

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Januar 2005 (20.01.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/005986 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/558, 33/80

[CH/CH]; Rue des Epouses 2, CH-1700 Fribourg (CH).
LÖSTER, Klemens [DE/DE]; Siegelstrasse 4, 16562 Bergfelde (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/007525

(74) Anwalt: BUBLAK, Wolfgang; Bardehle Pagenberg Dost Altenburg Geissler, Galileiplatz 1, 81679 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2004 (08.07.2004)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 30 981.0 9. Juli 2003 (09.07.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PRISMA-DIAGNOSTIKA GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

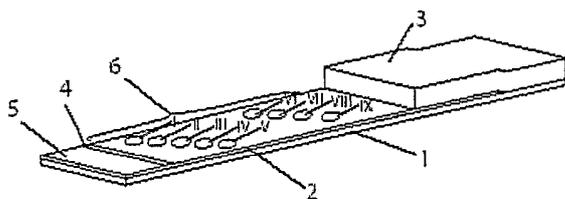
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHWIND, Peter

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR SIMULTANEOUS CARRYING OUT OF BLOOD GROUP DETERMINATION, SERUM CROSS-CHECK AND ANTIBODY DETECTION TEST

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR SIMULTANEN DURCHFÜHRUNG VON BLUTGRUPPENBESTIMMUNG, SERUMGEGENPROBE UND ANTIKÖRPERSUCH-TEST



(57) Abstract: The invention relates to a device for the simultaneous qualitative or quantitative determination of several analytes in a liquid sample, comprising a membrane (2) with a charging zone (5), for the application of the liquid sample, at least two indicator zones which can interact with the analyte(s) and at least one absorption region (3), which accepts the fluid after passing through the indicator zones, whereby the indicator zones lie between the charging zone (5) and an absorption region (3), char-

acterised in that the flow directions (flow tracks) are essentially parallel from the application zone (5) through each indicator zone to an absorption region (3) and at least two different flow tracks are present. The invention further relates to a method for the determination of several analytes or derivatives thereof in a liquid sample, comprising: application of the sample to the charging zone (5) of a membrane of the device as given in claims 1 to 8, whereby said sample is present in sufficient amounts to permit the sample fluid to flow in the direction of the absorption region (3) through the indicator zones and to permit the analytes or derivatives thereof in the liquid sample to form a complex in the indicator zone.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend eine Membran (2) mit einer Aufgabezone (5) zum Auftragen der flüssigen Probe, mindestens zwei Indikatorzonen, die mit dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und mindestens einem Absorptionsbereich (3), welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt, wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone (5) und einem Absorptionsbereich (3) liegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließrichtungen von der Aufgabezone (5) durch die jeweiligen Indikatorzonen zu einem Absorptionsbereich (3) (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivate in einer flüssigen Probe, umfassend: das Auftragen der Probe auf die Aufgabenzone (5) einer Membran (2) der Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 8, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich (3) durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

WO 2005/005986 A1



TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Vorrichtung und Verfahren zur simultanen Durchführung
von Blutgruppenbestimmung,
Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test**

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Lateral-Diagonal-Fluss Multiparameter Tests, insbesondere auf den Gebieten der Immunhämatologie und der Infekti-
10 onsserologie, zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend mindestens eine Membran mit einer Aufgabezone zum Auftragen der flüssigen Probe, mindestens zwei Indika-
torzonen, die mit dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und min-
destens einem Absorptionsbereich, welcher die Flüssigkeit nach Passieren der
15 Indikatorzonen aufnimmt, wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone und dem Absorptionsbereich liegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließrichtungen von der Aufgabezone durch die jeweiligen Indikatorzonen zum Absorptionsbereich (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.

20

Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend das Auftragen der Probe auf die Aufgabezone einer Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Rich-
25 tung Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden, insbesondere zur simultanen Bestimmung von zellulären und plasmatischen Parametern, vorzugsweise zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-

such-Test sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern, die gegen andere Blutzellen als Erythrozyten gerichtet sind, insbesondere anti-Thrombozyten und anti-Lymphozyten Antikörper.

Um Komplikationsrisiken z. B. bei einer Transfusion, insbesondere Blutgruppenunverträglichkeiten, viralen und/oder bakteriellen Kontaminationen, vorzubeugen, werden bekanntermaßen verschiedene Labortests am Spender- und Patientenblut vorgenommen zur Bereitstellung von Komponenten, die mit dem Rezipienten blutgruppenserologisch kompatibel sind und frei von bekannten übertragbaren Pathogenen sind. Die jeweiligen serologischen Tests beinhalten in der Regel die Blutgruppenbestimmung beim Spender und Empfänger, insbesondere von Blutgruppen der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell, Serumgegenprobe beim Spender und Empfänger, Antikörpersuche nach irregulären Antikörpern, beim Spender und Empfänger sowie Antikörperidentifizierung beim Empfänger bei Vorliegen irregulärer Antikörper. Der Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten wird im Zusammenhang mit Transfusionen und Transplantationen ebenfalls durchgeführt.

Infektionsserologische Tests am Spender umfassen bekanntermaßen die routinemäßige Bestimmung von Antikörpern insbesondere gegen HIV-1, HIV-2, gegen HCV, gegen *Treponema pallidum* (Syphilis), sowie die Bestimmung des Hepatitis B Oberflächen-Antigens (= HbsAg: Hepatitis surface Antigen).

In der **blutgruppenserologischen Diagnostik** werden allgemein Parameter nachgewiesen, die besonders im Zusammenhang mit Transfusionen bzw. dem Morbus Hämolyticus Neonatorum (Mhn) von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich unter anderem um den Nachweis von Antigenen auf der Oberfläche der Erythrozyten, die für die Blutgruppen charakteristisch sind (Blutgruppenbestimmung). Weitere wichtige Antigenensysteme befinden sich auch auf Thrombozyten, Granulozyten,

Lymphozyten, die ebenfalls bei Transfusion und Transplantation eine Rolle spielen. Bei Thrombozyten- und Granulozyten-Antigenungleichheit zwischen Mutter und Fötus kann es zu Mhn vergleichbaren Krankheitsbildern am Neugeborenen kommen. Ferner handelt es sich um den Nachweis von regulären Blutgruppen-
5 Antikörpern (Isoagglutinine) und um den Nachweis von irregulären Blutgruppen-Antikörpern im Serum oder Plasma.

Die **Isoagglutinine** oder **regulären Antikörper** werden von allen Menschen frühzeitig nach der Geburt erworben und korrespondieren zur jeweiligen Blut-
10 gruppe des ABO-Systems. Sie sind gegen diejenigen Blutgruppenantigene A bzw. B, die dem Individuum selbst fehlen, gerichtet, d. h. Personen mit Blutgruppe A haben anti-B, Personen mit Blutgruppe B haben anti-A, Personen mit Blutgruppe 0 haben anti-A und anti-B; Personen mit Blutgruppe AB haben keine Isoagglutinine. Die regulären Antikörper werden auch „komplett“ genannt, weil sie E-
15 rythrozyten im NaCl-Milieu direkt agglutinieren können.

Die **irregulären- oder Alloantikörper** werden im Gegensatz zu den Isoagglutininen durch spätere Immunisierungen erworben, v. a. durch Transfusion oder Schwangerschaft. Deshalb haben die meisten Menschen keine irregulären Blutgruppenantikörper. Die transfusionsrelevanten irregulären Antikörper sind in
20 der Regel wärmereaktiv und gehören überwiegend der IgG-Klasse an. Sie sind im Gegensatz zu den regulären Antikörpern im NaCl-Milieu nicht in der Lage, Erythrozyten direkt zu agglutinieren.

Bekanntermaßen werden zur **Blutgruppenbestimmung** die Erythrozyten der zu
25 testenden Person (Spender oder Empfänger) mit Reagenzien, welche blutgruppenspezifische Antikörper enthalten, zusammengebracht. Üblicherweise handelt es sich um Flüssigkeitstests, bei denen durch Mischen einer Erythrozyten-haltigen Probe mit einer Probe, welche Antikörper enthält, die gegen ein bestimmtes Blutgruppenmerkmal gerichtet sind, ein Testansatz hergestellt wird. Der Testansatz
30 wird dann über einen definierten Zeitraum und unter definierten Bedingungen inkubiert und nach Abschluss der Inkubation oder direkt oder nach einem Zentri-

fugationsschritt entweder visuell oder mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination oder Adsorption der Erythrozyten überprüft. Die vorherrschende Endpunktmessung in der Blutgruppenserologie ist nach wie vor die Hämagglutination. Für jede zu bestimmende Blutgruppe muss ein eigener Ansatz pipettiert werden, d. h. z. B. die Bestimmung der 9 wichtigsten Blutgruppen A, B, D, C, c, E, e, Cw und K erfordert ohne Kontrolle 9 getrennte Ansätze.

