguoti ir taip leidžiant mėginiui slinkti juostele, ir naudojant polianijonu dekstrano sulfatą kaip neutralizuojantį agentą, apsaugantį nuo seleno konjugato agregacijos, kurią sukelia polikatijonai, ir taip leidžiant konjugatui susijungti ir sudaryti kompleksą su teigiamu mėginiu ir slinkti juostele iki detektavimo vietos. Buvo parodyta, kad polianijonas yra efektyvus naudojant jį arba atskirame neutralizavimo tarpiklyje, arba sumaišius su seleno konjugatu konjugato tarpiklyje. Šiame teste ŽIV-1 antikūnų nustatymo jautrumas buvo 2 kartus didesnis, kai polianijonas (dekstrano sulfatas) buvo naudojamas konjugato tarpiklyje, lyginant su atskiru neutralizavimo tarpikliu.

Be to, iš 4 lentelės rezultatų matyti, kad polikatijonai efektyviai agreguoja erc kraujyje, ką rodo vienodas ŽIV-1 antikūnų nustatymo jautrumas kraujyje, kur erc turi būti agreguojami, kad mėginys slinktų juostele, ir plazmoje, kur nėra erc, trukdančių plazmos slinkimui. Tai taip pat rodo, kad polianijono buvimas (kaip atskirame neutralizavimo tarpiklyje, taip ir konjugato tarpiklyje) netrukdo polikationui efektyviai agreguoti erc kraujyje.

4 pavyzdys

Merquat® ir įvairių polianijonų panaudojimas HBsAg teste

Buvo pagamintos imunochromatografinės juostelės hepatito B paviršiniam antigenui (HBsAg) nustatyti neapdoroto kraujo mėginiuose. Kaip polikatijonas eritrocitams agreguoti buvo naudotas Merquat®-100 mėginio tarpiklyje, o įvairūs polianijonai, kaip polikatijonų neutralizavimo reagentai apsisaugojimui nuo seleno konjugato agregacijos, buvo tiriami konjugato tarpiklyje.

Buvo sukomponuotos chromatografinės juostelės, susidedančios iš mėginio tarpiklio, konjugato tarpiklio ir detektavimo juostelės. Mėginio tarpiklis buvo pagamintas išmirkant 4 mm pločio ir 15,5 mm ilgio stiklo pluošto filtrą 0,26 % vandeniniame Merquat®-100 tirpale, po to išdžiovinant jį 55 °C temperatūroje.

Seleno konjugatas buvo pagamintas naudojant 1 pavyzdyje aprašytą seleno koloidą ir 12 µg/ml pelės monokloninį antikūną HBsAg (anti-HBs). Šis seleno koloidu žymėtas anti-HBs konjugatas po to buvo praskiestas iki optinio tankio 2,6, esant 550 nm bangos ilgiui, Tris buferiu, turinčiu vieną iš šių polianijonų: 0,5 % poli(akrilo rūgšties), MM 2000 (PAA-2000); 0,5 % poli(akrilo rūgšties), MM 240000 (PAA-240000); 0,5 % dekstrano sulfato; 0,8 % poli-L-asparto rūgšties, MM 36300; 0,5 % karboksimetilceliuliozės, MM 90000 (CMC). Dekstrano sulfatas ir poli-L-asparto rūgštis buvo iš Sigma, St. Louis, MO, o likusieji polianijonai - iš Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI.

Konjugato tarpiklis buvo paruoštas išmirkant 4 mm pločio ir 4,3 mm ilgio stiklo pluošto filtrą seleno koloidu žymėtame anti-HBs konjugate, pagamintame ir praskiestame vienu iš aukščiau minėtų anijonų. Išmirkytas konjugato tarpiklis buvo išdžiovintas vakuumu.

Detektavimo juostelė buvo 4 mm pločio ir 40 mm ilgio nitroceliuliozinis membraninis filtras, paruoštas kaip 2 pavyzdyje, naudojant pelės monokloninį anti-HBs, kurio koncentracija yra 3 mg/ml, kuris buvo įdėtas į nitroceliuliozinę membraną taip, kad skersai juostelę susidarytų linija, esanti maždaug 1 cm atstumu nuo membranos galo. Ši liniuota zona buvo užfiksuojama poliesterio laminatu. Juostelė padžiovinama, kad antigenas prisitvirtintų prie nitroceliuliozės.

