



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.: C 12 M 1/34
A 61 B 10/00

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



PATENTSCHRIFT A5

11

628 087

21 Gesuchsnummer: 14652/76

22 Anmeldungsdatum: 22.11.1976

30 Priorität(en): 30.12.1975 HU LA 880

24 Patent erteilt: 15.02.1982

45 Patentschrift
veröffentlicht: 15.02.1982

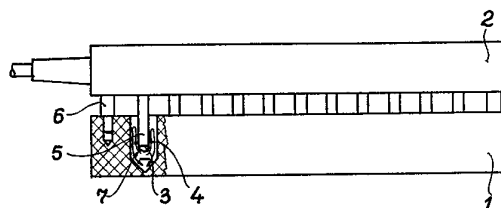
73 Inhaber:
Labor Múszertipari Művek, Esztergom (HU)

72 Erfinder:
Dr. Gyula Takatsy, Budapest XIV (HU)
Dr. Katalin Barb, Budapest XII (HU)
Dipl.-Ing. Istvan Murany, Budapest IX (HU)
Dipl.-Ing. Gabriella Burda-Fixmer, Budapest XIX (HU)

74 Vertreter:
Dipl.-Ing. R. Rottmann & Co., Zollikon

54 Vorrichtung zur Bestimmung der Influenz-Neuraminidase.

57 Die Vorrichtung besteht aus einer Titrierplatte (1) und einer Heizauflage (2). In der Titrierplatte (1) befinden sich Bohrungen (4), in welche ein Reaktionsgemisch eingefüllt wird. Um dies Reaktionsgemisch erwärmen zu können, sind an der Heizauflage (2) Heizelemente (7) so angeordnet, dass sie mit den Bohrungen (4) der Titrierplatte übereinstimmen. Durch ein Positionierelement (6) wird sowohl Höhe wie auch Lage der Heizelemente (7) bestimmt. Die Reaktionsflüssigkeit in den Bohrungen wird durch die Spitzen (3) der Heizelemente (7) auf die gewünschte Temperatur erwärmt.



PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Bestimmung der Influenz-Neuraminidase, dadurch gekennzeichnet, dass sie über eine mit das Reaktionsgemisch aufnehmenden Bohrungen (4) versehene Titrierplatte (1), eine mit in die Bohrungen (4) der Titrierplatte (1) einsenkbaaren Heizelementen (7) versehene Heizaufgabe (2) und über die Heizaufgabe (2) in bezug auf die Titrierplatte (1) positionierende Elemente (6) verfügt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Heizelemente (7) wärmeisolierende Schäfte (5) und Heizspitzen (3) aufweisen.

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung, mit welcher die Influenz-Neuraminidase bestimmt werden kann.

Eine der wichtigsten laboratoriumsmässigen Aufgaben im Kampf gegen die Influenz (Grippe) besteht darin, die ständigen Veränderungen des Oberflächeneiweisses (der Hülle) des Virus so schnell wie möglich und so genau wie möglich zu bestimmen, da nur in Kenntnis dieser Veränderungen wirksame Impfstoffe hergestellt werden können beziehungsweise Informationen darüber erhalten werden können, in welchem Masse die Bevölkerung gegen Grippe geschützt ist.

Für die laboratoriumsmässige Untersuchung des einen der beiden Oberflächeneiweisse beziehungsweise Antigene des Grippe-Virus, und zwar des sogenannten Haemagglutinins, steht eine Mikromethode zur Verfügung. Die Untersuchung des zweiten Oberflächenantigens, des sogenannten Neuraminidase-Enzyms, kann jedoch gegenwärtig nur mit Hilfe der ausserordentlich umständlichen und komplizierten Epruvettenmethode vorgenommen werden.

Diese Methode beruht auf der Grundlage, dass das Oberflächenantigen des Virus in seiner Eigenschaft als Enzym imstande ist, aus einem geeigneten Mucoprotein-Substrat N-Acetylneuraminsäure (NANA) freizusetzen. Diese kann durch Zugabe geeigneter Reagentien kolorimetrisch bestimmt werden. Aus der Aktivität des Enzyms kann einesteils auf die Eigenschaften der Oberflächenantigene des Virus, zum anderen durch die Hemmung der Enzyme mittels spezifischer Antikörper auf die Verwandtschaftsverhältnisse der Viren beziehungsweise die Spezifität der Antikörper geschlossen werden.

Die gegenwärtig angewendete Epruvettenmethode ist daher schwierig und kompliziert, weil die Farbreaktion lediglich in einem bestimmten engen Temperaturbereich (90-95°C) vor sich geht beziehungsweise nur in diesem Temperaturbereich stabil ist. Da die Farbstanz unter diesen Bedingungen für kolorimetrische Messungen ungeeignet ist, muss sie aus dem Gemisch mit Butanol ausgeschüttelt und zentrifugiert werden. Auch dabei muss jedoch schnell gearbeitet werden, da sich die Farbreaktion zwischenzeitlich ändern kann. Die Epruvetten müssen einzeln behandelt werden, die Farbintensität muss mit einem Spektrophotometer bestimmt werden, und dies macht die Reaktion derart umständlich, dass Massenuntersuchungen mit dieser Methode beinahe unmöglich sind. Gerade durch Massenuntersuchungen könnte jedoch nicht nur ein Vergleich der Viren durchgeführt werden, sondern sie wäre auch für den Erhalt von Informationen über die Geschütztheit der Bevölkerung von hoher Wichtigkeit.