Für die **Serumgegenprobe** werden bekanntermaßen Zellreagenzien mit bekannter AB0-Blutgruppe (A1, A2, B, 0) verwendet, welche mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person inkubiert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt wird visuell bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythrozyten hin überprüft. Für eine Serumgegenprobe mit den 4 genannten Testzellen müssen herkömmlicherweise 4 Ansätze pipettiert werden.

Für die **Suche nach irregulären Antikörpern** werden bekanntermaßen Panel bestehend aus normalerweise 2 oder 3 Blutgruppe 0-Zellen verwendet, deren kombiniertes Antigenprofil die wichtigsten Antigene, insbesondere der Blutgruppensysteme Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, P, Lewis, Lutheran enthält. Das Zellreagenz wird mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person zusammengebracht, inkubiert und nach einem Zentrifugationsschritt visuell bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythrozyten überprüft. Für die Bestimmung einer Patientenprobe müssen 2 bis 3 Ansätze pipettiert werden.

Für die **Identifikation der irregulären Antikörper**, die in der Regel nach einem positiven Antikörper-Suchtest erfolgt, werden Panel bestehend aus bis zu 16 Blutgruppe 0-Zellen verwendet, deren Antigenprofile die wichtigsten Antigene, insbesondere der Blutgruppensysteme Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, P, Lewis, Lutheran, in genau abgestimmter Weise abdecken. Das Zellreagenz wird mit dem Serum oder Plasma der zu testenden Person zusammengebracht, inkubiert und visuell bzw. mit optischen Methoden auf eine eventuelle Agglutination der Erythro-

zyten überprüft. Für die Bestimmung einer Patientenprobe müssen bis zu 16 Ansätze pipettiert werden.

Da die meisten transfusionsrelevanten irregulären Antikörper vom IgG-Typ und deshalb inkomplett sind, müssen die für die Antikörpersuche und-identifikation beschriebenen Reaktionen in der Regel verstärkt werden, um den Endpunkt Hämagglutination nachweisen zu können. Gebräuchlichstes Reagenz ist hierbei ein polyklonales anti-Humanglobulin-Antikörperreagenz, dem häufig anti-Komplement Antikörper zugesetzt sind (typischerweise anti-C3d und/oder anti-C3b).

10

Eine gebräuchliche Methode zum Nachweis von Thrombozyten-Antikörpern ist der sogenannte MAIPA-Test (Monoclonal Antibody Immobilisation of Platelet Antigen). Hierbei werden Test-Thrombozyten mit dem zu testenden Serum inkubiert. Nach einem Waschschrift wird mit einem monoklonalen z. B. Maus-Antikörper, der für ein bestimmtes Thrombozyten-Glykoprotein spezifisch ist, inkubiert. Die Thrombozyten werden daraufhin lysiert und das verdünnte Lysat wird in ein mit z. B. Ziege anti-Maus Antikörpern beschichtetes Reaktionsgefäß einer Mikrotiterplatte gegeben. Der Ziege anti-Maus Antikörper bindet den Maus-Antikörper und den daran befindlichen Thrombozytenglykoprotein-Humanantikörper-Komplex. Der humane Antikörper wird durch Zugabe eines Enzym konjugierten Ziege anti-human IgG nachgewiesen.

15

20

Mit herkömmlichen diagnostischen Tests können nur entweder zelluläre oder plasmatische Parameter bestimmt werden. Zur Bestimmung von Blutbestandteilen müssen grundsätzlich zuvor Zellen und Plasma getrennt werden.

25

Lateral-Fluss-Tests finden heute vielfach Anwendung als Schnelltests, z. B. als Schwangerschaftstests, zur Bestimmung von Infektionsmarkern oder als Drogenscreen. Eine Lateral-Fluss-Test Anordnung besteht bekanntermaßen aus einem festen Träger, auf dem eine Aufgabezone für die zu untersuchende Probe aufgebracht ist, eine Trennmembran, auf der Bindungselemente, z. B. Fängerantikörper

30

bzw. -antigene gebunden sind und auf der sich Bindungsreaktionen nachweisen lassen und ein saugfähiger Absorptionsbereich, der die zu untersuchende Probe linear durch die Trennmembran fließen lässt.

Testmembranen herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests werden in der Regel mit chromatographie-ähnlicher Auftrennung beschrieben. Der Analyt in der Probe bindet spezifisch an die in einer Membran befestigten Bindungselemente, die in der Regel in hintereinanderliegenden bzw. übereinanderstehenden Banden angeordnet als Indikatorzonen vorliegen. Der Bindungskomplex wird durch Indikatorpartikel sichtbar gemacht, welche in der Regel in einem Konjugat-Freisetzungspad eingetrocknet in der Anordnung bereits vorliegen. Das Konjugat-Freisetzungspad ist zwischen Aufgabebzone und Membran angebracht. Die vorbe-

10 schichteten farbigen Indikatorpartikel sind beispielsweise mit einem gegen den gesuchten Analyten gerichteten Antikörper beschichtet.

Das übliche Lateral-Fluss-Test-Format ist das eines sogenannten „Sandwich-

15 Assays“, bei dem sowohl die Indikatorzone als auch die Indikatorpartikel mit gegen den gesuchten Analyten gerichteten Liganden, normalerweise ein Antikörpern, belegt sind. Dabei ist der Ligand (Bindungselement) an die Membran immobilisiert. Das Detektor-Reagenz, normalerweise ein Antikörper, welcher an gefärbte Polystyrol-Partikel oder kolloidale Metalle gebunden ist, ist im Konjugat-

20 Freisetzungspad auswaschbar deponiert. Dieser Bindungskomplex dient als Indikatorpartikel. Nach Auftragen der zu untersuchenden Probe benetzt diese sehr schnell das Konjugat-Freisetzungspad, wodurch die Indikatorpartikel mobilisiert werden. Die Indikatorpartikel migrieren mit der Flüssigkeitsfront entlang der porösen Membran. Ein in der Probe befindlicher Analyt wird durch den Antikörper,

25 der an das Indikatorpartikel gekoppelt ist, gebunden. Wenn die Probe die Indikatorzone passiert, wird der Analyt/Indikatorpartikel-Komplex in der Indikatorzone durch Reaktion des Analyten mit dem in der Indikatorzone gebundenen Antikörper immobilisiert, was zu einem sichtbaren Signal führt.

Ein weiteres bekanntes Testformat für kleine Analyten mit nur einer einzigen antigenen Determinante, die nicht gleichzeitig zwei Antikörper binden kann, ist der

30

sogenannte „Kompetitions-Assay“. Das an die Indikatorpartikel gebundene Detektor-Reagenz ist normalerweise ein dem Analyten identisches oder analoges Molekül. Die Indikatorpartikel sind im Konjugat-Freisetzungspad deponiert. Die Indikatorpartikel migrieren mit der Flüssigkeitsfront entlang der porösen Membran. Wenn die Probe, die Analyt enthält, und die Indikatorpartikel (die effektiv ebenfalls Analyt enthalten) die Indikatorzone passieren, bindet ein Teil der Analytmoleküle in der Probe und ein Teil der Indikatorpartikel. Je mehr Analyt sich in der Probe befindet, umso effektiver wird er mit der Bindung der Indikatorpartikel kompetieren, umso schwächer wird das Signal.

10

Bekanntermaßen sind diese Indikatorpartikel überwiegend aus kolloidalem Gold oder aus Polystyrol, die mit dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt und beschichtet werden. In den typischen Lateral-Fluss-Tests Formaten werden die Analyten indirekt bestimmt. Unter direkter Bestimmung eines Analyten wird hier verstanden, dass der Analyt bereits an das Indikatorpartikel (z. B. Erythrozyt) natürlich gebunden ist. In dem gebräuchlicheren Fall der indirekten Bestimmung des Analyten enthält die zu testende Probe in der Regel eine nicht zellulär gebundene, z. B. plasmatische Komponente als Analyten und es werden neben der zu testenden Probe zwei Reagenz-Komponenten benötigt, nämlich Indikatorpartikel und Bindungselement. Bei der indirekten Bestimmung bindet der Analyt zunächst an die aus dem Konjugat-Freisetzungspad herausgelösten Indikatorpartikel, bevor dieser Komplex dann durch eine zweite Reaktion mit dem Bindungselement in den Indikatorzonen immobilisiert wird.

