

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 32/2010
(22) Anmeldetag: 13.01.2010
(43) Veröffentlicht am: 15.07.2011

(51) Int. Cl. : **G01N 33/569** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)

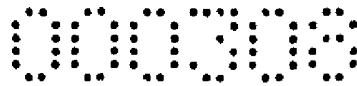
(73) Patentanmelder:
SCHEURINGER KIM
A-2500 BADEN (AT)

(72) Erfinder:
SCHEURINGER KIM
BADEN (AT)

(54) **VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG VON MIKROORGANISMEN**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe umfassend ein flüssigkeitsdurchlässiges festes Medium, das einen Weg für einen Flüssigkeitsfluss definiert, welches Medium entlang des Flüssigkeitswegs im Abstand voneinander vorgesehene Bereiche aufweist, wobei die Bereiche in folgender Reihenfolge in einen Aufgabebereich, einen Reaktionsbereich, einen Nachweisbereich und einen Kontrollbereich unterteilt sind, dadurch gekennzeichnet, dass im Aufgabebereich ein Puffer, vorzugsweise ein Neutralisierungspuffer, in getrocknetem Zustand vorgesehen ist.

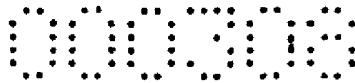
AT 509 276 A1 2011-07-15



- 16 -

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe umfassend ein flüssigkeitsdurchlässiges festes Medium, das einen Weg für einen Flüssigkeitsfluss definiert, welches Medium entlang des Flüssigkeitswegs im Abstand voneinander vorgesehene Bereiche aufweist, wobei die Bereiche in folgender Reihenfolge in einen Aufgabebereich, einen Reaktionsbereich, einen Nachweisbereich und einen Kontrollbereich unterteilt sind, dadurch gekennzeichnet, dass im Aufgabebereich ein Puffer, vorzugsweise ein Neutralisierungspuffer, in getrocknetem Zustand vorgesehen ist.



Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung, ein Verfahren und einen Kit zur Detektion von Mikroorganismen.

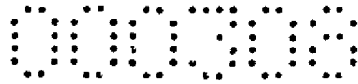
Mikroorganismen können mit verschiedenen Verfahren und Vorrichtungen detektiert werden. Das wohl sensitivste und exakteste Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen ist die Polymerasekettenreaktion, mit dem bereits geringste Mengen an Mikroorganismen spezifisch detektiert werden können. Derartige Verfahren benötigen jedoch aufwendige Apparaturen, die ausschließlich von fachkundigen Personen bedient werden können.

Alternative Methoden zur Bestimmung von Mikroorganismen machen sich Antikörper zunutze, die in der Lage sind spezifisch an ein oder mehrere Epitope eines Mikroorganismus zu binden. Diese Verfahren sind zwar weniger sensitiv als molekularbiologische Methoden (wie z.B. Polymerasekettenreaktion), jedoch einfacher handzuhaben und wesentlich schneller. Um den Gebrauch von Antikörpern zur Bestimmung von Mikroorganismen auch ungeschulten Personen zu ermöglichen, wurden Vorrichtungen, wie Teststreifen, entwickelt. Mit Hilfe von Teststreifen, auf denen Mikroorganismen-spezifische Antikörper immobilisiert sind kann jedermann die Anwesenheit von Mikroorganismen in einer Probe in einfacher Weise feststellen.

Je nach zu bestimmendem Mikroorganismus müssen die Proben vor Verwendung an einem Teststreifen bearbeitet werden. Im Zuge der Probenvorbereitung kann die Probe durch Zugabe von basischen oder sauren Lösungen, mit denen die Mikroorganismen, z.B. lysiert werden, verdünnt werden. Infolgedessen weist die Probe einen pH-Wert auf, der eine Bindung von Antigen zu Antikörper nicht ermöglicht, so dass diese Probe nicht direkt auf einen Teststreifen appliziert werden kann. Daher muss vor dem Auftragen der Probe diese durch Zugabe eines Puffers neutralisiert werden. Durch die Zugabe von Lösungen zur Probe verändert sich deren Volumen, so dass es zu einer weiteren Verdünnung der Probe kommt, wodurch die Sensitivität des Tests signifikant reduziert wird.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, die u.a. die Nachteile des Standes der Technik vermeidet.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe umfassend ein flüssigkeits-



durchlässiges festes Medium, das einen Weg für einen Flüssigkeitsfluss definiert, welches Medium entlang des Flüssigkeitswegs im Abstand voneinander vorgesehene Bereiche aufweist, wobei die Bereiche in folgender Reihenfolge in einen Aufgabebereich, einen Reaktionsbereich, einen Nachweisbereich und einen Kontrollbereich unterteilt sind, dadurch gekennzeichnet, dass im Aufgabebereich ein Puffer, vorzugsweise ein Neutralisierungspuffer, in getrocknetem Zustand vorgesehen ist.

