



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 664 833 A5

⑤① Int. Cl.⁴: G 01 N 33/80

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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 4955/85

㉔ Anmeldungsdatum: 20.11.1985

㉔ Priorität(en): 23.11.1984 HU 4358/84

㉔ Patent erteilt: 31.03.1988

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 31.03.1988

⑦③ Inhaber:
Human Oltoanyagtermelő és Kutató Intézet,
Budapest X (HU)

⑦② Erfinder:
Zsidai, József, Dr., Budapest VI (HU)
Bankuti, Rozalia (-Racz), Budapest III (HU)
Masek, Istvan, Budapest X (HU)
Veszely, Gizella, Budapest III (HU)
Szokol, József, Budapest XIV (HU)

⑦④ Vertreter:
Rottmann Patentanwälte AG, Zürich

⑤④ **Schnelldiagnostikum für Blutgruppenbestimmung.**

⑤⑦ Beschrieben wird ein Schnelldiagnostikum für Blutgruppenbestimmung und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Das erfindungsgemässe Schnelldiagnostikum besteht aus anti-A, anti-B, anti-AB und gegebenenfalls aus anti-D, anti-C und anti-E Reagenzien, die in den an einer oberflächenbehandelten Aluminiumplatte ausgebildeten Aushöhlungen fixiert sind. Das Schnelldiagnostikum wird hergestellt, indem man die obigen Reagenzien in die Aushöhlungen der oberflächenbehandelten Aluminiumplatte tropft und dann an der Platte durch eine zweistufige Vakuum-trocknung fixiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Schnelldiagnostikum für Blutgruppenbestimmung dadurch gekennzeichnet, dass es 5 anti-A, anti-B, und anti-AB Reagenzien aufweist, die in den auf einer oberflächenbehandelten Aluminiumplatte ausgebildeten Aushöhlungen fixiert sind.
2. Schnelldiagnostikum nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es auch anti-D, anti-C und anti-E Reagenzien aufweist.
3. Verfahren zur Herstellung eines Schnelldiagnostikums für Blutgruppenbestimmung nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens anti-A, anti-B, und anti-AB Reagenzien in die Aushöhlungen einer oberflächenbehandelten Aluminiumplatte getropft werden und die Reagenzien an der Aluminiumplatte durch eine Vakuumtrocknung fixiert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, dass man in der ersten Stufe der Vakuumtrocknung unter einem Druck von 13330 bis 40000 Pa (100 bis 300 Hgmm) und bei einer Temperatur von 15 bis 25°C, in der zweiten Stufe unter einem Druck von höchstens 66 Pa (0,5 Hgmm) und bei einer Temperatur von 30 bis 50°C arbeitet.
5. Verfahren nach Anspruch 3 dadurch gekennzeichnet, dass die Reagenzien aus den anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, anti-C oder anti-E enthaltenden Blutsera bzw. aus den von Fibrinogen befreiten Plasmen hergestellt werden, indem man die gemäss den Blutgruppen vorbereiteten Sera bzw. von Fibrinogen befreiten Plasmen präserviert, inaktiviert und nach der Zugabe von Adjuvierungsmitteln steril filtriert.
6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, dass Agglutination befördernde Mittel zu den Reagenzien von dem Rh-System gegeben werden.

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Schnelldiagnostikum für Blutgruppenbestimmung und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Die Blutgruppenbestimmung gehört zur Routinearbeit der Gesundheitsfürsorge, ist aber keine einfache Aufgabe, die durch strenge Vorschriften reguliert wird. Es gibt Umstände (Katastrophen-Situationen, Kriege usw.), wenn eine grosse Anzahl der Blutgruppenbestimmungen (sterile Ausrüstung, Geräte, Maschinen usw.) nicht zur Verfügung stehen. In mehreren Ländern wurden Schnelldiagnostika für die schnelle Blutgruppenbestimmung vom Reihenuntersuchungscharakter am Krankenbett entwickelt, deren gemeinsames Prinzip besteht darin, dass die Bestimmungssera auf einem mit speziellen Impregniermitteln durchtränkten Papiertäger getrocknet werden. Solche Schnelldiagnostika sind z.B. das von Nordisk Insulinlaboratorium (Dänemark) in Verkehr gebrachte «ABO-D Kit» und «Eldoncard CDE», das von Biotest Diagnostics (Deutsche Bundesrepublik) in Verkehr gebrachte «Serafol» und das von Germed, Berlin (Deutsche Demokratische Republik) in Verkehr gebrachte «Bed-side ABO» Trockenreagenzien. Diese sind einfach und schnell anwendbar, ihr Nachteil ist aber, dass sie nur zur einfachen Blutgruppenbestimmung geeignet sind.