25

Bei der **Verwendung herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests mit Erythrozyten** als Indikatorpartikeln, die die zu bestimmenden Analyten, beispielsweise Blutgruppen-spezifische Antigene, gebunden haben, werden bislang in den Indikatorzonen Antikörper gegen korrespondierende Blutgruppenantigene als Bindungselemente in hintereinanderliegenden bzw. übereinanderstehenden Banden nur einer Fließspur angeordnet, wie zum Beispiel anti-A, anti-B gegen die Blutgrup-

30

pen-Antigene A bzw. B oder Antikörper gegen Antigene des Rh Blutgruppensystems. Dabei weisen herkömmliche Lateral-Fluss-Tests den Nachteil auf, dass die an die Antikörper gebundenen Erythrozyten eine Flussbarriere für die weiter zu untersuchenden Analyte, beispielsweise weitere Zell-assoziierte Antigene, in einer Probe bilden. Durch Agglutination oder Adsorption von Zellen in einer proximal zur Aufgabezone liegenden Bande von Bindungselementen können sich weitere Analyten, insbesondere Zellen bzw. Zellfragmente, in der zu untersuchenden Probe nicht weiter ungehemmt und sichtbar auftrennen und können folglich nicht eindeutig bzw. vollständig nachgewiesen werden. Dies kann z. B. bei einer Person, die Blutgruppe AB Rh D positiv ist, zu einer Abschwächung bzw. Eliminierung der B- und der D-Bande führen, was zu einer Fehlinterpretation im Sinne von Blutgruppe A Rh negativ führen könnte. Bislang konnten deshalb speziell in der blutgruppenserologischen Diagnostik keine Lateral-Fluss-Test mit mehr als einer Indikatorzone angewendet werden. Für die Messung mehrerer, insbesondere zellulärer und plasmatischer Blutgruppenparameter müssen bislang Einzelparameter-Tests separat durchgeführt werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, die im Hinblick auf den Stand der Technik angeführten Nachteile, insbesondere die der hintereinanderliegenden bzw. überlagerten Indikator- bzw. Nachweiszonen herkömmlicher Lateral-Fluss-Tests, für eine gleichzeitige Messung verschiedener Proben-Parameter, insbesondere von zellulären und plasmatischen Parametern, zu überwinden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst zum einen **durch eine Vorrichtung** zum gleichzeitigen, qualitativen oder quantitativen Bestimmen eines oder mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe oder mehrerer flüssiger Proben, die mindestens eine Membran umfasst mit einer Aufgabezone zum Auftragen der flüssigen Probe, mindestens eine Gruppe von mindestens zwei Indikatorzonen, die mit den/dem Analyten bzw. mit denen Analyten in Wechselwirkung treten können und einem Absorptionsbereich, welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indi-

katorzonen aufnimmt, wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone und dem Absorptionsbereich liegen, dadurch gekennzeichnet, dass die Fließrichtungen von der Aufgabezone durch die jeweiligen Indikatorzonen einer Gruppe zu einem Absorptionsbereich, welche Fließspuren darstellen, im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.

Die **Indikatorzonen** der erfindungsgemäßen Vorrichtung befinden sich auf der Membran und umfassen Bindungselemente, die die zu bestimmenden Analyte in der Probe abfangen bzw. binden. In den Indikatorzonen werden die Bindungsreaktionen zwischen Analyt und Bindungselement nachgewiesen. Als besonders bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente, Lektine, Antigene bzw. Antigen-Epitope und/oder Zellen bzw. Zellfragmente an der porösen Membran angebracht. Die Indikatorzonen umfassen vorzugsweise jeweils ein Bindungselement gegen einen zu untersuchenden Analyten.

In einer **Ausführungsform der Erfindung** sind die Indikatorzonen so angeordnet, dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur **nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt**. Beispielhaft sind die Indikatorzonen versetzt auf der Membran angeordnet. Die Anordnung der Indikatorzonen ist dabei vorzugsweise in einer von proximal nach distal oder umgekehrt diagonal verlaufenden Reihe ausgestaltet. Besondere Ausführungsformen sind V-förmig, W-, M-, oder N-förmig oder umgekehrt V-förmig, W-, M-, oder N-förmig ausgestaltet. In einer weiteren Ausführungsform sind die Indikatorzonen parallel nebeneinander versetzt in einer linearen Reihe angeordnet.

Die Einführung versetzter Indikatorzonen macht eine Multiparametertestung mit Erythrozyten als Indikatorpartikeln in einer lateralen Anordnung erst möglich. Die besonders bevorzugte Ausführungsform einer diagonalen Anordnung hat den Vorteil, dass die Bezeichnung der Ergebnisse besonders praktisch und leicht ablesbar auf die erfindungsgemäße Anordnung aufgebracht werden kann, da jeder nachzuweisende Parameter eine definierte X- und Y-Position aufweist, betrachtet man die Anordnung der erfindungsgemäßen Vorrichtung als ein Koordinatensys-

tem mit Ordinate (Ebene der Fließrichtung) und Abszisse (Ebene der Auftragszone).

In einer weiteren **Ausführungsform** der Erfindung sind **mehr als eine solche**
5 **Reihe** von Indikatorzonen, vorzugsweise jeweils von proximal nach distal oder umgekehrt diagonal verlaufend, oder beispielsweise auch V-förmig, W-, M-, oder N-förmig oder umgekehrt V-förmig, W-, M-, oder N-förmig verlaufend, in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich versetzt angeordnet und die Indikatorzonen der verschiedenen Reihen entweder zueinander **auf Lücke** angeordnet, so
10 dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt, oder zueinander **nicht auf Lücke** angeordnet, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur mehr als eine Indikatorzone durchströmt.

Mehr als eine solche Reihe von Indikatorzonen, beispielsweise zwei Reihen von Indikatorzonen, mit unterschiedlicher Distanz zur Aufgabezone sind insbesondere
15 dann vorteilhaft, wenn aus einer Vollblutprobe zelluläre und plasmatische Parameter bestimmt werden sollen. In einer Ausführungsform, beispielhaft in einem Testansatz mit Vollblut als Probe, werden die Bindungselemente so gewählt, dass die im Plasma enthaltenen Analyten, zum Beispiel jede Art von Antikörpern, die durch die Vorrichtung von der Aufgabezone zum Absorptionsbereich durch die
20 Indikatorzonen fließen, in der proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an die Bindungselemente binden. Die Bindungselemente zum Nachweis der zellulär gebundenen Analyten, beispielsweise erythrozytäre Antigene, werden dagegen so gewählt, dass diese in der distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an die Bindungselemente binden. Bei dieser
25 bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise mit einer zusätzlich zu den Erythrozyten weiteren Sorte von Indikatorpartikeln, vorzugsweise aus kolloidalem Gold oder Polystyrol oder fixierten Erythrozyten, gearbeitet. Diese Indikatorpartikel werden insbesondere eingesetzt, um nicht erythrozytär gebundene Analyten, beispielsweise frei im Plasma vorkommende Antikörper, im Bindungskomplex in
30 einer Indikatorzone sichtbar zu machen. Werden beispielhaft zwei Arten von Indikatorpartikeln verwendet, wovon eine nicht Erythrozyten sind, können die Indi-

katorzonen der beiden Reihen zueinander **nicht auf Lücke** bzw. in einer Fließspur hintereinander angeordnet sein. Vorteilhaft ist hierbei die Anordnung, bei der die aus dem Plasma nachgewiesenen Analyten in den proximalen Indikatorzonen nachgewiesen werden und bei der die Erythrozyten-gebundenen Analyten in den
5 distalen Indikatorzonen nachgewiesen werden. Eine Ausführungsform der Erfindung mit mehr als einer, wie vorbeschriebenen Reihe von Indikatorzonen, von denen die Bindungselemente jeder Reihe mit Erythrozyten als Indikatorpartikel reagieren bzw. binden, sind die Reihen von Indikatorzonen zueinander **auf Lücke** bzw. in einer Fließspur nicht hintereinander angeordnet.

