

12 **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **89100103.4**

51 Int. Cl.4: **B01L 11/00 , B08B 3/02**

22 Anmeldetag: **04.01.89**

30 Priorität: **08.01.88 DE 3800379**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
23.08.89 Patentblatt 89/34

54 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

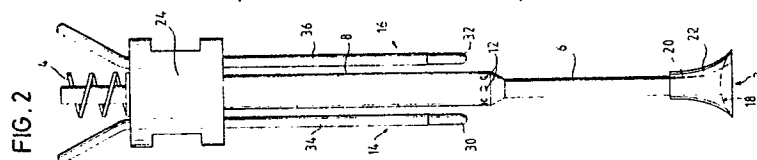
71 Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
Patentabteilung, Abt. E Sandhofer Strasse
112-132 Postfach 31 01 20
D-6800 Mannheim 31 Waldhof(DE)

72 Erfinder: **Engel, Wolf Dieter, Dr. rer.nat.**
Moosstrasse 7
D-8121 Pähl(DE)
 Erfinder: **Karl, Johann, Dr. rer.nat.**
Wacholderweg 1
D-8120 Weilheim(DE)
 Erfinder: **Stäbler, Friedrich**
Monatshausen 10 B
D-8132 Tutzing(DE)

74 Vertreter: **Fincke, Karl Theodor, Dipl.-Phys.Dr.**
et al
Patentanwälte Dipl.-Ing. H.Weickmann
Dipl.-Phys.Dr. K.Fincke Dipl.-Ing.
F.A.Weickmann Dipl.-Chem. B. Huber Dr. Ing.
H. Liska Dipl.-Phys.Dr. J. Prechtel Postfach
860820
D-8000 München 86(DE)

54 **Vorrichtung zum Abwaschen eines Reaktionsgefäßes und/oder der Aussenfläche eines Reagenzkugelskörpers.**

57 Vorrichtung zum Abwaschen der Innenfläche eines Reaktionsgefäßes und/oder der Außenfläche wenigstens eines in dem Reaktionsgefäß befindlichen Reagenzkugelskörpers, mit einem an eine Waschflüssigkeit-Absaugeinrichtung anschließbaren, eine Ansaugmündung (2) aufweisenden, mittels einer Feder (4) in Richtung zum Boden des Reaktionsgefäßes zu drückenden Röhrchen (6), mit einem das Röhrchen (6) in axialem Abstand von seiner Ansaugmündung (2) mit radialem Abstand umschließenden Mantel (8), der zwischen seiner Innenfläche und der Außenfläche des Röhrchens (6) einen an eine Waschflüssigkeitszuführungseinrichtung anschließbaren Waschflüssigkeits-Zuführungskanal (10) begrenzt, mit in einem der Ansaugmündung (2) zugeordneten Endabschnitt des Mantels (8) vorgesehenen Löchern (12) zum Austritt der Waschflüssigkeit und mit zwei außerhalb des Mantels (8) in Abstand voneinander, axial weiter entfernt von der Ansaugmündung (2) als die Löcher (12) im Mantel angeordneten, an einen elektrischen Flüssigkeitspegelfühler anschließbaren Elektroden (14, 16), bei der die Innenfläche (18) der Ansaugmündung (2) trichterförmig ausgebildet ist.



Xerox Copy Centre

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Bei chemischen Bindungs-Reaktionen, vor allem bei immunologischen Tests, bei denen Reaktionsgefäße verwendet werden, deren Innenwände mit einem spezifisch bindefähigen Reagenz beschichtet sind, ist es nötig, nach Zugabe der in einer Flüssigkeit gelöst vorliegenden, zu bindenden Probe oder einer zu analysierenden flüssigen Probe nach einer Reaktionszeit die Flüssigkeit aus dem Röhrchen zu entfernen und dann die an die Innenwand des Reagenzgefäßes gebundene Schicht aus Reagenz und spezifisch bindenden Probenbestandteilen zu waschen, so daß nicht spezifisch gebundene Probenbestandteile entfernt werden.