Es hat sich überraschender Weise herausgestellt, dass es möglich ist, um den pH Wert einer unbehandelten oder vorbehandelten Probe auf einen Wert einzustellen, der eine Bindung von Antigen zu Antikörper im Teststreifen ermöglicht, einen Puffer in getrocknetem Zustand im Aufgabebereich vorzusehen. Nach Inkontaktbringen der Probe mit dem getrockneten Puffer wird dieser im flüssigkeitsdurchlässigen festen Medium gelöst, so dass sich dessen Pufferwirkung entfalten kann und die Probe am Medium neutralisiert. Die neutralisierte Probe bewegt sich schließlich in Folge der Kapillarwirkung des Mediums in diesem weiter zu den weiteren Bereichen der Vorrichtung (Reaktionsbereich, Nachweisbereich und Kontrollbereich).

Das Vorsehen eines Puffers in getrocknetem Zustand im Aufgabebereich hat den Vorteil, dass der Benützer der Vorrichtung keine oder eine weniger aufwendige Probenvorbereitung durchführen muss, da ein wichtiger Schritt (der des Neutralisierens, falls notwendig) direkt im Aufgabebereich der erfindungsgemäßen Vorrichtung erfolgt.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann im Prinzip jeder Teststreifen sein, der im Stand der Technik bekannt ist.

Das flüssigkeitsdurchlässige feste Medium bzw. der flüssigkeitsdurchlässige feste Träger, welches bzw. welcher erfindungsgemäß eingesetzt werden kann, kann grundsätzlich aus jeglichem Material sein, das eine gewissen Porosität aufweist, wobei besonders bevorzugt poröse Träger, umfassend Nitrocellulose, Nylon, PTFE, Polystyrol, Latex, Glasfasern, Kieselgel, Aluminiumoxid, Cellulose, Dextran, Agarose, Polyvinylalkohol, in Frage kommen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann neben einem oder mehreren flüssigkeitsdurchlässigen festen Medium(en) selbstverständlich auch weitere Medien bzw. Materialien umfassen, die andere Eigenschaften aufweisen. So ist es z.B. möglich zusätzlich einen nicht-flüssigkeitsdurchlässigen Träger in der Vorrichtung

vorzusehen, auf dem das flüssigkeitsdurchlässige feste Medium aufliegt und dieses stabilisiert.

„Im Aufgabebereich“, wie oben angeführt, bedeutet, dass der Puffer sich entweder direkt im flüssigkeitsdurchlässigen festen Medium befindet oder dass ein weiteres flüssigkeitsdurchlässiges festes Medium nach dem Aufgabebereich angeordnet ist.

Der Begriff „Puffer in getrocknetem Zustand“, bedeutet, dass das Medium im Aufgabebereich einen Puffer umfasst, der getrocknet ist. Ein derartiges Medium ist durch Inkontaktbringen des Mediums mit einem flüssigen Puffer erhältlich, gefolgt von einem Trocknungsprozess zum Entfernen des im Aufgabebereich befindlichen Wassers bzw. Lösungsmittels. Durch diese Vorgehensweise ist ein Aufgabebereich erhältlich, der einen Puffer in getrocknetem Zustand umfasst.

Es hat sich erfindungsgemäße gezeigt, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung insbesondere gut geeignet ist Chlamydien nachzuweisen.

Chlamydien verursachen verschiedene akute und zum Teil auch chronische Erkrankungen beim Menschen. Typische Erkrankungen, die von Chlamydien verursacht werden, sind venerische Urogenital-Infektionen, Augeninfektionen und atypische Pneumonien. Die Gattung *Chlamydia* enthält die Spezies *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci*.

Chlamydia trachomatis ist primär für den Menschen krankheitserregend. Bei *Chlamydia trachomatis* werden 18 Serotypen unterschieden und es ist der häufigste bakterielle Erreger sexuell übertragbarer Infektionen.

Chlamydia trachomatis kann beispielsweise je nach Manifestationsform der Serotype zu Augeninfektionen bis hin zur Erblindung führen.