10

In einer weiteren und besonders bevorzugten **Ausführungsform** der Erfindung sind **mehr als eine solche Reihe** von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer von proximal nach distal oder umgekehrt diagonal verlaufenden Reihe, oder beispielsweise in einer V-förmig, W-, M-, oder N-förmig oder umgekehrt V-förmig,
15 W-, M-, oder N-förmig verlaufenden Reihe, oder beispielsweise auch in einer parallel nebeneinander versetzt verlaufenden Reihe, bidirektional (z. B. zu einem 180° Winkel) zu einer zentralen Aufgabezone angeordnet. Eine solche Anordnung ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn aus einer Vollblutprobe zelluläre und plasmatische Parameter bestimmt werden sollen.

20

In einer Ausführungsform, beispielhaft in einem Testansatz mit Vollblut als Probe, werden die Bindungselemente so gewählt, dass die im Plasma enthaltenen Analyten, zum Beispiel jede Art von Antikörpern, die durch die Vorrichtung von der Aufgabezone zum Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen fließen, in der auf der einen Seite zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an
25 die Bindungselemente binden. Die Bindungselemente zum Nachweis der zellulär gebundenen Analyten, beispielsweise erythrozytäre Antigene, werden dagegen so gewählt, dass diese in der auf der gegenüberliegenden Seite zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen an die Bindungselemente binden. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise mit einer zusätzlich zu den E-
30 erythrozyten weiteren Sorte von Indikatorpartikeln, vorzugsweise aus kolloidalem Gold oder Polystyrol, gearbeitet. Diese Indikatorpartikel werden insbesondere

eingesetzt, um nicht erythrozytär gebundene Analyten, beispielsweise frei im Plasma vorkommende Antikörper, im Bindungskomplex in einer Indikatorzone sichtbar zu machen.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die eine Aufgabezone ferner zwei verschiedene Membranen unterschiedlicher Porosität. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise mit einer zusätzlich zu den Erythrozyten weiteren Sorte von Indikatorpartikeln, vorzugsweise aus kolloidalem Gold oder Polystyrol, gearbeitet. Diese Indikatorpartikel werden insbesondere eingesetzt, um
10 nicht erythrozytär gebundene Analyten, beispielsweise frei im Plasma vorkommende Antikörper, im Bindungskomplex in einer Indikatorzone sichtbar zu machen.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die eine Aufgabezone eine Membran oder zwei verschiedene Membranen unterschiedlicher Porosität. Ferner umfasst eine der beiden Membranen ein Konjugat-Pad, welches zwischen Dichtelement und Indikatorzonen angeordnet ist. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform wird vorzugsweise mit einer zusätzlich zu den Erythrozyten weiteren
20 Sorte von Indikatorpartikeln, vorzugsweise aus kolloidalem Gold oder Polystyrol, gearbeitet. Diese Indikatorpartikel werden insbesondere eingesetzt, um nicht erythrozytär gebundene Analyten, beispielsweise frei im Plasma vorkommende Antikörper, im Bindungskomplex in einer Indikatorzone sichtbar zu machen. Diese weitere zusätzlich zu den Erythrozyten eingesetzte Sorte von Indikatorpartikeln
25 liegt vorzugsweise in das Konjugat-Pad eingetrocknet vor. Weiterhin sorgt das Konjugat-Pad dafür, dass der Fluss der Erythrozyten verlangsamt wird. Dies führt dazu, dass in der bidirektionalen Anordnung bei einer einzigen gemeinsamen Aufgabezone in der einen Richtung optimierte Bedingungen für den Nachweis zellulärer Eigenschaften und in der anderen Richtung optimierte Bedingungen für
30 den Nachweis plasmatischer Eigenschaften bereitgestellt werden.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ein Lateral-Fluss-Test, insbesondere für die blutgruppenserologische Diagnostik, bereitgestellt, mit dem Erythrozyten als Indikatorpartikel verwendet werden und in einem Testansatz gleichzeitig
5 mehrere zelluläre Parameter, insbesondere erythrozytäre Antigene bzw. Antigen-Epitope, plasmatische Parameter und/oder Blutzelleigenschaften, insbesondere aus Vollblutbestandteilen, pro zu untersuchender Probe bestimmt werden können. Des weiteren wird damit ein möglichst einfach herzustellendes und einfach, insbesondere mit wenigen Versuchsreihen und ohne Probenvorbereitung, zu handhabendes und kostengünstiges Testsystem bereitgestellt, mit dem gleichzeitig ver-
10 schiedene zelluläre Parameter und/oder plasmatische Parameter einer Probe oder mehrerer zu untersuchender Proben bestimmt werden können.

Diese Vorteile bietet die erfindungsgemäße Vorrichtung auf jedem medizinisch-diagnostischen Gebiet, bei dem gleichzeitig verschiedene zelluläre Parameter und
15 plasmatische Parameter bestimmt werden sollen, insbesondere auch auf dem Gebiet der Blutgruppen- und Infektionsserologie, insbesondere für jegliche Diagnostik im Rahmen der Transfusionsmedizin, z. B. zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung, wobei insbesondere Erythrozyten-gebundene Antigene bzw. Antigen-Epitope bestimmt werden, und Serumgegenprobe, wobei insbeson-
20 dere reguläre Antikörper (Isoagglutinine) bestimmt werden, und/oder Antikörper-such-Test, wobei insbesondere irreguläre Antikörper bestimmt werden, sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker, beispielhaft Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, HCV, *Treponema pallidum*, sowie das Oberflächen-Antigen des
25 Hepatitis B Virus (HbsAg), sowie zur simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-thrombozytäre und anti-lymphozytäre Antikörper.

Hierzu kann antikoaguliertes oder natives Vollblut verwendet werden, bei dem
30 vor der Bestimmung nicht in aufwendiger Weise Erythrozyten und Serum- bzw.

- 14 -

Plasma-Fraktion von einander separiert werden müssen. Die Bestimmung kann in einem manuellen Format erfolgen, das komplett ohne Geräte (inklusive elektrischen Strom) auskommt.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung **umfassen die Indikatorzonen**, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, **Antikörper bzw. Antikörperfragmente bzw. Lektine**, die die zu bestimmenden Blutgruppenantigene aller denkbaren Blutgruppensysteme und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfangen
- 10 bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. Antikörperfragmente bzw. Lektine gegen Antigene oder Antigen-Epitope, insbesondere der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-D und anti-K, in den Indikatorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.
- 15 Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.
- 20 Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen **Antigene bzw. Antigen-Epitope, die reguläre Antikörper** in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden
- 25 dafür A1, A2, B, 0 Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope, beispielsweise Erythrozytenmembranen von Erythrozyten definierter Blutgruppen (A1, A2, B, 0) oder synthetisch hergestellte Blutgruppensubstanzen, an der porösen Membran angebracht. Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe
- 30 gelegenen Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) ange-

bracht, das den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein anti-IgG Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann in
5 einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe von
Indikatorzonen **Antigene bzw. Antigen-Epitope** umfassen, die **irreguläre Anti-
körper** bzw. Fragmente davon in der Probe abfangen bzw. binden. Als bevor-
zugte Bindungselemente werden dafür die Zellmembranen verschiedener Blut-
gruppe 0 Erythrozyten-Präparationen, deren kombiniertes Antigenprofil diejeni-
10 gen Antigene abdeckt, die gegen die wichtigsten Transfusions-relevanten irregulä-
ren Antikörper gerichtet sind, an der porösen Membran angebracht. Vorzugsweise
wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vorzugsweise in
einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen Indikatorzone,
ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das den Durchfluss
15 der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-
Bindungselement ist vorzugsweise ein anti-IgG Antikörper.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vor-
richtung **umfassen die Indikatorzonen**, vorzugsweise in einer distal zur Aufga-
20 bezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, **Antikörper bzw. Antikörper-
fragmente bzw. Lektine**, die die bei der Blutgruppenbestimmung zu bestimmen-
den Blutgruppenantigene und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfan-
gen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. An-
tikörperfragmente bzw. Lektine gegen Antigene oder Antigen-Epitope des AB0-
25 Blutgruppensystems, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-A und anti-B, in den Indi-
katorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezo-
ne und zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.

Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vor-
zugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen
30 Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das

den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst
5 in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe
von Indikatorzonen Thrombozyten- und/oder Lymphozytenmembranen bzw.
Membranbestandteile als Bindungselemente zum Nachweis von anti-
thrombozytären/lymphozytären Antikörpern.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vor-
richtung **umfassen die Indikatorzonen**, vorzugsweise in einer distal zur Aufga-
bezone angeordneten Reihe von Indikatorzonen, **Antikörper bzw. Antikörper-
fragmente bzw. Lektine**, die die bei der Blutgruppenbestimmung zu bestimmen-
15 den Blutgruppenantigene und damit die sie tragenden Zellen in der Probe abfan-
gen bzw. binden. Als bevorzugte Bindungselemente werden Antikörper bzw. An-
tikörperfragmente bzw. Lektine gegen Antigene oder Antigen-Epitope des AB0-
Blutgruppensystems, beispielhaft anti-A, anti-B, anti-A und anti-B, in den Indi-
katorzonen an der porösen Membran, vorzugsweise in einer distal zur Aufgabezo-
20 ne und zu anderen Indikatorzonenreihen angeordneten Reihe, angebracht.