Imunochromatografinės juostelės buvo sumontuojamos panaudojant aukščiau aprašytus komponentus, dedant juos vieną ant kito išilgai su 1 mm persiklojimais, viename gale dedant mėginio tarpiklį, po to konjugato tarpiklį ir ant galo detektavimo juostelę. Po to sumontuota juostelė padengiama poliesterio laminatu, paliekant maždaug 10 mm nepadengto mėginio tarpiklio.

Į HBsAg neigiamą žmogaus kraują su 50 % hematokrito reikšme buvo pridėta rekombinantinio HBsAg iki 12,5 ng/ml koncentracijos. Buvo padaryti trys tolesni 1:2 serijiniai praskiedimai neapdorotu krauju. Ant imunochromatografinių juostelių, pagamintų su įvairiais polianijonais konjugato tarpiklyje, mėginio tarpiklių uždedama po 50 µl neigiamo neapdoroto kraujo arba praskiestų neapdorotu krauju įvairaus praskiedimo laipsnio HBsAg teigiamų mėginių. Rezultatai buvo atskaitomi praėjus 15 minučių po mėginių uždėjimo (5 lentelė). Teigiamas rezultatas davė raudoną spalvą ant detektavimo juostelės, kur raudonas seleno anti-HBs konjugato ir HBsAg kompleksas buvo prijungtas prie anti-HBs ant juostelės liniuotos dalies. Neigiamas rezultatas ant detektavimo juostelės šioje srityje spalvos nedavė. Raudono seleno konjugato agregacija prie įėjimo į detektavimo juostelę buvo stebėta vizualiai.

5 lentelė

Polianijonas	HBsAg koncentracija (ng/ml)					Konjugato agregacija
	12,5	6,25	3,13	1,56	0	
PAA-2000	+	+	+	-	-	-
PAA-240000	+	+	-	-	-	+
Dekstrano sulfatas	+	+	+	-	-	-
Poli-L-Asp	+	+	+	-	-	-
CMC	+	-	-	-	-	+

Nors visi polianijonai leido nustatyti HBsAg, tie iš jų, kurie apsaugojo nuo konjugato agregacijos (PAA-2000, dekstrano sulfatas ir poli-L-asparto rūgštis), davė 2-4 kartus didesnę HBsAg nustatymo jautrumą kraujo mėginiuose.

Aukščiau aprašytas eksperimentas buvo pakartotas, naudojant seleno koloidu žymėtą konjugatą, praskiestą Tris buferiu, kuriame polianijonu yra PAA-2000, išskyrus tai, kad ant mėginio tarpiklio, praėjus vienai minutei po kraujo mėginių su HBsAg uždėjimo, pridedama 25 μ l 50 mM fosfatinio buferio, pH 7,4. Rezultatai, gauti naudojant šią metodiką, pridedant buferio po mėginio uždėjimo, buvo identiški rezultatams be šios stadijos. Taigi, šie testai gali būti atliekami pridedant arba nepridedant buferio po mėginio uždėjimo.

5 pavyzdys

Merquat® ir dekstrano sulfato panaudojimas tuberkuliozės teste

Buvo pagamintos imunochromatografinės juostelės *Mycobacterium tuberculosis* antikūnui (anti-Mtb) nustatyti neapdoroto kraujo mėginiuose. Kaip polikatijonas eritrocitams agreguoti buvo naudotas Merquat®-100 mėginio tarpiklyje, ir buvo tirtos įvairios dekstrano sulfato, kaip polikatijonus neutralizuojančio reagento, kad būtų apsaugoma nuo seleno konjugato agregacijos, koncentracijos konjugato tarpiklyje.

Buvo sukomponuotos chromatografinės juostelės, susidedančios iš mėginio tarpiklio, konjugato tarpiklio ir detektavimo juostelės. Mėginio tarpiklis buvo pagamintas išmirkant 4 mm pločio ir 15,5 mm ilgio stiklo pluošto filtrą 0,26 % vandeniniame Merquat®-100 tirpale, po to išdžiovinant jį vakuume.