Um rechtzeitig eine Chlamydieninfektion zu diagnostizieren und infolgedessen rechtzeitig eine Therapie zu beginnen, um Komplikationen zu verhindern, ist es von entscheidender Bedeutung eine derartige Infektion rasch zu diagnostizieren.

Der Nachweis von Chlamydien mittels Teststreifen benötigt gemäß Stand der Technik ein Aufschließen der Mikroorganismen mit einem sauren oder basischen Puffer gefolgt von einem Neutralisierungsschritt, bei dem ein entsprechender basischer oder saurer Puffer eingesetzt wird. Durch die Neutralisierung des pH-Werts der Probe wird die Detektion von Chlamydien in einer Probe

erst ermöglicht.

Neben Chlamydien gibt es eine Vielzahl weiterer Mikroorganismen, die für den Menschen von Bedeutung sind. Beispiele solcher Mikroorganismen sind Gonokokken, die für Gonorrhoe verantwortlich sind, und Pilze.

Die am Markt üblichen Diagnosetests zur Bestimmung von mikrobiellen Infektionen sind Kits, welche zumindest teilweise von Fachpersonal angewendet werden müssen oder welche ausschließlich im Labor Anwendung finden. Daher ist die rasche Feststellung, ob eine mikrobielle Infektion vorkommt, für die betroffene Person nicht möglich.

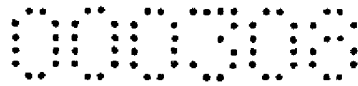
Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auch Teil eines Kits zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe sein, der folgende Komponenten umfasst:

- a) mindestens ein Mittel zur Probennahme, vorzugsweise mindestens einen Wattetupfer oder ein Tampon,
- b) ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, und geeignet zur Aufnahme des Mittels zur Probennahme, vorzugsweise des Wattetupfers oder Tampons,
- c) eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8. Mit dem erfindungsgemäßen Kit ist es aufgrund der einfachen Handhabung der einzelnen Bestandteile erstmals möglich, eine mikrobielle Infektion zu diagnostizieren.

Die bereitgestellten Mittel zur Probennahme, vorzugsweise ein Wattetupfer oder ein Tampon, die idealerweise in steriler Form dem Kit beigegeben sind, dienen dazu die zu untersuchende Probe zu entnehmen. Mit diesen Mitteln können beispielsweise Abstriche, wie Vaginalabstriche, vorgenommen werden.

Um die in der Probe möglicherweise vorkommenden Mikroorganismen besser bestimmen zu können, werden die Probeentnahmemittel mit einem Puffer in Kontakt gebracht, welcher die Zellen größtenteils aufschließt. Durch diesen Aufschluss werden die Epitope der Zellen, beispielsweise, für Antikörper, besser zugänglich, wodurch der Nachweis der Zellen mit erhöhter Effizienz erfolgen kann.

Der Behälter, der geeignet ist die Probeentnahmemittel aufzunehmen, umfasst vorzugsweise eine Mindestmenge an Puffer von 50-1000 µl, vorzugsweise 100-500 µl, insbesondere 300 µl, die



ausreichend ist um die Zellen aufzuschließen und vom Mittel herunterzulösen, sodass die Zellen bzw. Zellfragmente in der Lösung verbleiben.

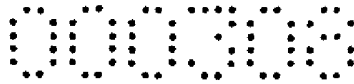
Da der Aufschluss der Mikroorganismen entweder im basischen oder sauren pH-Bereich durchgeführt wird, ist es notwendig die Probenlösung entweder mit einem sauren oder basischen Puffer zu neutralisieren, bevor diese mit einem Mittel zur Detektion von Mikroorganismen in Kontakt gebracht wird. Handelt es sich bei dem Mittel zur Detektion von Mikroorganismen nämlich z.B. um Antikörper kann ein zu saurer bzw. zu basischer pH-Wert dazu führen, dass die Bindung von Antikörpern an Antigene stark reduziert wird, so dass keine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung mehr möglich ist. Es ist wesentlich, dass bei der Verwendung eines sauren Aufschlüsselungsreagenzes ein basischer Neutralisierungspuffer eingesetzt wird und umgekehrt.