Hierzu wurde bisher eine Vorrichtung verwendet, die das Absaugen der Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß durch ein Röhrchen erlaubt und es außerdem ermöglicht, nach dem Absaugen über einen Zuführungskanal eine Waschflüssigkeit in das Reagenzgefäß einzubringen, wobei die zufließende Menge an Waschflüssigkeit über Elektroden, die an einen Flüssigkeitspegelfühler angeschlossen sind, automatisch reguliert werden kann. Als Ansaugmündung der Vorrichtung diente hierbei das untere Ende des Röhrchens, dessen Öffnungsbreite dem Durchmesser des Röhrchens entspricht. Um die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß möglichst vollständig abzusaugen und so eine gründliche Waschung der beschichteten Wände des Reaktionsgefäßes zu erreichen, wurde die bisher verwendete Vorrichtung durch eine am oberen Ende der Vorrichtung angebrachten Feder gegen den Boden des Reaktionsgefäßes gedrückt. Damit auch bei Auflage des Röhrchens auf den Boden die Flüssigkeit abgesaugt werden konnte, war das als Ansaugmündung fungierende untere Ende des Röhrchens an zwei gegenüberliegenden Stellen eingekerbt.

Chemische Bindungsreaktionen und immunologische Tests werden aber heute oft automatisiert durchgeführt, wobei abwechselnd sowohl Reaktionsgefäße, mit Reagenz-beschichteten Innenwänden, als auch Reaktionsgefäße, welche Reagenz-beschichtete Reagenzkugeln (sogenannte "beads") enthalten, verwendet werden. Auch die Verwendung von Reagenzkugeln enthaltenden Reaktionsgefäßen mit Reagenz-beschichteten Innenwänden ist möglich. Zum Entfernen der Probenflüssigkeit und zum Waschen von Reaktionsgefäßen, welche Reagenzkugeln enthalten, sind jedoch die bisher verwendeten Vorrichtungen zum Absaugen und Waschen nicht gut geeignet, da ihre Ansaugmündung oben an dem Reagenzkugeln aufliegt und sobald der Flüssigkeitspegel unter die Höhe der Ansaugmündung absinkt, ein Absaugen der den Reagenzkugeln umgebenden Flüssigkeit nicht möglich ist. Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 anzugeben, die im gleichen Analysenautomaten sowohl bei Reaktionsgefäßen mit reagenzbeschichteten Innenflächen, als auch bei Reaktionsgefäßen, welche einen Reagenzkugeln enthalten, ein vollständiges Entfernen der Flüssigkeit und gründliches Waschen der Flächen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1.

Das Röhrchen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist gegenüber dem einer Vorrichtung nach dem Stand der Technik an seinem ansaugmündungsseitigen Ende um den Durchmesser des Reagenzkugeln verkürzt und weist eine trichterförmige Ansaugmündung auf, deren Durchmesser vorzugsweise mindestens so groß ist wie der Durchmesser des Reagenzkugeln.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird in das Reaktionsgefäß vor oder nach Zugabe einer in einer Flüssigkeit gelöst vorliegenden Probe eingebracht und über die Feder an den Reagenzkugeln, falls vorhanden, angelegt. Enthält das Reaktionsgefäß keinen Reagenzkugeln, so wird die Vorrichtung etwa ebenso tief in das Röhrchen eingetaucht, als wenn ein Reagenzkugeln vorhanden wäre, d.h. die Ansaugmündung der Vorrichtung sitzt nicht auf dem Boden des Reaktionsgefäßes auf. Über die Ansaugmündung des Röhrchens wird nach einer Reaktionszeit die Flüssigkeit abgesaugt und danach die Waschflüssigkeit über den Zuführungskanal in das Röhrchen gefüllt. Hierbei wird die Zugabe an Waschflüssigkeit unterbrochen, sobald der Flüssigkeitspegel in dem Röhrchen die beiden Elektroden berührt. Dies geschieht automatisch über einen Anschluß der Elektroden an einen elektrischen Flüssigkeitspegelfühler und einen damit verbundenen Schließmechanismus an der Waschflüssigkeit-Zuführungseinrichtung. Die Waschflüssigkeit wird dann, wie bereits für die Probenflüssigkeit beschrieben, entfernt. Durch die Trichterform der Ansaugmündung wird hierbei eine Verletzung der Reagenzschicht auf einem Reagenzkugeln vermieden und ein vollständiges Absaugen auch der einen Reagenzkugeln umgebenden Flüssigkeit ermöglicht. Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung gelingt das Absaugen von Flüssigkeit und Waschen bei Reaktionsgefäßen mit Reagenzkugeln besser und überraschenderweise auch bei Reaktionsgefäßen ohne Reagenzkugeln genauso gut wie mit einer bekannten Vorrichtung (Beispiele 1 und 2).