Seleno konjugatas buvo pagamintas naudojant 1 pavyzdyje aprašytą seleno koloidą ir 3,5 μ g/ml rekombinantinio Mtb antigeno iš *E. coli*. Šis seleno koloidu žymėtas Mtb konjugatas po to buvo praskiestas iki optinio tankio 2,5, esant 550 nm bangos ilgiui, Tris buferiu, turinčiu 0 %, 0,34 %, 1,1 % arba 3,3 % dekstrano sulfato.

Konjugato tarpiklis buvo paruoštas išmirkant 4 mm pločio ir 4,3 mm ilgio stiklo pluošto filtrą seleno koloidu žymėtame Mtb konjugate, pagamintame ir praskiestame vienu iš aukščiau minėtų koncentracijų dekstrano tirpalų. Išmirkytas konjugato tarpiklis buvo išdžiovintas vakuume.

Detektavimo juostelė buvo 4 mm pločio ir 40 mm ilgio nitroceliuliozinis membraninis filtras, paruoštas kaip 2 pavyzdyje, naudojant rekombinantinį Mtb antigeną, kurio koncentracija yra 0,15 mg/ml, kuris buvo įdėtas į nitroceliuliozinę membraną taip, kad skersai juostelę susidarytų linija, esanti maždaug 1 cm atstumu nuo membranos galo. Ši liniuota zona buvo užfiksuojama poliesterio laminatu. Juostelė padžiovinama, kad antigenas prisitvirtintų prie nitroceliuliozės.

Imunochromatografinės juostelės buvo sumontuojamos panaudojant aukščiau aprašytus komponentus, dedant juos vieną ant kito išilgai su 1 mm persiklojimais, viename gale dedant mėginio tarpiklį, po to konjugato tarpiklį ir ant galo detektavimo juostelę. Po to sumontuota juostelė padengiama poliesterio laminatu, paliekant maždaug 10 mm nepadengto mėginio tarpiklio.

Anti-Mtb teigiamas serumas buvo praskiestas 1:1000 neigiamu žmogaus krauju su 50 % hematokrito reikšme. Buvo padaryti du tolesni 1:2 serijiniai praskiedimai neapdorotu krauju. Ant imunochromatografinių juostelių, pagamintų su įvairiomis dekstrano sulfato koncentracijomis konjugato tarpiklyje, mėginio tarpiklių uždedama po 50 µl neigiamo neapdoroto kraujo arba praskiestų neapdorotu krauju įvairaus praskiedimo laipsnio Mtb teigiamų mėginių. Rezultatai buvo atskaitomi praėjus 15 minučių po mėginių uždėjimo (6 lentelė). Teigiamas rezultatas davė raudoną spalvą ant detektavimo juostelės, kur raudonas seleno Mtb konjugato ir anti-Mtb kompleksas buvo prijungtas prie Mtb ant juostelės liniuotos dalies. Neigiamas rezultatas ant detektavimo juostelės šioje srityje spalvos nedavė. Raudono seleno konjugato agregacija prie įėjimo į detektavimo juostelę buvo stebėta vizualiai.

6 lentelė

Dekstrano sulfatas (%)	Anti-Mtb praskiedimas				Konjugato agregacija
	1:100	1:200	1:400	Neigiama kontrolė	
0	-	-	-	-	++
0,34	-	-	-	-	++
1,1	+	-	-	-	+

3,3		+	+	-	-		-
-----	--	---	---	---	---	--	---

6 lentelės duomenys rodo, kad testas nefunkcionuoja be polianijono, šiuo atveju dekstrano sulfato, apsaugančio konjugatą nuo agregacijos. Stebimas atvirkštinis ryšys tarp konjugato agregacijos ir testo jautrumo. Kai dekstrano sulfato koncentracija yra 3,3 %, konjugato agregacija nevyksta ir gaunamas didžiausias anti-Mtb nustatymo jautrumas.

6 pavyzdys

Sifilio testas naudojant Merquat® ir dekstrano sulfatą

Buvo pagamintos imunochromatografinės juostelės *Treponema pallidum* antikūnui (anti-TP) nustatyti neapdoroto kraujo mėginiuose. Lyginant detektavimo jautrumą kraujyje ir plazmoje, reikia nustatyti, ar polikatijonai efektyviai agregavo erc, kad jie netrukdytų nustatymui ir nesumažintų testo jautrumo. Kaip polikatijonas erc agreguoti buvo naudotas Merquat®-100 mėginio tarpiklyje, o konjugato tarpiklyje buvo naudotas polianijonas dekstrano sulfatas, kaip polikatijonus neutralizuojantis reagentas, kad būtų apsaugoma nuo seleno konjugato agregacijos.