Mittel zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, sind in der Fachwelt hinreichend bekannt. Aufgrund des Einsatzgebiets des erfindungsgemäßen Kits und insbesondere aufgrund des Personenkreises, der den erfindungsgemäßen Kit bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung anwendet, ist es von Vorteil, dass derartige Mittel möglichst einfach und unkompliziert aufgebaut und ohne die Verwendung aufwendiger Apparaturen anwendbar sind. Solche Mittel sind in der Fachwelt hinreichend bekannt und werden bereits häufig eingesetzt. Der Großteil dieser Nachweismittel beruht auf der Bindung von Antikörpern an Oberflächenantigene der zu bestimmenden Mikroorganismen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Behältnis b) einen basischen Puffer mit einem pH-Wert von 7 bis 14, vorzugsweise 10 bis 14, noch mehr bevorzugt 11 bis 13, insbesondere 12,7, oder einen sauren Puffer mit einem pH-Wert von 1 bis 7, vorzugsweise 1 bis 6,5, noch mehr bevorzugt von 2,5 bis 6,5, wobei der Kit jeweils einen basischen und einen sauren Puffer umfasst.

Der erfindungsgemäße Kit umfasst - wie eingangs erwähnt - ein Behältnis mit einem Aufschlusspuffer. Je nach Art des gewählten Aufschlusses (sauer oder basisch) ist der getrocknete Neutralisierungspuffer auszuwählen (sauer oder basisch).

Der basische Puffer umfasst vorzugsweise 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 g, NaOH, 3 bis 4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),



1 bis 3 g, insbesondere ca. 2 g, Natrium-Salz des Cholhydrats in 1 L Wasser.

Der saure Puffer umfasst vorzugsweise 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , 2 bis 8 ml, vorzugsweise 3 bis 6 ml, insbesondere 5 ml, eines Gemisches aus 2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Proclin) in 1 L Wasser, wobei der pH-Wert auf pH 6 bis 6,5 eingestellt ist.

Der pH-Wert dieses Puffers kann durch die Zugabe von Säure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt werden, wobei vorzugsweise HCl verwendet wird.

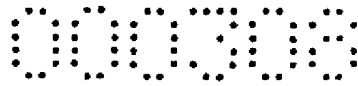
Der saure Puffer umfasst vorzugsweise 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , in 1 L Wasser, wobei der pH-Wert auf pH 1 bis 3, insbesondere auf pH 2,5, eingestellt ist.

Der Teststreifen umfasst vorzugsweise einen festen Träger aus einem saugfähigen Medium, welches Medium in einen Aufgabebereich, in einen Reaktionsbereich, in mindestens einen Nachweisbereich und in mindestens einen Kontrollbereich unterteilt ist.

Im Reaktionsbereich sind vorzugsweise Antikörper mobil angeordnet, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei die Antikörper vorzugsweise mit einem Farbstoff, gefärbten, fluoreszierenden oder magnetischen Partikeln, insbesondere Latexpartikeln, oder mit kolloidalem Gold markiert sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind im Nachweisbereich Antikörper immobilisiert, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei das Epitop des Antigens in der Lage ist, oder nicht in der Lage ist, an den im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden. Erfindungsgemäß können im Nachweisbereich Antikörper immobilisiert sein, die an dasselbe oder ein anderes Epitop eines Antigens des zu bestimmenden Mikroorganismen binden. Es hat sich herausgestellt, dass die Teststreifen, welche in der US 5,073,484 und US 5,654,162 beschrieben sind, am besten geeignet sind, um im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden.

Im Kontrollbereich sind vorzugsweise Antikörper immobilisiert, die in der Lage sind an die im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden.



Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen das Behältnis b) 50-1000 µl, vorzugsweise 100-500 µl, insbesondere 300 µl, des jeweiligen Puffers.

Um zu testen, ob die Mittel zum Nachweisen der Mikroorganismen ordnungsgemäß funktionieren, umfasst der Kit vorzugsweise weiters eine Positivkontrolle.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst Puffer b) einen pH Indikator, vorzugsweise Bromthymolblau, vorzugsweise in einer Menge von 0,001 bis 0,005 g, insbesondere in einer Menge von 0,003 g.