Um die Ansaugmündung besonders gut an den Reagenzkugeln anlegen zu können, wird die erfindungsgemäße Vorrichtung bevorzugt gemäß Anspruch 2 und besonders bevorzugt gemäß Anspruch 3 ausgebildet.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist im Anspruch 4 dargestellt. In dieser Ausführungsform wird die Trichterform der Ansaugmündung durch einen am freien

Ende des Röhrchens befestigten Aufsatz gebildet. Dieser ist nach Anspruch 5 bevorzugt auf das freie Ende des Röhrchens aufgesteckt. Um verschiedene Größen von Aufsätzen mit verschiedenen trichterförmigen, bevorzugt konkav hohlkugelig gewölbten Innenflächen der Aufsätze an dem freien Ende des Röhrchens befestigen zu können und daher die Ansaugmündung der Vorrichtung an die jeweils verwendete Größe der

5 Reagenzkugelhörper anzupassen, wird vorzugsweise eine Ausbildung gemäß Anspruch 6 vorgesehen.
Ein Ausführungsbeispiel der Vorrichtung wird im folgenden unter Hinweis auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben:

Fig. 1 zeigt einen Vertikalschnitt durch die Vorrichtung;

10 Fig. 2 zeigt eine Ansicht der Vorrichtung um ihre Vertikalachse gegenüber der Darstellung in Figur 1 um 90° verdreht.

Die Vorrichtung nach dem Ausführungsbeispiel weist eine Ansaugmündung 2 auf, deren Innenfläche 18 im Achsschnitt konkav gewölbt und durch einen auf das freie Ende 20 des Röhrchens 6 gesteckten Aufsatz 22 begrenzt ist. Die Außenfläche des Röhrchens 6 und ein das Röhrchen 6 in axialem Abstand von seiner
15 Ansaugmündung 2 mit radialem Abstand umschließender Mantel 8 begrenzen einen Waschflüssigkeits-Zuführkanal 10, der in einem Innenraum 26 eines Kopfteil 24 mündet. Das Röhrchen 6 durchsetzt diesen Innenraum 26. Der Innenraum 26 des Kopfteils 24 ist über ein weiteres Röhrchen 28 an eine Waschflüssigkeitszuführeinrichtung anschließbar. In dem der Ansaugmündung 2 zugewandten Ende des Mantels 8 befinden sich Löcher 12, durch die die Waschflüssigkeit aus dem Waschflüssigkeits-Zuführkanal 10 austritt.
20 Zwei durch das Kopfteil 24 geführte Elektroden 14 und 16 sind an einen elektrischen Flüssigkeitspegelfühler anschließbar. Bis zu freiliegenden Endabschnitten 30, 32 sind sie von Isolierstoffmänteln 34, 36 umschlossen. Eine das obere Ende des Röhrchens 6 umschließende Feder 4 drückt das Kopfteil 24 in Richtung zum Boden eines Reaktionsgefäßes.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

25

Beispiel 1

Die Effektivität der Waschung mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung im Vergleich mit einer um den
30 Durchmesser des Reagenzkugelhörpers verkürzten, bekannten Vorrichtung wurde in einem einen Reagenzkugelhörper ("bead", Polystyrolkugel mit Durchmesser 6,3 mm) enthaltenden Reaktionsgefäß überprüft.