Ziel der Erfindung ist es, die genannten Nachteile zu beseitigen und eine Vorrichtung auszuarbeiten, mit der die Messungen an einer grossen Zahl von Objekten ohne Schwierigkeiten innerhalb kurzer Zeit kontinuierlich mit geringem Arbeitsaufwand durchgeführt werden können.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass obiges Ziel erreicht werden kann, wenn unter Anwendung des Mikroprinzips die Reaktion nicht in Epruvetten, sondern in den Vertiefungen einer speziell für diesen Zweck ausgebildeten Titrier-

platte vorgenommen wird. Das Aufheizen des Reaktionsgemisches geschieht vorteilhafterweise mit einem speziellen Heizeinsatz.

Gegenstand der Erfindung ist demnach eine Vorrichtung zur Bestimmung der Influenz-Neuraminidase. Das Wesen der erfindungsgemässen Vorrichtung besteht darin, dass sie über eine mit das Reaktionsgemisch aufnehmenden Bohrungen versehene Titrierplatte, eine mit in die Bohrungen der Titrierplatte einsenkbaaren Heizelementen versehene Heizaufgabe und über die Heizaufgabe in bezug auf die Titrierplatte positionierende Elemente verfügt. Die Heizelemente können zweckmässig einen wärmeisolierenden Schaft und eine Heizspitze haben.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnung in Zusammenhang mit einer konkreten Ausführungsform der erfindungsgemässen Vorrichtung näher erläutert. Die Abbildung zeigt die erfindungsgemässe Vorrichtung in zum Teil geschnittener Seitenansicht.

Die Vorrichtung besteht aus einer Titrierplatte 1 und einer Heizaufgabe 2. In der Titrierplatte 1 sind zur Aufnahme des Reaktionsgemisches dienende Bohrungen 4 ausgebildet. Auf der Heizaufgabe 2 sind in einer der Verteilung der Bohrungen 4 der Titrierplatte 1 entsprechenden Weise Heizelemente 7 angeordnet. Der Schaft 5 der Heizelemente 7 ist aus wärmeisolierendem Material gefertigt, ihre Spitzen 3 sind als Heizspitzen ausgebildet. Für die Führung (Positionierung) der Titrierplatte 1 und der Heizaufgabe 2 zueinander sind Positionierelemente 6 vorgesehen, welche im Falle der als Beispiel gewählten Ausführungsform aus einem sich an die Heizaufgabe 2 anschliessenden Zapfen und den in der Titrierplatte 1 ausgebildeten Bohrungen bestehen.

Bei der erfindungsgemässen Vorrichtung wird die Reaktion in den Bohrungen 4 der Titrierplatte 1 vorgenommen. Die Verdünnungen der Antikörper für die Enzymbeziehungsweise Enzymhemmreaktion werden mit der Verdünnungsvorrichtung eines Mikrotitrators vorgenommen. Das Vorlegen der Verdünnungsflüssigkeit beziehungsweise der Reagentien geschieht mit auf 25 µm beziehungsweise 50 µm kalibrierten Pipetten. Zwecks Aufheizung des Reaktionsgemisches werden die Heizelemente 7 der Heizaufgabe 2 in die Bohrungen 4 der Titrierplatte 1 eingeführt. Da das Aufheizen lediglich durch die Heizspitzen 3 der Heizelemente 7 geschieht, kommt in dem Reaktionsgemisch eine konvektive Strömung zustande, und dadurch wird das Reaktionsgemisch gleichzeitig beheizt und vermischt.

Dadurch geht die Farbreaktion schnell vor sich. Nach dem Abheben der Heizaufgabe kann die Farbintensität sofort abgelesen und die den Titer repräsentierende 50%ige Farbreaktion bei jeder Titerreihe durch Vergleich bestimmt werden.

Die Heizaufgabe kann durch eine Stromquelle veränderlicher Spannung oder durch einen mit Temperaturfühler versehenen Temperaturschalter mit Energie versorgt werden.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung verfügt über sämtliche Vorteile des Mikrotitrators. Der Materialbedarf sinkt bei Anwendung der erfindungsgemässen Vorrichtung auf ein Zehntel, die für die Reihenverdünnungen notwendige Zeit sinkt ebenfalls auf ein Zehntel. Das Abmessen der Reagentien geschieht schneller und genauer, wodurch die Stabilität der Reaktion ebenfalls gesteigert wird. Das Aufheizen des Reaktionsgemisches geht schneller und gleichmässiger vor sich, und es sind dazu keine komplizierten, schwer handhabbaren Wasser-

bäder erforderlich. Die Auswertung der Ergebnisse kann um Grössenordnungen schneller vorgenommen werden, als dies bei den bekannten Methoden der Fall ist.

Der bedeutendste Vorteil der Vorrichtung besteht jedoch darin, dass bei Vorhandensein einer entsprechenden Anzahl

Titrierplatten eine beinahe unbeschränkte Anzahl von Untersuchungen kontinuierlich durchgeführt werden kann. Aus diesem Grunde ist die erfindungsgemässe Vorrichtung auch für Massen- und Reihenuntersuchungen geeignet, welche bislang
5 mit den bekannten Methoden undurchführbar waren.