Es wurde ein neues Schnelldiagnostikum entwickelt, dessen Verwendung einfach und zuverlässig ist und verhältnismässig dauernd aufbewahrt werden kann.

Die Erfindung betrifft also ein Schnelldiagnostikum für Blutgruppenbestimmung, das anti-A, anti-B, und anti-AB Reagenzien aufweist, die in den auf einer oberflächenbehandelten Aluminiumplatte ausgebildeten Aushöhlungen fixiert sind. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Her-

stellung des obigen Schnelldiagnostikums, indem man wenigstens anti-A, anti-B, und anti-AB Reagenzien in die Aushöhlungen einer oberflächenbehandelten Aluminiumplatte tropft und die Reagenzien an der Aluminiumplatte durch eine Vakuumtrocknung fixiert.

Als Trägermaterial des erfindungsgemässen Schnelldiagnostikums wird eine Aluminiumplatte verwendet, deren Dicke zweckmässig 0,25 bis 0,5 mm beträgt. Auf dieser Platte werden Aushöhlungen mit einem Durchmesser von 10 bis 30 mm und mit einer Tiefe von 0,3 bis 0,6 mm durch Pressung ausgebildet. Die Anzahl der auszubildenden Aushöhlungen hängt davon, wievielerlei Reagenzien auf das Trägermaterial aufzutragen erwünscht ist; eine weitere Aushöhlung ist für die Prüfprobe notwendig. Die Trägerplatte, die gepresst und auf die entsprechende Grösse abgeschnitten wird, wird in einem Kaliumhydroxid-Bad und danach mit einer ausgiebigen Spülung durch warmes und kaltes Wasser und dann durch Alkohol oberflächlich behandelt.

Zu dem erfindungsgemässen Schnelldiagnostikum werden anti-A, anti-B und anti-AB Reagenzien der Hauptblutgruppe, weiterhin gegebenenfalls anti-D, anti-C, anti-E usw. Reagenzien des Rh-Systems verwendet.

Die Reagenzien der Hauptblutgruppen werden hergestellt, indem man das Serum bzw. das von Fibrinogen befreite Plasma des Blutes A (anti-B), B (anti-A) und O (anti-AB), die eine günstige Avidität haben (das heisst eine binnen 2 bis 5 Sekunden beginnende und binnen 3 Minuten vierkreuzige Agglutination geben) unter aseptischen Bedingungen je nach den Blutgruppen mischt, durch Wärmebehandlung inaktiviert, präserviert, adjuviert und steril filtriert.

Die Inaktivierung wird durch eine etwa 30 Minuten lang dauernde Wärmebehandlung auf 50 bis 60°C ausgeführt. Die warmbehandelten Reagenzien werden z.B. mit Natriumazid präserviert und ein Lyophilisierungshilfsmittel, z.B. Saccharose wird als Adjuvierungsmittel in einer Menge von etwa 3 % zugegeben.

Die Reagenzien des Rh-Systems werden aus dem Serum bzw. Plasma von anti-D, anti-C, anti-E usw. enthaltendem Blute ähnlicherweise wie die Reagenzien von den Hauptblutgruppen hergestellt, die Agglutination befördernde Adjuvierungsmittel, z.B. Ficoll, Glycin und Methylcellulose werden aber auch den Reagenzien zugegeben.