Vorzugsweise wird in einer Indikatorzone dieser Reihe von Indikatorzonen, vor-
zugsweise in einer distal zu allen übrigen Indikatorzonen dieser Reihe gelegenen
Indikatorzone, ein Kontroll-Bindungselement (Kontrolle = ctl) angebracht, das
25 den Durchfluss der Probe durch die Indikatorzonen positiv anzeigt. Das Kontroll-
Bindungselement ist vorzugsweise ein polyklonaler anti-Erythrozyten-Antikörper.

Diese bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst
in einer weiteren, vorzugsweise proximal zur Aufgabezone angeordneten Reihe
30 von Indikatorzonen Bindungselemente zum Nachweis von infektiösen Agenzien,
insbesondere synthetisch hergestellte Peptide oder mit rekombinanten DNA-

Methoden exprimierte rekombinante Antigene, die diagnostisch bedeutsame Sequenzen von Oberflächenproteinen der jeweiligen Marker umfassen (Antikörper-Nachweis), oder Antikörper, welche gegen (Oberflächen-)Proteine infektiöser Agenzien gerichtet sind (Antigen-Nachweis).

5

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung muss für die gleichzeitige Bestimmung von zellulären und plasmatischen Parametern aus einer Probe nicht mehr für jede einzelne Bestimmung separat pipettiert werden, sondern an einer Probe können gleichzeitig sämtliche gewünschte Parameter bestimmt werden, insbesondere bei
10 der simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuch-Test sowie bei der simultanen Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker, wobei die Blutgruppenbestimmung mit dem Nachweis jeglicher infektionsserologischer Marker kombiniert werden kann, sowie bei der simultanen
15 Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Bestimmung von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-Thrombozyten und anti-Lymphozyten Antikörper.

Dies stellt eine außerordentliche Rationalisierung der Arbeitsabläufe dar. Neben dem Vorteil der Simultanbestimmung vieler serologischer Parameter ist hier der
20 praktisch vollständige Wegfall der Probenvorbereitung im Vergleich zu herkömmlichen Tests zu nennen. Auch die Ablesung der in diagonaler Anordnung dargestellten Ergebnisse ist wesentlich günstiger. So lassen sich in der erfindungsgemäßen Vorrichtung beispielsweise Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test, oder Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und andere immunhämatologische Parameter, insbesondere anti-thrombozytäre und/oder anti-lymphozytäre Antikörper
25 bzw. Fragmente davon, oder Blutgruppen-, insbesondere AB0-Eigenschaften und infektionsserologische Marker, insbesondere Antikörper gegen bakterielle und/oder virale Agenzien bzw. Fragmente davon oder virale oder bakterielle Antigene bzw. -Epitope in einer Vorrichtung nebeneinander bestimmen und ablesen.
30

Das zweidimensionale, flächige Ergebnis sowie der stabile Endpunkt der Reaktion begünstigen sowohl die Ablesung mit dem bloßen Auge als auch eine automatisierte Ablesung der Ergebnisse mit gängigen Bildanalyseverfahren, wie z. B. CCD-Kameras. Der Arbeitsaufwand ist vermindert, selbst bei manueller Abarbeitung. Die erfindungsgemäße Vorrichtung führt zudem zu einer Reduktion der Umweltbelastung und zu kostengünstigen Effekten. Selbst in Notsituationen mit Zeitdruck kann in kurzer Zeit in einer einzigen Versuchsanordnung beispielsweise eine komplette AB0-Blutgruppenbestimmung mit Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test nach irregulären Antikörpern durchgeführt werden, beispielsweise eine komplette AB0-Blutgruppenbestimmung mit infektionsserologischen Marker-Bestimmung oder anti-Thrombozyten/Lymphozyten Antikörper-Bestimmung durchgeführt werden.

Produktionstechnisch hat der Lateral-Diagonal-Fluss-Aufbau wesentliche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik, indem es zu einem erheblich geringeren Verbrauch der verwendeten Reagenzien kommt und durch die Bereitstellung einer Vielzahl von Testparametern, welche bisher separat getestet werden müssen, in einer einzigen Vorrichtung.

Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ein Lateral-Fluss-Test, insbesondere für die immunhämatologische und infektionsserologische Diagnostik, bereitgestellt, mit dem in einem Testansatz gleichzeitig mehrere zelluläre, insbesondere erythrozytäre Antigene bzw. Antigen-Epitope, plasmatische Parameter und/oder Blutzelleigenschaften, insbesondere aus Vollblutbestandteilen, pro zu untersuchender Probe bestimmt werden können, wobei mindestens zwei Sorten von Indikatorpartikeln, von denen mindestens eine Sorte Erythrozyten sind, verwendet werden. Des weiteren wird damit ein möglichst einfach herzustellendes und einfach, insbesondere mit wenigen Versuchsreihen und ohne Probenvorbereitung, zu handhabendes und kostengünstiges Testsystem bereitgestellt, mit dem gleichzeitig verschiedene zelluläre Parameter und/oder plasmatische Parameter einer Probe, insbesondere Blutgruppenmerkmale, Nachweis regulärer und irregulärer Antikör-

per, Antikörper gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten und/oder infektionsserologischer Marker, insbesondere solcher mit transfusionsmedizinischer Relevanz, bestimmt werden können.

5

Die **Membran** der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine poröse Membran. Bevorzugte Membran-Materialien sind beispielsweise Nitrozellulose (z. B. *UniS-art* von Sartorius, *HiFlow* von Millipore, Whatman, *AE99* bzw. *FF85/100* von Schleicher & Schuell), Polyethylen (*Lateral Flo* von Porex Corporation) oder
10 Nylon (*Novylon* von CUNO). Vorzugsweise weist die Membran eine möglichst große Porengröße auf, da eine hohe Porosität der Membran das Eindringen insbesondere von zellulären Komponenten der zu bestimmenden Probe, z. B. von Erythrozyten, in die poröse Struktur begünstigt. Von besonderem Vorteil ist der Einsatz aufnehmender Membranen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist jedoch
15 nicht auf diese Eigenschaften beschränkt. Bevorzugt werden alle Membranen mit einer hohen kapillaren Flussrate (Capillary Speed), wobei die kapillare Flussrate die Zeit ist, die eine Farblösung braucht, um 40 mm auf einer gegebenen Membran zurückzulegen. Besonders bevorzugt sind Membranen, deren kapillare Flussrate < 100 ist.

20

In der bidirektionalen Ausführungsform mit zwei unterschiedlichen Membranen hat die eine Membran vorzugsweise eine hohe kapillare Flussrate, vorzugsweise < 100, die andere Membran vorzugsweise eine geringere kapillare Flussrate, vorzugsweise > 100.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist in Fließrichtung hinter der Aufgabezone der erfindungsgemäßen Vorrichtung auf der porösen Membran ein **Dichtelement** angeordnet. Zur Anwendung kommen zwei- oder dreidimensionale Dichtelemente, die auf der porösen Membran platziert werden und mit
30 denen eine von der übrigen Fläche der porösen Membran separierte Probenauftragszone geschaffen wird. Das Dichtelement hat erfindungsgemäß primär die

Wirkung einer Flüssigkeitsbarriere und erlaubt die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran. Weiterhin dichtet das Dichtelement erfindungsgemäß die Probenauftragszone ab zur Verhinderung eines unerwünschten Flüssigkeitsübertritts in die anderen Bereiche der Lateral-
5 Fluss-Vorrichtungsanordnung.

Bevorzugte Ausführungsformen des Dichtelementes sind die Steg- oder Trogbzw. Trichter-Form. Die Ausformung des Dichtelementes erfolgt durch Schneideprozesse aus dem zur Herstellung des Dichtelementes verwendeten Material. Im
10 Fall der Trichter- bzw. Trogform erhält das Dichtelement eine innere Öffnung, deren bevorzugte Ausführungsvarianten runde, quadratische oder rechteckige, im Fall der Trichterform sich zur Unterseite (Membrankontaktseite) des Dichtelementes verjüngende Formen sind.