Die Zugabe eines Indikators erlaubt es dem Anwender festzustellen, ob der pH-Wert des Reagenzes den Erfordernissen entspricht und als neutralisiert angesehen werden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose einer mikrobiellen Infektion, insbesondere einer Chlamydien-, Gonokokken- oder Pilzinfektion, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen eines Mittels zur Probennahme, vorzugsweise mindestens eines Wattetupfers oder eines Tampons,

b) Probennahme,

c) Überführen der am Mittel zur Probennahme befindlichen Probe in ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen,

d) Inkubieren der Probe mit dem Puffer für 5 Sekunden bis 30 Minuten, vorzugsweise für 30 Sekunden bis 15 Minuten, mehr bevorzugt für 1 bis 10 Minuten, insbesondere für 5 Minuten,

e) Überführen des neutralisierten Puffers in eine Vorrichtung gemäß der vorliegenden Erfindung zum Detektieren eines oder mehrerer Mikroorganismen, und f) Diagnostizieren einer mikrobiellen Infektion, wenn in Schritt e) Mikroorganismen detektiert werden.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Puffer und Mittel sind bereits oben beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Kits zur Bestimmung einer mikrobiellen Infektion, insbesondere einer Chlamydien-, Gonokokken- oder Pilzinfektion.

Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels eingehender erläutert, ohne jedoch auf die-



ses beschränkt zu sein.

BEISPIELE:

B e i s p i e l 1:

Dieses Beispiel zeigt den Nachweis von Chlamydia trachomatis, einer der drei bekannten Spezies aus der Familie der Chlamydien-Bakterien, Infektionen mit Chlamydia trachomatis sind die häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Allein für Deutschland wird die Zahl der Neuinfektionen auf 300.000 bis 500.000 pro Jahr geschätzt. Jüngere Erwachsene (15-25 Jahre), Personen mit häufig wechselndem Geschlechtspartner, Sexualpartner (auch unbemerkt und symptomlos) infizierter Personen sowie Neugeborene infizierter Mütter sind am häufigsten betroffen. Infektionen ohne Sexualkontakt (z.B. im Schwimmbad) sind selten, aber nicht auszuschließen.

Chlamydia trachomatis-Infektionen verursachen häufig keine Symptome. Chlamydia trachomatis kann jedoch auch zu Beschwerden, wie Augenentzündungen, Arthritis und Entzündungen des Harntraktes, führen. Weiters führen unbehandelte Infektionen häufig zu Unfruchtbarkeit und erhöhen das Risiko von Eileiterschwangerschaften und Frühgeburten. In den Entwicklungsländern sind Infektionen mit Chlamydia trachomatis die häufigste Ursache für das Erblinden von Neugeborenen.

Besonders wichtig ist eine Behandlung von Chlamydien-Infektionen in der Schwangerschaft. Rund 50 % der infizierten Mütter geben die Infektion an das Neugeborene weiter. Häufige Komplikationen beim Neugeborenen sind Bindehautentzündungen und Lungenentzündung.

Vorbereitungen

Testkomponenten: Probebehälter mit 300 µl Puffer A, kleine Flasche mit 400 µl Puffer B, Abstrichtupfer (=SWAB) und Folienverpackung mit Teststreifen und Trockenmittel

Puffer A

NaOH	4g
EDTA	3,722 g
Natriumcholhydrat	2 g
Water	1 L
pH 12,7	



Puffer B

KH_2PO_4 4,47 g

Na_2HP_4 7,87 g

Proclin 5 ml

pH Einstellung mit HCl auf pH6,4

Der Abstrichtupfer (=SWAB) wurde vorsichtig bis zum Gebärmutterhals (Ende des Vaginalkanals) eingeführt. Der Abstrichtupfer wurde gleichmäßig für ca. 30 Sekunden gedreht und langsam herausgezogen.

Da sich in der Pufferflasche bewusst wenig Flüssigkeit befindet, musste diese durch Schütteln am Flaschenboden gesammelt werden.

Der Abstrichtupfer wurde mit der Probe bis zum Flaschenboden eingetaucht. Der Abstrichtupfer wurde in der Flüssigkeit gedreht und mehrfach an der Seitenwand ausgedrückt, damit sich ihr Probenmaterial gut in der Pufferlösung verteilt.

Der Abstrichtupfer wurde für ca. 5 Minuten in der Flasche belassen.

Aus der kleinen Pufferflasche B wurden 6 Tropfen in die große Pufferflasche A getropft.

Die Pufferflasche A wurde verschlossen und geschwenkt.

2 Tropfen der Probe wurden auf das Probenaufgabefeld des Teststreifens (US 5,073,484, US 5,654,162, Glad et al., Acta Chem. Scand. 6:449-450 (1980), Glad et al, Anal. Bioch. 85:180 (1978), Norgard-Pederson, Clinica Chemica Acta 48:345 (1973) und Laurell et al., Methods in Enzymology, 73, Part B, 339 et seq. (1981)) aufgebracht.

Nach ca. 15 Minuten konnte das Testergebnis am Teststreifen abgelesen werden.