Auf die vorbereiteten Platten werden Tropfen von 0,03 bis 0,05 ml der Reagenzien unter aseptischen Bedingungen aufgetragen. Zur Bestimmung durch Enzymmethode wird neben die Reagenzien von dem Rh-System 0,03 bis 0,05 ml 1 %-ige, durch Cystin und Cystein aktivierte Papainlösung getropft und die Reagenzien werden durch eine zweistufige Vakuumtrocknung auf dem Trägermaterial eingetrocknet. Die Vakuumtrocknung wird in einer Lyophilisierungsapparatur oder in einer Vakuumtrockenkammer ausgeführt. In der ersten Stufe arbeitet man unter einem Druck von 13330 bis 40000 Pa (100 bis 300 Hgmm), bevorzugt unter einem Druck von 26660 Pa (200 Hgmm) bei einer Temperatur von 15 bis 25°C, bevorzugt bei 20°C; in der zweiten Stufe arbeitet man unter einem Druck von höchstens 66 Pa (0,5 Hgmm), bevorzugt unter einem Druck von 13 bis 6 Pa (0,1 bis 0,05 Hgmm), bei einer Temperatur von 30 bis 50°C, bevorzugt bei 40°C. Die ganze Zeitdauer der Trocknung beträgt etwa 3 bis 5 Stunden.

Bei Anwendung werden die Reagenzien in je einem Tropfen von Leitungswasser gelöst und die zu prüfende Blutprobe wird in die bezeichnete Aushöhlung eingetroppt. Die Bestimmung kann auch mit dem unmittelbar aus der Fingerspitze ausgenommenen Blut, ausseronnenen Blut oder aus einer gerinnungshemmenden Mittel enthaltenden Blutprobe ausgeführt. Die zu prüfende Blutprobe wird mit einem geeigneten Gerät - zweckmässig mittels Polystyrol-Stäbchen, die

mit dem Diagnostikum zusammen in einem Gepäck gelegt sind – mit den Reagenzien in Berührung gebracht. Nach einigen Kippen wird die Platte auf eine horizontale Oberfläche gelegt und nach 3 Minuten ausgewertet.

Das erfindungsgemässe Schnelldiagnostikum weist die Vorteile auf, dass das Trägermaterial ist eine oberflächenbehandelte Aluminiumplatte, wodurch irgendeine Impregnierung, spezielle Bedeckung und Isolierschicht überflüssig werden. Die ausgebildeten Aushöhlungen erleichtern sowohl die Auftragung der Reagenzien als auch die Blutgruppenbestimmung. Die Reagenzien haften fest an der Oberfläche der Aluminiumplatte, bei der Anwendung können die Reagenzien mit Leitungswasser gelöst werden und das Lösen findet sofort statt. Auf der Aluminiumplatte ist die Reaktion ausserordentlich gut wahrnehmbar. Das erfindungsgemässe Schnelldiagnostikum enthält auch anti-AB Reagenz, wodurch die Fehlermöglichkeiten sich vermindern und die Blutgruppenbestimmung mit Sicherheit ausgeführt werden kann. Falls man auf diese Weise arbeitet, so ist die Bestimmung mit einer unter Laboratoriumsbedingungen durchgeführten Bestimmung gleichwertig. Infolge der günstigen Wärmeübertragungsfähigkeit der Aluminiumplatte kann der Feuchtigkeitsgehalt der Reagenzien durch Vakuumtrocknung minimalisiert werden, wodurch das Diagnostikum verhältnismässig lange Zeit (2 bis 5 Jahre lang) ohne Qualitätsänderung sogar bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden kann.

Die Herstellung der erfindungsgemässen Schnelldiagnostikum wird an Hand des folgenden Beispiels näher erläutert.

Beispiel

Die Herstellung der Reagenzien von der Hauptblutgruppen

Die Blutsera mit einem Titer von mindestens 1:64 anti-A oder anti-B, bzw. von mindestens 1:32 anti-AB, die eine günstige Avidität haben (das heisst eine binnen 2 bis 5 Sekunden beginnende und binnen 3 Minuten vierkreuzige Agglutination geben), werden unter aseptischen Bedingungen je nach den Blutgruppen gemischt, mit 0,1% Natriumazid präserviert, 3% Saccharose werden zugegeben, dann werden sie durch eine bei 56°C 30 Minuten lang dauernde Wärmebehandlung inaktiviert, und dann durch ein klärendes und entkeimendes Filter filtriert.