Bevorzugte Materialien für das Dichtelement sind Materialien, die nicht wasser-
15 aufnehmend (hydrophob) sind. In einer besonderen Ausführungsform sind die Materialien einseitig mit einem Klebstofffilm, beispielsweise einem drucksensitiven bzw. selbstaftenden Acrylatklebstoff, beschichtet. Somit kann das Dichtelement direkt auf die Oberfläche der porösen Membran geklebt werden. Alternativ kann das Dichtelement mit dem Lateral-Fluss-Gehäuse verbunden, beispielsweise
20 verklebt sein, wobei in dieser Ausführungsform das Lateral-Fluss-Gehäuse das Dichtelement auf die Oberfläche der porösen Membran drückt und damit die Funktionen des Dichtelementes erzielt werden.

Bevorzugte Materialien für die Ausbildung von zweidimensionalen Dichtelementen sind jede Form von Klebebändern oder Klebefolien (z. B. Tesa 4124 von
25 Beiersdorf AG, ARcare 7815 von Adhesives Research).

Bevorzugte Materialien für die Ausbildung von dreidimensionalen Dichtelementen sind flexible, geschlossenporige Elastomermaterialien oder flexible Silikonmaterialien mit unterschiedlichen Materialstärken, vorzugsweise 3-5 mm (z. B. Zellkautschuk EPDM140 von Pitzner, Silikonkautschuk oder Vollkautschuk,
30 Härte 40° oder weniger, von Castan).

Durch diese erfindungsgemäße Ausgestaltung ist die erfindungsgemäße Vorrichtung in der Lage, flüssige Proben, die Zellen enthalten, wie beispielsweise Vollblut, aufzunehmen, ohne die Zellen dabei abzufiltern. Weiterhin erlaubt das Dichtelement das Auftragen großer Probenvolumina auf die poröse Membran (Aufgabezone), ohne dass diese überschwemmt wird. Somit unterstützt das Dichtelement die Nutzung der aufnehmenden Eigenschaften der porösen Membran. Weiter garantiert das Dichtelement einen gerichteten Probenfluss. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann jedoch mit oder ohne Dichtelement gut funktionieren.

10

Für den **Absorptionsbereich** (Absorptions-Pad) der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden mechanisch stabile Materialien bevorzugt, vorzugsweise mit Wasserabsorptionskapazitäten von 20-30 g/100 cm² (z. B. Wicking Papier, Typ 300, Schleicher und Schüll). Der Kontakt zwischen dem Absorptions-Pad und der Lateral Fluss-Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird durch Andruck und Überlappung mit der porösen Membran hergestellt. Die genaue Positionierung des Absorptions-Pads auf der Membran wird durch Verkleben des Absorptions-Pads mit der, die Lateral Fluss-Membran tragenden Trägerschicht (backing sheet), erzielt.

20

Das Konjugat-Pad besteht vorzugsweise aus Glasfaser oder Cellulose und hat vorzugsweise die Eigenschaft, den Fluss nativer Erythrozyten zu verzögern.

In einer weiteren Ausführungsform sind die Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Zwecke der mechanischen Verstärkung auf eine Unterlage bzw. **Trägerschicht** aufgebracht. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann jedoch mit oder ohne Trägerschicht funktionieren. Bevorzugt werden mechanisch stabile und nicht wasseraufnehmende Materialien, vorzugsweise mit Materialstärken von 100 µm oder mehr, die ein- oder zweiseitig mit einem Klebstofffilm, z. B. einem drucksensitiven bzw. selbsthaftenden Acrylatklebstoff, beschichtet sind (z.B.

30

0.005'' Polyester W/ GL-187, G & L). Auf der Trägerschicht werden die poröse Membran und das Absorptions-Pad fixiert. Im Fall der doppelseitig klebenden Trägerschicht wird die klebende zweite Seite zur Fixierung des Stapels auf weiteren Flächen, z. B. innerhalb der Lateral-Fluss-Gehäuse, eingesetzt.

5

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Vorrichtung, entweder mit oder ohne Trägerschicht, auf der die Komponenten der erfindungsgemäßen Vorrichtung aufgebracht sind, in einem **Gehäuse** integriert, wodurch die Membran-Komponenten aneinander gedrückt werden und das Gehäuse die Dicht-
10 elementfunktion unterstützt. Dabei kann die erfindungsgemäße Vorrichtung jedoch mit oder ohne Gehäuse genauso gut funktionieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die **Verwendung** der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-
15 such-Test und/oder zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von Antikörpern gegen infektiöse, insbesondere bakterielle und/oder virale Agenzien bzw. Fragmenten davon oder von Antigenen infektiöser
20 Agenzien und/oder zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von Antikörpern gegen andere Blutzellen als Erythrozyten, insbesondere anti-thrombozytärer oder anti-lymphozytärer Antikörper, bzw. Fragmenten davon.

25

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst zum anderen durch ein **Verfahren** zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivaten in einer flüssigen Probe, welches das Auftragen der Probe auf die Aufgabezone einer Membran der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst, wobei diese Probe in ausreichender Menge
30 vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Deri-

- 23 -

vate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, an die jeweiligen Indikatorzonen zu binden bzw. in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

5 Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörper-such-Test durch.

Beispielhaft wird Vollblut oder eine Verdünnung davon auf die Aufgabezone der Vorrichtung aufgetragen. Alle Komponenten dringen, geführt durch das Dichtelement, in die poröse Membran ein und passieren bei der Migration in Richtung
10 Absorptions-Pad zunächst den Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe, der Fragmente der Zellen A1, A2, B, 0 umfassen sowie die Kontroll-Indikatorzone mit anti-IgG/IgM. Die im Serum vorhandenen Isoagglutinine binden an die korrespondierenden zellulär gebundenen Antigene. Serum-IgG bindet an das Kontrollbindungselement (Serumgegenprobe: Sensibilisierung).

15 Die zellulär gebundenen Antigene migrieren weiter in den distal zum Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe gelegenen Indikatorzonenbereich Blutgruppenbestimmung, in dem in jeder Indikatorzone ein Antikörper gegen ein anderes Blutgruppenmerkmal immobilisiert ist (z. B. anti-A, anti-B, anti-AB). Die zur Aufgabezone distalste Indikatorzone dieses Bereiches hat beispielhaft polyklonale anti-
20 Erythrozyten-Antikörper als Bindungselement. In diesem Indikatorzonenbereich binden die Erythrozyten an die Bindungselemente, die zu den jeweiligen Blutgruppenmerkmalen korrespondieren. An das Kontrollbindeelement binden Erythrozyten jedweder Blutgruppe (Blutgruppenbestimmung).

In einem folgenden Waschschrift wird ungebundenes Material aus der Membran
25 ausgewaschen. Im nachfolgenden Detektionsschrift werden mit Hilfe von synthetischen Partikeln, welche mit anti-IgG/IgM beschichtet sind, die an den Bindungselementen der proximalen Reihe von Indikatorzonen immobilisierten Isoagglutinine und Kontrollantikörper sichtbar gemacht (Serumgegenprobe: Detektion).

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur simultanen Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuchtest werden die Blutgruppenmerkmale wie oben beschrieben direkt bestimmt, hingegen Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuchtest als Wettbewerbstest durchgeführt:

Beispielhaft wird Vollblut oder eine Verdünnung davon auf die Aufgabezone der Vorrichtung aufgetragen. Alle Komponenten dringen, geführt durch das Dichtelement, in die poröse Membran ein und passieren bei der Migration in Richtung Absorptions-Pad zunächst den Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe, der Fragmente von Zellen der Blutgruppen A und B umfasst sowie die Kontroll-Indikatorzone, die Fragmente von Zellen der Blutgruppe 0 umfasst. Die im Serum vorhandenen Isoagglutinine binden an die korrespondierenden zellulär gebundenen Antigene. (Serumgegenprobe: Sensibilisierung).

Die zellulär gebundenen Antigene migrieren weiter in den distal zum Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe gelegenen Indikatorzonenbereich Blutgruppenbestimmung, in dem in jeder Indikatorzone ein Antikörper gegen ein anderes Blutgruppenmerkmal immobilisiert ist (z. B. anti-A, anti-B, anti-D). Die zur Aufgabezone distalste Indikatorzone dieses Bereiches hat beispielhaft polyklonale anti-Erythrozyten-Antikörper als Bindungselement. In diesem Indikatorzonenbereich binden die Erythrozyten an die Bindungselemente, die zu den jeweiligen Blutgruppenmerkmalen korrespondieren. An das Kontrollbindeelement binden Erythrozyten jedweder Blutgruppe (Blutgruppenbestimmung).