Buvo sukomponuotos chromatografinės juostelės, susidedančios iš mėginio tarpiklio, konjugato tarpiklio ir detektavimo juostelės. Mėginio tarpiklis buvo pagamintas išmirkant 4 mm pločio ir 15,5 mm ilgio stiklo pluošto filtrą 0,2 % vandeniniame Merquat®-100 tirpale, po to išdžiovinant jį 55 °C temperatūroje.

Seleno konjugatas buvo pagamintas naudojant 1 pavyzdyje aprašytą seleno koloidą ir 7,5 µg/ml *Treponema pallidum* lizato (TP). Šis seleno koloidu žymėtas TP konjugatas po to buvo praskiestas iki optinio tankio 2,8, esant 550 nm bangos ilgiui, Tris buferiu, turinčiu 3,3 % dekstrano sulfato.

Konjugato tarpiklis buvo paruoštas išmirkant 4 mm pločio ir 4,3 mm ilgio stiklo pluošto filtrą aukščiau pagamintame seleno koloidu žymėtame TP konjugate. Išmirkytas konjugato tarpiklis buvo išdžiovintas vakuume.

Detektavimo juostelė buvo 4 mm pločio ir 40 mm ilgio nitroceliuliozinis membraninis filtras, paruoštas kaip 2 pavyzdyje, naudojant 44 µg/ml koncentracijos *Treponema pallidum* lizatą, kuris buvo įdėtas į nitroceliuliozinę membraną taip, kad skersai juostelę susidarytų linija, esanti maždaug 1 cm atstumu nuo membranos galo. Ši liniuota zona buvo užfiksuojama poliesterio laminatu. Juostelė padžiovinama, kad TP lizatas prisitvirtintų prie nitroceliuliozės.

Imunochromatografinės juostelės buvo sumontuojamos panaudojant aukščiau aprašytus komponentus, dedant juos vieną ant kito išilgai su 1 mm persiklojimais, viename gale dedant mėginio tarpiklį, po to konjugato tarpiklį ir ant galo detektavimo juostelę. Po to sumontuota juostelė padengiama poliesterio laminatu, paliekant maždaug 10 mm nepadengto mėginio tarpiklio.

Anti-TP teigiamas žmogaus serumas buvo praskiestas 1:10,8 arba neigiamu žmogaus krauju su 50 % hematokrito reikšme, arba neigiama žmogaus plazma. Buvo padaryti keturi tolesni 1:2 serijiniai praskiedimai, skiedikliu vėlgi naudojant arba neapdorotą kraują, arba plazmą. Ant imunochromatografinių juostelių mėginio tarpiklių uždedama po 60 µl neigiamo neapdoroto kraujo arba plazmos, arba praskiestų neapdorotu krauju arba plazma įvairaus praskiedimo laipsnio anti-TP teigiamų mėginių. Rezultatai buvo atskaitomi praėjus 15 minučių po mėginių uždėjimo (7 lentelė). Teigiamas rezultatas davė raudoną spalvą ant detektavimo juostelės, kur raudonas seleno TP konjugato ir anti-TP kompleksas buvo prijungtas prie TP lizato ant juostelės liniuotos dalies. Neigiamas rezultatas ant detektavimo juostelės šioje srityje spalvos nedavė.

7 lentelėje parodyta, kad anti-TP detektavimo jautrumas buvo toks pats ir kraujyje ir plazmoje, o tai reiškia, kad polikacijonas (Merquat®-100) efektyviai agregavo erc kraujyje.

7 lentelė

Anti-TP mėginio praskiedimas	Kraujas	Plazma
1:10,8	+	+
1:21,6	+	+

1:43,2	+	+
1:86,4	+	+
1:172,8	-	-
Neigiama kontrolė	-	-

Visos čia pacituotos publikacijos, patentai ir patentinės paraiškos yra pridedamos kaip literatūros šaltiniai pilnoje apimtyje, lyg kad atskiras dokumentas būtų atskirai ir konkrečiai nurodytas kaip įtrauktas į nuorodas ir duotas pilnumoje.