B e i s p i e l 2: Vergleich der Standard Kassetten chlamy-CARE-C (siehe Beispiel 1) mit modifizierten Kassetten, die eine zusätzliche Membrane getränkt im Puffer B aus Beispiel 1 umfassen.

Für die Durchführung eines Chlamydien-Tests, wie in Beispiel 1 beschrieben ist die Verwendung von Puffer A und B in 2 Schritten notwendig.

Es wird nun geprüft ob man eine präparierte und im Puffer B getränkte Membrane in die Kassette einbauen kann und dadurch ein Schritt bei der Test Durchführung erspart werden kann.

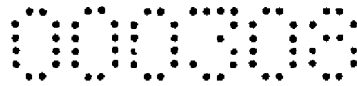
000308

- 11 -

Kon- trolle 1								
Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Kon- trolle 2								
Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Kon- trolle 3								
Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Kon- trolle 4								
Pos.	Schwach	Schwach	Schwach	Schwach	Schwach	Schwach	Schwach	Schwach
Kon- trolle 5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

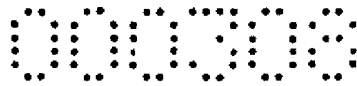
Ergebnisse:

Alle Kassetten zeigten gleiche Ergebnisse. Bei der präpa-
rierten Kassetten waren die Linien ein wenig stärker.



Ansprüche:

1. Vorrichtung zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe umfassend ein flüssigkeitsdurchlässiges festes Medium, das einen Weg für einen Flüssigkeitsfluss definiert, welches Medium entlang des Flüssigkeitswegs im Abstand voneinander vorgesehene Bereiche aufweist, wobei die Bereiche in folgender Reihenfolge in einen Aufgabebereich, einen Reaktionsbereich, einen Nachweisbereich und einen Kontrollbereich unterteilt sind, dadurch gekennzeichnet, dass im Aufgabebereich ein Puffer, vorzugsweise ein Neutralisierungspuffer, in getrocknetem Zustand vorgesehen ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Reaktionsbereich Antikörper mobil angeordnet sind, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei die Antikörper vorzugsweise mit einem Farbstoff, gefärbten, fluoreszierenden oder magnetischen Partikeln, insbesondere Latexpartikeln, oder mit kolloidalem Gold markiert sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Nachweisbereich Antikörper immobilisiert sind, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei das Epitop des Antigens in der Lage ist oder nicht in der Lage ist, an den im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Kontrollbereich Antikörper immobilisiert sind, die in der Lage sind an die im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Puffer ein basischer Puffer mit einem pH-Wert von 7 bis 14, vorzugsweise 11 bis 13, insbesondere 12,7, oder ein saurer Puffer mit einem pH-Wert von 1 bis 7, vorzugsweise von 2,5 bis 6,5, ist.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der



basische Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 g, NaOH, 3 bis 4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 bis 3 g, insbesondere ca. 2 g, das Natrium-Salz des Cholhydrats in 1 L Wasser umfasst.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass der saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , 2 bis 8 ml, vorzugsweise 3 bis 6 ml, insbesondere 5 ml, eines Gemisches aus 2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Proclin) in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH-Wert auf pH 6 bis 6,5 eingestellt ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass das saure Reagenz 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH Wert auf pH 1 bis 3, insbesondere auf pH 2,5, eingestellt ist

9. Kit zur Bestimmung von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, in einer Probe umfassend:

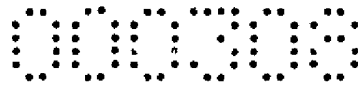
a) mindestens ein Mittel zur Probennahme, vorzugsweise mindestens ein Wattetupfer oder ein Tampon,

b) ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen, und geeignet zur Aufnahme des Mittels zur Probennahme, vorzugsweise des Wattetupfers oder Tampons,

c) eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

10. Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis b) einen basischen Puffer mit einem pH-Wert von 10 bis 14, vorzugsweise 11 bis 13, insbesondere 12,7, oder einen sauren Puffer mit einem pH-Wert von 1 bis 6,5, vorzugsweise von 2,5 bis 6,4, umfasst, wobei der Kit jeweils einen basischen oder einen sauren Puffer zum Aufschließen von Mikroorganismen umfasst.

11. Kit nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass der basische Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 g, NaOH, 3 bis 4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 bis 3 g, insbesondere ca. 2 g, das Natrium-Salz des Cholhydrats in 1 L Wasser umfasst.