In einem folgenden Waschschrift wird ungebundenes Material aus der Membran ausgewaschen. Im nachfolgenden Schritt wird eine Suspension von unterschiedlichen synthetischen Partikeln, welche jeweils mit anti-A, anti-B oder anti-H beschichtet sind, auf die Aufgabezone aufgetragen. Die Partikel können jeweils nur an diejenigen Bindungselemente im Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe binden, die im Sensibilisierungsschritt nicht mit den Serum-Isoagglutininen in Kontakt gekommen waren, d. h. eine farbige Bande zeigt in diesem Falle die Abwesenheit des entsprechenden Isoagglutinins an. Beispielhaft werden im Falle einer Blutgruppe A (Personen mit Isoagglutininen anti-B) die Zellfragmente der

- B-Zellen durch die Isoagglutinine blockiert, was dazu führt, dass die Zellfragmente der A-Zellen durch das nachfolgend aufgetragene Gemisch synthetischer Partikel durch die darin vorhandenen anti-A Partikel angefärbt werden. Die Blutgruppe 0 Fragmente werden in allen denkbaren Konstellationen angefärbt, da sie nicht durch Isoagglutinine blockiert werden und dadurch immer frei sind für eine Reaktion mit den gefärbten anti-H Partikeln, wodurch auch in der Variante des 5 Kompetitionsassays ein Kontrollelement bereitgestellt wird (Serumgegenprobe: Detektion).
- 10 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur simultanen Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuch-Test mit direkter Bestimmung der Blutgruppenmerkmale und Bestimmung der Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuchtest als Wettbewerbstest wird wie folgt vorgegangen:
- 15 Vollblut oder eine Verdünnung davon wird auf die asymmetrische Aufgabebzone der Vorrichtung mit zwei unterschiedlichen porösen Membranenaufgetragen. Eine poröse Membran weist dabei eine geringere kapillare Flussrate als die andere Membran auf. Bei letzterer ist zwischen dem Dichtelement und den Indikatorzonen ein Konjugat-Pad, das aufgetrocknete anti-A/anti-B/anti-H-Partikel enthält, auf der Membran aufgebracht. Alle Komponenten dringen, geführt durch das 20 Dichtelement, in beide poröse Membranen ein, was folgende Flussverhalten bewirkt:
- „Nur-Membran-Seite“: Alle Komponenten passieren bei der Migration in Richtung des dazugehörenden Absorptions-Pads den Indikatorzonenbereich Blutgruppenbestimmung, in dem in jeder Indikatorzone ein Antikörper gegen ein anderes Blutgruppenmerkmal immobilisiert ist (z. B. anti-A, anti-B, anti-D). Die zur Aufgabebzone distalste Indikatorzone dieses Bereiches hat beispielhaft polyklonale anti-Erythrozyten-Antikörper als Bindungselement. In diesem Indikatorzonenbereich binden die Erythrozyten an die Bindungselemente, die zu den jeweiligen
- 25

- 26 -

Blutgruppenmerkmalen korrespondieren. An das Kontrollbindeelement binden Erythrozyten jedweder Blutgruppe.

„Membran/Konjugat-Pad-Seite“: Alle Komponenten kommen nach Eindringen in die Membran und Passieren des Dichtelements mit dem Konjugat-Pad in Kontakt, wobei die zellulären Bestandteile festgehalten bzw. gebremst werden und die flüssigen Komponenten (Plasma) ungehindert weiterfließen können. Letztere lösen die anti-A/anti-B/anti-H Partikel aus dem Konjugat-Pad. Der Indikatorzonenbereich Serumgegenprobe umfasst Fragmente von Zellen der Blutgruppen A und B sowie als Kontrollelement Fragmente von Zellen der Blutgruppe 0. Die im Serum vorhandenen Isoagglutinine binden an die korrespondierenden zellulär gebundenen Antigene und kompetieren damit um eine Bindung der farbigen anti-A, anti-B Partikel. Das bedeutet, dass die Partikel nur binden können, wenn das jeweilige Isoagglutinin nicht vorhanden ist. Beispielsweise hat eine Blutgruppe A Person anti-B Isoagglutinine, was dazu führt, dass die Blutgruppe-B Fragmente im Indikatorzonenbereich blockiert werden und nur die Blutgruppe A Fragmente durch die farbigen anti-A Partikel angefärbt werden können. Das Kontrollelement, gegen das keine Isoagglutinine existieren, bleibt damit immer unblockiert und wird durch die in der Partikelmischung des Konjugat-Pads enthaltenen anti-H Partikel als sichtbare Bande angefärbt.

20

Eine weitere besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und eine Bestimmung von anti-Thrombozyten und/oder anti-Lymphozyten Antikörper bzw. Fragmenten davon durch.

25 Beispielhaft umfassen für die Bestimmung der anti-thrombozytären Antikörper die Indikatorzonen im zur Aufgabezone proximalen Bereich Thrombozytenfragmente als Bindungselemente, an die –falls in der Probe vorhanden- im Serum enthaltene anti-thrombozytäre Antikörper binden. Das übrige Verfahren ist wie in der vorstehenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben, insbesondere erfolgt die Blutgruppenbestimmung wie dort beschrieben.

30

Eine weitere besondere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt simultan eine Blutgruppenbestimmung und eine Bestimmung transfusionsrelevanter infektionsserologischer Marker durch.

- 5 Beispielhaft umfassen für die Bestimmung von Infektionsmarkern die Indikatorzonen des ersten, proximalen Indikatorzonenbereichs als Bindungselemente synthetische Peptide und/oder rekombinante Proteine, die den Sequenzen von Proteinen viraler oder bakterieller Agenzien entsprechen, (Bestimmung von Antikörpern gegen Infektionsmarker, z. B. anti-HIV-1), sowie Antikörper, die gegen
- 10 Proteine von Infektionsmarkern gerichtet sind (Bestimmung von Antigenen, z. B. HbsAg). Im Serum enthaltene Antikörper bzw. Antigene binden im ersten Schritt an die korrespondierenden Antigene bzw. Antikörper. Das übrige Verfahren ist wie in der vorstehenden Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben, insbesondere erfolgt die Blutgruppenbestimmung wie dort beschrieben.
- 15

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich bei den zu bestimmenden **Analyten** insbesondere um Blutgruppen-Antigene bzw. Antigen-Epitope, vorzugsweise solche der Blutgruppensysteme AB0, Rh, Kell, um gegen Blutgruppenantigene oder -antigen-Epitope gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon, vorzugsweise reguläre Antikörper, irreguläre Antikörper, um Antikörper gegen infektiöse Agenzien, um (Oberflächen-)Antigene infektiöser Agenzien und/oder um anti-thrombozytäre oder anti-lymphozytäre Antikörper bzw. Fragmente davon.

25

Die zu untersuchende Probe, beispielsweise natives oder antikoaguliertes Vollblut oder Erythrozytenkonzentrate oder verdünnte Erythrozyten-Suspensionen, Blutbestandteile oder Testflüssigkeiten, wie Kontrollserum oder Kontrollzellen, wird auf die Aufgabebzone der erfindungsgemäßen Vorrichtung aufgetragen. Die in der

30 Probe enthaltenen Erythrozyten, die den/die Analyten tragen, dienen gleichzeitig als Indikatorpartikel.

Es werden insbesondere zwei Gruppen von Indikatorpartikeln verwendet. Die eine wird alleine durch Erythrozyten zum direkten Nachweis von Erythrozytengebundenen Analyten repräsentiert. Die andere Gruppe besteht aus Partikeln jeder
5 denkbaren Art und Kombination, mit denen sich Bindungsreaktionen nachweisen lassen, vorzugsweise Partikel aus kolloidalem Gold oder aus Polystyrol oder fixierte Erythrozyten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden pro Testlauf verschiedene Indikatorpartikel verwendet, von denen mindestens eine Sorte native Erythrozyten sind.

10

Im folgenden wird die Erfindung durch Figuren und Beispiele näher erläutert, ohne sie einzuschränken. Es zeigen:

15 Fig. 1 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe;

Fig. 2 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 1 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;

20 Fig. 3 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe, ausgeführt mit einem dreidimensionalen Dichtelement in Stegform;

25 Fig. 4 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 3 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;

Fig. 5 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe, ausgeführt mit einem dreidimensionalen Dichtelement in Trogform;

- 5 Fig. 6 eine Explosionsdarstellung der in Fig. 5 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests;

Fig. 7 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest für Empfänger;

- 10 Fig. 8 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Spendern;

15 Fig. 9 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Infektionsmarkern;

Fig. 10 eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene.