Nors šis išradimas buvo aprašytas pabrėžiant tinkamiausius jo įgyvendinimo variantus, specialistams bus aišku, kad tinkamiausi įgyvendinimo variantai gali būti keičiami. Turima galvoje, kad išradimas gali būti naudojamas ir kitaip nei čia konkrečiai nurodyta. Tokiu būdu, šis išradimas apima visas modifikacijas, kurios patenka į šio išradimo sferą, išdėstytą aprašyme ir toliau duodamoje apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Chromatografinio testavimo įtaisas analizės nustatymui kraujo mėginyje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susideda iš:

skysčio slinkimo kelią apibrėžiančio chromatografinio nešiklio, galinčio palaikyti kapiliarinį tekėjimą;

minėto kraujo mėginio uždėjimo vietos skysčio kelyje, duodančios sąlytį su minėtu chromatografiniu nešikliu,

detektavimo vietos ant minėto chromatografinio nešiklio, esančios toliau nuo minėtos uždėjimo vietos,

difuziškai prijungtos žymėtosios medžiagos, esančios pasroviui nuo minėtos uždėjimo vietos,

difuziškai prijungto eritrocitus atskiriančio agento plazmos arba serumo išskyrimui iš minėto kraujo mėginio, esančio prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos, ir

difuziškai prijungto neutralizuojančio agento, esančio pasroviui nuo minėto prijungto atskiriančio agento ir prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos.

2. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad jis yra imunitestavimo įtaisas.

3. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėtas eritrocitus atskiriantis agentas yra prijungtas minėto kraujo mėginio uždėjimo vietoje.

4. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėtas eritrocitus atskiriantis agentas yra teigiamą krūvį turinti medžiaga.

5. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta teigiamą krūvį turinti medžiaga yra polikacijonas, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš poli-L-lizino hidrobromido, poli-L-arginino hidrochlorido, poli-L-histidino, poli(lizinas, alaninas) 3:1

hidrobromido, poli(lizinas, alaninas) 2:1 hidrobromido, poli(lizinas, alaninas) 1:1 hidrobromido,

poli(lizinas, triptofanas) 1:4 hidrobromido ir poli(dialildimetilamonio chlorido).

6. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta teigiamą krūvį turinti medžiaga yra poli(dialildimetilamonio chloridas).

7. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėtas neutralizuojantis agentas yra neigiamą krūvį turinti medžiaga.

8. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta neigiamą krūvį turinti medžiaga yra polianijonas, pasirinktas iš dekstrano sulfato, poli(akrilo rūgšties), poli(natrio-4-stirensulfonato), poli(vinilsulfonrūgšties), poli(metilmetakrilo rūgšties), poli-L-asparto rūgšties ir karboksimetilceliuliozės.

9. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta neigiamą krūvį turinti medžiaga yra dekstrano sulfatas.

10. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėtas neutralizuojantis agentas yra difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio toje pačioje vietoje kaip ir minėta žymėtoji medžiaga.

11. Chromatografinio testavimo įtaisas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad minėta žymėtoji medžiaga yra seleno žymėta medžiaga.

12. Analitės buvimo kraujo mėginyje nustatymo būdas, b e s i s k i r i a n - t i s tuo, kad jis susideda iš šių stadijų:

skysčio slinkimo kelią apibrėžiančio chromatografinio nešiklio, galinčio palaikyti kapiliarinį tekėjimą, kuriame yra išdėstyta (a) minėto kraujo mėginio uždėjimo vieta skysčio kelyje, duodanti sąlytį su minėtu chromatografiniu nešikliu, (b) detektavimo vieta ant minėto chromatografinio nešiklio, esanti toliau nuo minėtos uždėjimo vietos, (c) žymėtoji medžiaga, esanti pasroviui nuo minėtos uždėjimo vietos, (d) difuziškai prijungtas eritrocitus atskiriantis

agentas plazmos arba serumo išskyrimui iš minėto kraujo mėginio, esantis prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos, ir (e) difuziškai prijungtas neutralizuojantis agentas, esantis pasroviui nuo minėto prijungto atskiriančio agento ir prieš srovę nuo minėtos detektavimo vietos, pateikimo;

minėtos uždėjimo vietos sąlyčio su minėtu kraujo mėginiu; ir

analitės buvimo nustatymo minėtame kraujo mėginyje.

13. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta žymėtoji medžiaga yra selenu žymėta medžiaga.

14. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas neutralizuojantis agentas yra difuziškai prijungtas prie chromatografinio nešiklio toje pačioje vietoje kaip ir minėta žymėtoji medžiaga.

15. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas eritrocitus atskiriantis agentas yra teigiamą krūvį turinti medžiaga.

16. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta teigiamą krūvį turinti medžiaga yra polikacijonas, pasirinktas iš grupės, susidedančios iš poli-L-lizino hidrobromido, poli-L-arginino hidrochlorido, poli-L-histidino, poli(lizinas, alaninas) 3:1 hidrobromido, poli(lizinas, alaninas) 2:1 hidrobromido, poli(lizinas, alaninas) 1:1 hidrobromido, poli(lizinas, triptofanas) 1:4 hidrobromido ir poli(dialildimetilamonio chlorido).

17. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas neutralizuojantis agentas yra neigiamą krūvį turinti medžiaga.

18. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta neigiamą krūvį turinti medžiaga yra polianijonas, pasirinktas iš dekstrano sulfato, poli(akrilo rūgšties), poli(natrio-4-stirensulfonato), poli(vinilsulfonrūgšties), poli(metilmetakrilo rūgšties), poli-L-asparto rūgšties ir karboksimetilceliuliozės.

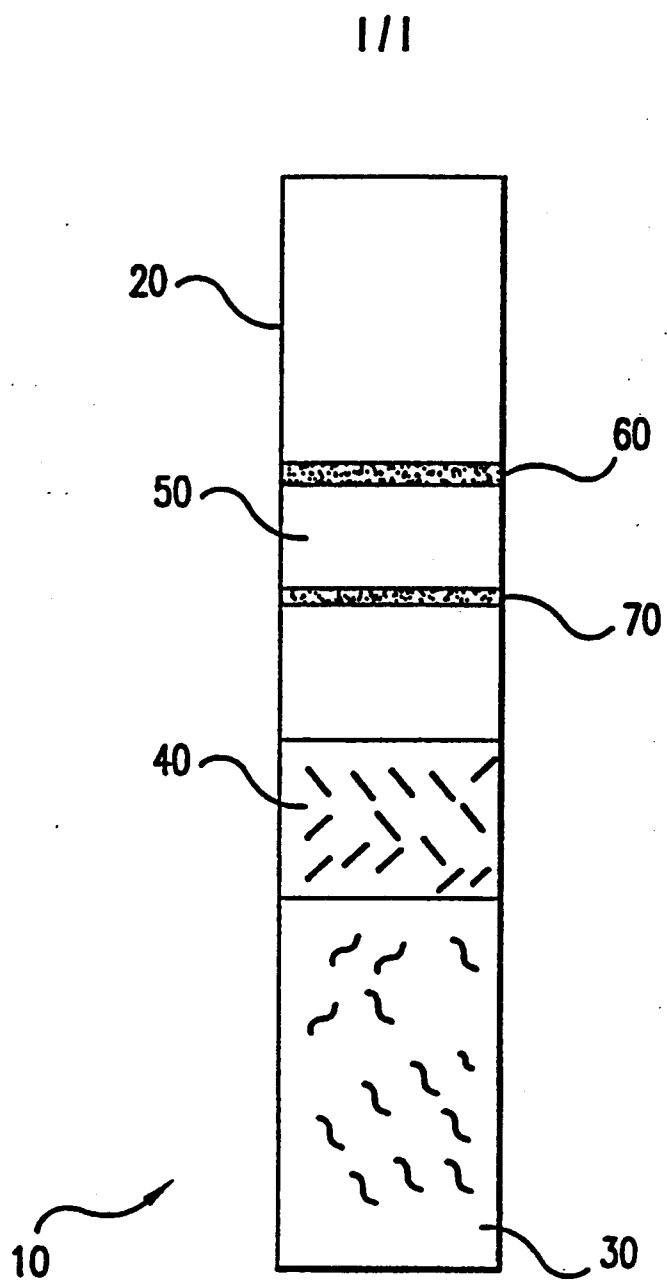


FIG.1