12. Kit nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass der saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , 2 bis 8 ml, vorzugsweise 3 bis 6 ml, insbesondere 5 ml, eines Gemisches aus 2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Proclin) in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH-Wert auf pH 6 bis 6,5 eingestellt ist.

13. Kit nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass der saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH Wert auf pH 1 bis 3, insbesondere auf pH 2,5, eingestellt ist

14. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis b) 50-1000 μl , vorzugsweise 100-500 μl , insbesondere 300 μl , des Puffers umfasst.

15. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Kit weiters eine Positivkontrolle umfasst.

16. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass Puffer b) einen pH Indikator, vorzugsweise Bromthymolblau, vorzugsweise in einer Menge von 0,001 bis 0,005 g, insbesondere in einer Menge von 0,003 g umfasst.

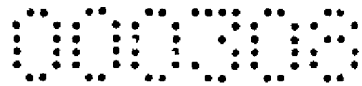
17. Verfahren zur Diagnose einer mikrobiellen Infektion, insbesondere einer Chlamydien-, Gonokokken- oder Pilzinfektion, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen eines Mittels zur Probennahme, vorzugsweise mindestens eines Wattetupfers oder eines Tampons,

b) Probennahme,

c) Überführen der am Mittel zur Probennahme befindlichen Probe in ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Mikroorganismen, insbesondere von Chlamydien, Gonokokken und Pilzen,

d) Inkubieren der Probe mit dem Puffer für 5 Sekunden bis 30 Minuten, vorzugsweise für 30 Sekunden bis 15 Minuten, mehr bevorzugt für 1 bis 10 Minuten, insbesondere für 5 Minuten, e) Überführen des neutralisierten Puffers in eine Vorrichtung gemäß



- 15 -

einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Detektieren eines oder mehrerer Mikroorganismen, und

f) Diagnostizieren einer mikrobiellen Infektion, wenn in Schritt e) Mikroorganismen detektiert werden.

18. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer mikrobiellen Infektion, insbesondere einer Chlamydien-, Gonokokken- oder Pilzinfektion.

Ansprüche:

1. Vorrichtung zur Bestimmung von Chlamydien oder Gonokokken, in einer Probe umfassend ein flüssigkeitsdurchlässiges festes Medium, das einen Weg für einen Flüssigkeitsfluss definiert, welches Medium entlang des Flüssigkeitswegs im Abstand voneinander vorgesehene Bereiche aufweist, wobei die Bereiche in folgender Reihenfolge in einen Aufgabebereich, einen Reaktionsbereich, einen Nachweisbereich und einen Kontrollbereich unterteilt sind, dadurch gekennzeichnet, dass im Aufgabebereich ein Neutralisierungspuffer in getrocknetem Zustand vorgesehen ist, wobei der Puffer ein basischer Puffer mit einem pH-Wert von 11 bis 13, insbesondere 12,7, oder ein saurer Puffer mit einem pH-Wert von 2,5 bis 6,5 ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Reaktionsbereich Antikörper mobil angeordnet sind, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei die Antikörper vorzugsweise mit einem Farbstoff, gefärbten, fluoreszierenden oder magnetischen Partikeln, insbesondere Latexpartikeln, oder mit kolloidalem Gold markiert sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass im Nachweisbereich Antikörper immobilisiert sind, die in der Lage sind an ein Epitop eines Oberflächenantigens der zu bestimmenden Mikroorganismen zu binden, wobei das Epitop des Antigens in der Lage ist oder nicht in der Lage ist, an den im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Kontrollbereich Antikörper immobilisiert sind, die in der Lage sind an die im Reaktionsbereich mobil angeordneten Antikörper zu binden.
5. Vorrichtung nach einer der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der basische Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 g, NaOH, 3 bis 4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 bis 3 g, insbesondere ca. 2 g, das Natrium-Salz des Cholsäurehydrats in 1 L Wasser umfasst.

NACHGEFERTIGT

6. Vorrichtung nach einen de Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , 2 bis 8 ml, vorzugsweise 3 bis 6 ml, insbesondere 5 ml, eines Gemisches aus 2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Proclin) in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH-Wert auf pH 6 bis 6,5 eingestellt ist.