Dazu wurde ein mit Rinderserumalbumin und einem Konjugat aus CEA (Carcino-embryonales Antigen) und Peroxidase beschichteter Kugelhörper in ein ebenfalls mit Rinderserumalbumin und CEA-Peroxidase beschichtetes Reaktionsgefäß gegeben. Je effektiver die Waschung ist, um so mehr des adsorptiv
35 gebundenen CEA-Konjugats müßte abgelöst werden. Damit müßte, wenn gut gewaschen wurde, in einer nachfolgenden Farbreaktion ein möglichst geringer Meßwert erhalten werden.

Die Farbreaktion erfolgt in der Weise, daß 500 ml eines Reagenzes, bestehend aus ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (6)]-diammoniumsalz und Natriumperborat), zugegeben wurden und nach 45 min die Extinktion bei 422 nm bestimmt wurde.

40 Das Ergebnis zeigt Tabelle I. Dort sind die Anzahl der Waschschrirte sowie die Größe des Meßsignals bei 422 nm in mE angegeben. Es zeigte sich, daß mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, deren Ansaugmündung als Kunststoffaufsatz auf das freie Ende des Röhrchens ausgebildet war, wesentlich geringere Meßsignale und damit eine bessere Waschung erreicht wurde. Außerdem war der Variationskoeffizient (VK), welcher ein Maß für die Genauigkeit darstellt, mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung kleiner.

45

50

55

Tabelle I

Optimierung der Waschung bei 6,3 mm-Beads				
Anzahl der Waschschr	verkürzte bekannte Waschvorrichtung		erfindungsgemäße Waschvorrichtung mit Kunststoffaufsatz (ø 7 mm)	
	Signal (mExtinktion)	Variation VK (n = 9)*	Signal (mExtinktion)	Variation VK (n = 9)*
3	746	25,9	447	7,7
6	495	14,3	304	14,5
8	343	14,4	-	-
10	311	10,9	197	5,6
n = Anzahl der Messungen				

Beispiel 2

TSH Immunbestimmung

Es wurde ein TSH-Enzymtest® TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon) mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung im Vergleich mit einer bekannten Vorrichtung durchgeführt, wobei die Röhrchenwand beschichtet war. Das Röhrchen enthielt keine Reagenzkugelnkörper. Die verwendeten Lösungen, beschichteten Röhrchen und Standards entstammen dem Enzymtest® TSH (Boehringer Mannheim GmbH, Bestellnummer 736083). Die Durchführung der Bestimmung erfolgt analog der Vorschrift des Herstellers.

In mit Anti-TSH-Antikörpern beschichtete Röhrchen wurde 1 ml Lösung 1:

Phosphatpuffer	15 mMol/l, pH 6,9
Rinderserumalbumin	0,2 Gew.-%
Merthiolat ²	0,01 Gew.-%

und 200 µl TSH-Standard gegeben und 60 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubiert. Nach 6-maligem Aussaugen und Spülen (?) wird 1 ml einer Lösung aus 40 U/1 Anti-TSH-Peroxidase-Konjugat in obengenannten Puffer zugegeben und 60 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubiert. Die Röhrchen wurden 6-mal ausgesaugt und gespült. Danach wurde 1 ml einer Lösung, bestehend aus

Phosphat-Citrat-Puffer	95 mMol/l, pH 4,4
Natrium-Perborat	3,1 mMol/l
2,2'-Azino-di-[3-Ethyl-Benzthiazolin-Sulfonsäure(6)]-Diamoniumsalz	1,9 mMol/l

zugegeben und 45 Minuten bei 20 bis 25 °C inkubiert. Danach wurde gegen letztgenannte Lösung als Leerwert eine photometrische Bestimmung bei $\lambda = 22$ nm durchgeführt. Tabelle II zeigt die mit verschiedenen Standards erhaltenen Meßergebnisse. Daraus ergibt sich, daß mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung vergleichbar gute Ergebnisse wie mit einer bekannten Vorrichtung für wandbeschichtete Immunoassays erhalten werden können.