Die Blutplasmen mit einem Titer von mindestens 1:128 anti-A oder anti-B, bzw. von mindestens 1:64 anti-AB, die eine günstige Avidität haben, werden unter aseptischen Bedingungen je nach Blutgruppen gemischt, mit 0,1% Natriumazid präserviert, mittels Calciumlävulinat oder Calciumchlorid-dihydrat von dem Fibrinogen befreit und dann auf die selbe Weise, wie die Sera behandelt.

Die Herstellung der Reagenzien des Rh-Systems

Die Blutsera mit einem Titer von mindestens 1:128 anti-D oder anti-C oder anti-E usw. werden durch 0,1% Natriumazid präserviert, unter aseptischen Bedingungen je nach den Blut-

gruppen gemischt und bei 56°C 60 Minuten lang inaktiviert. Die irregulären Agglutinine werden durch Absorption entfernt, 3% Saccharose, 2% Glycin sowie 0,3 bis 0,5% Ficoll zur Beförderung der Agglutination und 0,01 bis 0,02%

5 Methylcellulose werden zugegeben und dann werden sie durch Filtrieren entkeimt.

Die Plasmen werden ähnlich mittels 0,1% Natriumazid präserviert, durch Calciumchlorid-dihydrat oder Thrombin von dem Fibrinogen befreit und dann ebenso wie die Sera

10 behandelt.

Die Avidität von einem Reagenz ist geeignet, indem die Reaktion nach einer Minute beginnt und nach 3 Minuten bis zum Maximum erhöht wird.

Zum Nachweis der inkompletten Hämagglutinine ist auch 15 eine 1%-ige Papainlösung notwendig, die durch L-Cystin und L-Cystein-hydrochlorid aktiviert und mit einem Phosphatpuffer von 1/15 Mol/Liter hergestellt wird und 0,0125% Methylcellulose enthält.

20 Die Vorbereitung des Trägermaterials

Im Falle der Verwendung von anti-A, anti-B, anti-AB und anti-D Reagenzien werden fünf Aushöhlungen durch Pressung auf einer Aluminiumplatte mit einer Dicke von 0,25 bis 0,5 mm ausgebildet. Die Tiefe dieser Aushöhlungen beträgt

25 0,3 bis 0,6 mm. Der Durchmesser von vier Aushöhlungen beträgt 15 mm, der der fünften ist grösser, z.B. 30 mm. Die gepressten und auf die geeignete Grösse abgeschnittenen Platten werden 3 Minuten lang in einem 20 %-igen Kaliumhydroxid-Bad bei 90°C gehalten, dann ausgiebig mit warmen 30 und kaltem Wasser und zuletzt mit Alkohol abgespült.

Die Herstellung des Diagnostikums

In drei von den kleineren Aushöhlungen der vorberei- 35 teten, oberflächenbehandelten Platten werden der Reihe nach 0,03 ml anti-A, und anti-B und anti-AB Reagenz getropft, die vierte, kleinere Aushöhlung bleibt für die Blutprobe leer. In die grössere Aushöhlung werden 0,03 ml anti-D Reagenz und ein bisschen ferner 0,05 ml aktive 40 Papainlösung getropft. Das Reagenz von dem Rh-System kann auch auf eine andere Platte aufgetragen werden.

Nun werden die Platten in eine Lyophilisierungsmaschine gelegt und die zweistufige Vakuumtrocknung wird begonnen. In der ersten Stufe werden ein niedriges Vakuum 45 (etwa 26660 Pa; 200 Hgmm) und eine niedrige Temperatur (20°C), in der zweiten Stufe ein höheres Vakuum (13 bis 6 Pa; 0,1 bis 0,05 Hgmm) und eine erhöhte Temperatur (40°C) verwendet. Durch diese Methode wird der Stoff ohne Refrigeration bei einem verhältnismässig niedrigen Temperatur 50 getrocknet, wodurch die Änderung der Eiweiss-Struktur, bzw. die begleitende Aktivitätsverminderung, die bei der Refrigeration auftreten, vermieden werden können.

Das so hergestellte Diagnostikum wird mit Polystyrol-Stäbchen zusammen in Aluminiumfolie-Beutel gepackt und 55 luftdicht abgeschlossen.