7. Vorrichtung nach einen der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das saure Reagenz 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH Wert auf pH 1 bis 3, insbesondere auf pH 2,5, eingestellt ist

8. Kit zur Bestimmung von Chlamydien oder Gonokokken, in einer Probe umfassend:

a) mindestens ein Mittel zur Probennahme, vorzugsweise mindestens ein Wattetupfer oder ein Tampon,

b) ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Chlamydien oder Gonokokken und geeignet zur Aufnahme des Mittels zur Probennahme, vorzugsweise des Wattetupfers oder Tampons,

c) eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

9. Kit nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis b) einen basischen Puffer mit einem pH-Wert von 10 bis 14, vorzugsweise 11 bis 13, insbesondere 12,7, oder einen sauren Puffer mit einem pH-Wert von 1 bis 6,5, vorzugsweise von 2,5 bis 6,4, umfasst, wobei der Kit jeweils einen basischen oder einen sauren Puffer zum Aufschließen von Chlamydien oder Gonokokken umfasst.

10. Kit nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der basische Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 g, NaOH , 3 bis 4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1 bis 3 g, insbesondere ca. 2 g, das Natrium-Salz des Cholsäurehydrats in 1 L Wasser umfasst.

11. Kit nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der

NACHGEFERTIGT

saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , 2 bis 8 ml, vorzugsweise 3 bis 6 ml, insbesondere 5 ml, eines Gemisches aus 2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Proclin) in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH-Wert auf pH 6 bis 6,5 eingestellt ist.

12. Kit nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass der saure Puffer 3 bis 5 g, vorzugsweise 4 bis 4,5 g, KH_2PO_4 , 5 bis 9 g, vorzugsweise 7 bis 8 g, Na_2HPO_4 , in 1 L Wasser umfasst, wobei der pH Wert auf pH 1 bis 3, insbesondere auf pH 2,5, eingestellt ist

13. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Behältnis b) 50-1000 μl , vorzugsweise 100-500 μl , insbesondere 300 μl , des Puffers umfasst.

14. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Kit weiters eine Positivkontrolle umfasst.

15. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass Puffer b) einen pH Indikator, vorzugsweise Bromthymolblau, vorzugsweise in einer Menge von 0,001 bis 0,005 g, insbesondere in einer Menge von 0,003 g umfasst.

16. Verfahren zur Diagnose einer Chlamydien- oder Gonokokkeninfektion, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen eines Mittels zur Probennahme, vorzugsweise mindestens eines Wattetupfers oder eines Tampons,

b) Probennahme,

c) Überführen der am Mittel zur Probennahme befindlichen Probe in ein Behältnis umfassend einen Puffer zum Aufschließen von Chlamydien oder Gonokokken,

d) Inkubieren der Probe mit dem Puffer für 5 Sekunden bis 30 Minuten, vorzugsweise für 30 Sekunden bis 15 Minuten, mehr bevorzugt für 1 bis 10 Minuten, insbesondere für 5 Minuten, e) Überführen des neutralisierten Puffers in eine Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zum Detektieren von Chlamydien oder Gonokokken, und

f) Diagnostizieren einer Chlamydien- oder Gonokokkeninfekti-

NACHGEFOLGT

on, wenn in Schritt e) Chlamydien oder Gonokokken detektiert werden.

17. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 8 bis 15 zur Bestimmung einer Chlamydien- oder Gonokokkeninfektion.

NACHGEREICHT

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : G01N 33/569 (2006.01); G01N 33/53 (2006.01); G01N 33/537 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: G01N 33/569D6, G01N 33/53B, G01N 33/537		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): G01N		
Konsultierte Online-Datenbank: Epodoc, Wpi, TXT		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 13. Jänner 2010 eingereichten Ansprüchen 1-4,6-14,16-18 erstellt.		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	US5773234A (PRONOVOST et al.) 30. Juni 1998 (30.06.1998) <i>*Spalte 1, Spalte 5 Zeile 65 bis Spalte 6 Zeile 11, Spalte 6 Zeile 57 bis Spalte 7 Zeile 14 und Zeilen 44 bis 57, Spalte 8 Zeilen 36-49, Ansprüche, Figuren*</i> --	1-4,6-14,16-18
X	US2005130120A1 (LAMBOTTE et al.) 16. Juni 2005 (16.06.2005) <i>*[0003], [0009], [0013], [0056], [0059], [0061], [0062], [0075], [0090], [0099], [0100]*</i> --	1-4,6-14,16-18
X	US2006154315A1 (CHENG et al.) 13. Juli 2006 (13.07.2006) <i>*[0034], [0036]-[0039],[0045], [0053], [0076], [0138], Ansprüche*</i> ----	1-4,6-14,16-18
Datum der Beendigung der Recherche: 13. Juli 2010		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Dr. GÖRNER
⁸ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmel- gegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		