Tabelle II

	bekannte Vorrichtung (n = 9)*		erfindungsgemäße, verkürzte Vorrichtung Kunststoffaufsatz (n = 10)*	
	Signal (mE)	VK (%)	Signal (mE)	VK (%)
Standard a	13 ± 1,9	14,7	12 ± 1,3	10,8
Standard b	48 ± 4,5	9,4	60 ± 6,3	6,4
Standard c	98 ± 4,9	5,0	119 ± 4,3	3,5
Standard d	263 ± 7,6	2,9	333 ± 10,3	3,1
Standard e	503 ± 16,4	3,3	617 ± 17,3	2,8
Standard f	876 ± 8,7	1,0	1077 ± 23,4	2,2
Standard g	1508 ± 23,4	1,6	1895 ± 42,0	2,2

* n = Anzahl der Messungen

Ansprüche

1. Vorrichtung zum Abwaschen der Innenfläche eines Reaktionsgefäßes und/oder der Außenfläche wenigstens eines in dem Reaktionsgefäß befindlichen Reagenzkugelskörpers, mit einem an eine Waschflüssigkeit-Absaugeinrichtung anschließbaren, eine Ansaugmündung (2) aufweisenden, mittels einer Feder (4) in Richtung zum Boden des Reaktionsgefäßes zu drückenden Röhrchen (6), mit einem das Röhrchen (6) in axialem Abstand von seiner Ansaugmündung (2) mit radialem Abstand umschließenden Mantel (8), der zwischen seiner Innenfläche und der Außenfläche des Röhrchens (6) einen an eine Waschflüssigkeits-Zuführungseinrichtung anschließbaren Waschflüssigkeits-Zuführungskanal (10) begrenzt, mit in einem der Ansaugmündung (2) zugewandten Endabschnitt des Mantels (8) vorgesehenen Löchern (12) zum Austritt der Waschflüssigkeit und mit zwei außerhalb des Mantels (8) in Abstand voneinander, axial weiter entfernt von der Ansaugmündung (2) als die Löcher (12) im Mantel (8) angeordneten, an einen elektrischen Flüssigkeitspegelfühler anschließbaren Elektroden (14, 16), **dadurch gekennzeichnet**, daß die Innenfläche (18) der Ansaugmündung (2) trichterförmig ausgebildet ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Innenfläche (18) der Ansaugmündung (2) im Achsschnitt konkav gewölbt ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Innenfläche (18) der Ansaugmündung (2) der Außenfläche des Reagenzkugelskörpers angepaßt hohlkugelig gewölbt ist.

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ansaugmündung (2) in einem gesonderten, am freien Ende (20) des Röhrchens (6) befestigten Aufsatz (22) ausgebildet ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Aufsatz (22) auf das freie Ende (20) des Röhrchens (6) aufgesteckt ist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Aufsatz (22) mit dem freien Ende des Röhrchens (6) lösbar verbunden ist.

FIG. 1

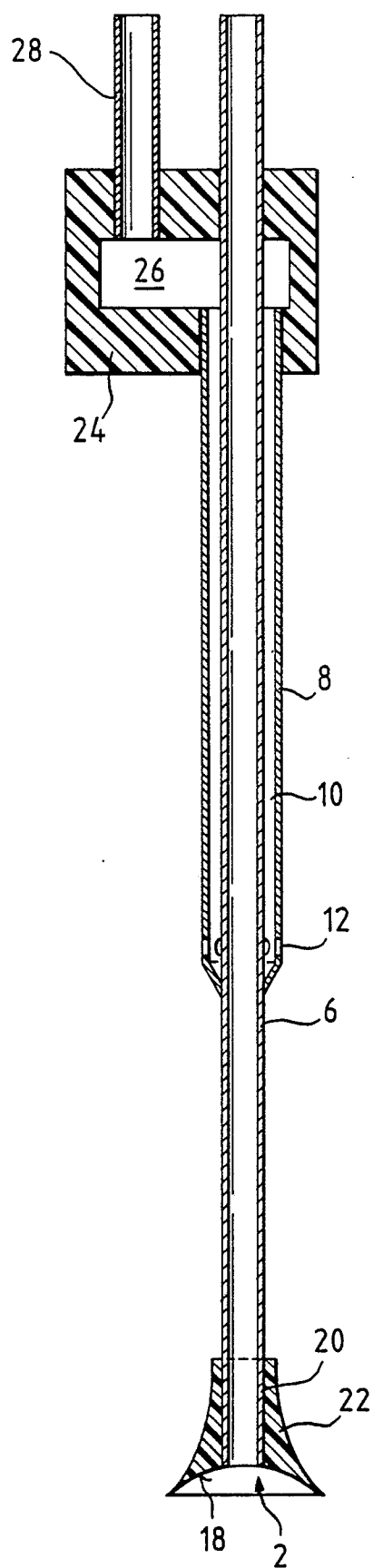
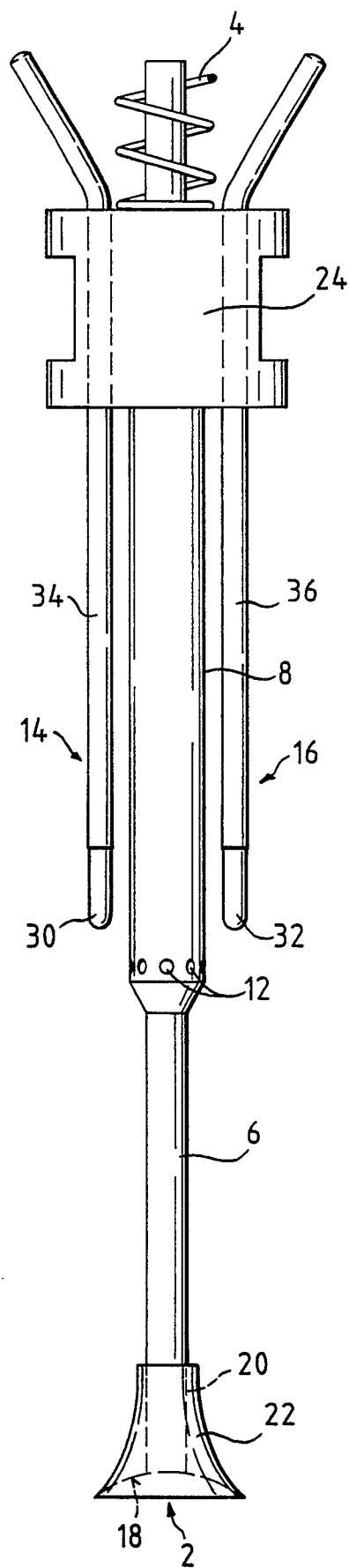


FIG. 2





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 0103

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	EP-A-0 209 353 (TANGHERLINI) * Spalten 3,4; Figuren 1-8 * ---	1	B 01 L 11/00 B 08 B 3/02
A	FR-A-2 354 555 (TECHNICON INSTR. CORP.) * Seite 4, Zeilen 31-38; Figuren 2,3 * ---	1	
A	US-A-4 341 568 (CHRISTENSEN) * Spalte 3, Zeile 36 - Spalte 4, Zeile 26; Figuren 1-4 * ---	1,2,3	
A	FR-A-2 277 630 (ABBOTT LABORATORIES) * Seite 4, Zeilen 6-10; Figuren 1-5 * ---	2,3	
A	DE-A-1 942 201 (RILEY) * Seiten 3-7; Figuren 1-8 * -----	4,5,6	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			B 08 B B 01 L
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 18-04-1989	Prüfer VOLLERING J.P.G.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			