20

Fig. 11 zeigt eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit bidirektionalem Fluss für die simultane Bestimmung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe;

Fig. 12 zeigt eine Explosionsdarstellung der in Fig. 17 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests.

In Fig. 1 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6, angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-IX gebildet, wobei die Indikatorzonen I-V den Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ und die Indikatorzonen VI-IX den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
<i>Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe</i>		
I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1

II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2
III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

VI	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone V ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone IX ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

- 5 In Fig. 2 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 1 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests gezeigt, die aus den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und Dichtelement 4 besteht, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.
- 10

In Fig. 3 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel

- 32 -

entsprechen die Komponenten der Vorrichtung den Komponenten der in Fig. 1 dargestellten Vorrichtung mit Ausnahme des auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierten, in dreidimensionaler Stegform ausgeführten Dichtelements 4.

5 In Fig. 4 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 3 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und in dreidimensionaler Stegform ausgeführtes Dichtelement 4 gezeigt, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend
10 aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.

In Fig. 5 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel
15 entsprechen die Komponenten der Vorrichtung den Komponenten der in Fig. 1 dargestellten Vorrichtung mit Ausnahme des auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierten, in dreidimensionaler Trogform ausgeführten Dichtelements 4.

In Fig. 6 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 5 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit den Komponenten Trägerschicht 1, poröse Membran 2, Absorptions-Pad 3 und in dreidimensionaler Trogform ausgeführtes Dichtelement 4 gezeigt, welches die Aufgabezone 5 von der übrigen Membran separiert, die wiederum den Indikatorzonenbereich 6, bestehend
20 aus den Indikatorzonenbereichen „Serumgegenprobe“ und „Blutgruppenbestimmung“ mit den diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-IX enthält.
25

In Fig. 7 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsge-
mäßigen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von
Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Empfän-
gern gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Träger-
5 schicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimen-
sionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran
2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1
fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein
Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der
10 Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabe-
zone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung
von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der
Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorpti-
ons-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser
15 wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten,
punktförmigen Indikatorzonen I-XII gebildet, wobei die Indikatorzonen I-VIII
den Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuchtest“ und die Indi-
katorzonen IX-XII den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfas-
sen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

20

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe/Antikörpersuche

I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1
II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2
III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B

IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 1, Blutgruppe 0, Rh-Formel $R_1R_1^W$
VI	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 2, Blutgruppe 0, Rh-Formel R_2R_2
VII	Erythrozyten-Ghosts	Suchzelle 3, Blutgruppe 0, Rh-Formel R_1R_1
VIII	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

IX	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
X	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
XI	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
XII	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VIII ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone XII ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

In Fig. 8 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest bei Blutspendern gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 über-

lappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-X gebildet, wobei die Indikatorzonen I-VI den Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuchtest“ und die Indikatorzonen VII-X den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
<i>Indikatorzonenbereich: Serumgegenprobe/Antikörpersuche</i>		
I	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A1
II	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A2
III	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IV	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0
V	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0, Pool der Suchzellen 1, 2, 3 (siehe Beschreibung Fig. 8)
VI	Antikörper	Anti-human IgG/IgM
<i>Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung</i>		
VII	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)

IX	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
X	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VI ist die Kontrolle (ctl) für die Serumgegenprobe und Antikörper-
suchtest und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone X ist die
Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-
Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen In-
5 dikatorzonen.

In Fig. 9 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsge-
mäßigen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von
Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Infektionsmarkern gezeigt. Im vor-
liegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen
10 Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zweidimensionalen, in Stegform
ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem
drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist
das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorp-
tions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der po-
15 rösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der
übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüs-
sigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone
5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in
Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diago-
20 nal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen
Indikatorzonen I-XII gebildet, wobei die Indikatorzonen I-VI den Indikatorzonen-
bereich „Nachweis von Infektionsmarkern“ und die Indikatorzonen VII-XII den
Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgen-
den Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Nachweis von Infektionsmarkern

I	Synthetische Peptide	HIV-1 (gp-14, gp-41)
II	Synthetische Peptide	HIV-2 (gp-36)
III	Antikörper	Anti-HBsAg (monoklonal)
IV	Rekombinantes Antigen	HCV (C-100, C-200, C33c, C22)
V	Rekombinantes Antigen	Syphilis (TpN 15, TpN 17, TpN 47)
VI	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

VII	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
X	Antikörper	Anti-D (monoklonal)
XI	Antikörper	Anti-CDE (monoklonal)
XII	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone VI ist die Kontrolle (ctl) für die Bestimmung von Antikörpern gegen infektiöse Agenzien und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone XII ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

In Fig. 10 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests für die simultane Durchführung von

Blutgruppenbestimmung und dem Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene, gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, der porösen Membran 2, dem Absorptions-Pad 3 und dem zwei-dimensionalen, in Stegform ausgeführten Dichtelement 4. Dabei ist die poröse Membran 2 auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso ist das Absorptions-Pad 3 auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei ein Teil des Absorptions-Pad 3 mit der porösen Membran 2 überlappt. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2 fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezone 5 von der übrigen Membranfläche und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die poröse Membran 2. Zwischen der Aufgabezone 5 und dem Bereich der porösen Membran 2, der mit dem Absorptions-Pad 3 in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 6 angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I-IX gebildet, wobei die Indikatorzonen I-III den Indikatorzonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ und die Indikatorzonen IV-IX den Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ umfassen und aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
---------------	-----------------	---------------

Indikatorzonenbereich: Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene

I	Membranproteine	Thrombozyten, HPA 1bb3aa5bb
II	Membranproteine	Thrombozyten, HPA 1aa3bb5aa
III	Antikörper	Anti-human IgG/IgM

Indikatorzonenbereich: Blutgruppenbestimmung

IV	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
V	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
VI	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
VII	Antikörper	Anti-D (monoklonal)
VIII	Antikörper	Anti-CDE (monoklonal)
IX	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Indikatorzone III ist die Kontrolle (ctl) für den Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene und enthält anti-human IgG/IgM Antikörper. Indikatorzone IX ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu allen übrigen Indikatorzonen.

In Fig. 11 wird beispielhaft eine perspektivische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit bidirektionalem Fluss für die simultane Bestimmung von Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe gezeigt. Im vorliegenden Beispiel besteht die Vorrichtung aus einer Trägerschicht 1, einer porösen Membran 2a für die Blutgruppenbestimmung, einer von Membran 2a sich unterscheidenden porösen Membran 2b für die Serumgegenprobe, den Absorptions-Pads 3a und 3b, einem dreidimensionalen, in Trogform ausgeführten Dichtelement 4, und einem Konjugat-Pad 6. Dabei sind die porösen Membranen 2a und 2b auf der mit einem drucksensitiven Acrylatklebstoff versehenen Trägerschicht 1 fixiert. Ebenso sind die Absorptions-Pads 3a und 3b auf der Trägerschicht 1 fixiert, wobei je ein Teil der Absorptions-Pads 3a und 3b mit den porösen Membranen 2a und 2b überlappen. Das auf der Oberseite der porösen Membran 2a und 2b fixierte Dichtelement 4 separiert die Aufgabezonen 5a bzw. 5b von den übrigen Membranflächen und ermöglicht die gerichtete Verteilung von Probenflüssigkeit und Testreagenzien in die porösen Membranen 2a und 2b. Zwi-

schen der Aufgabezone 5a und dem Bereich der porösen Membran 2a, der mit dem Absorptions-Pad 3a in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 7a (Blutgruppenbestimmung) angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen I – VI gebildet, wobei die Indikatorzonen des Indikatorzonenbereiches 7a aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
I	Antikörper	Anti-A (monoklonal)
II	Antikörper	Anti-B (monoklonal)
III	Antikörper	Anti-AB (monoklonal)
IV	Antikörper	Anti-D (monoklonal)
V	Antikörper	Anti-CDE (monoklonal)
VI	Antikörper	Anti-Erythrozyten (polyklonal)

Die Indikatorzone VI ist die Kontrolle (ctl) für die Blutgruppenbestimmung und enthält polyklonale anti-Erythrozyten Antikörper. Sie befindet sich distal angeordnet zu den Indikatorzonen I-V.

Zwischen der Aufgabezone 5b und dem Bereich der porösen Membran 2b, der mit dem Absorptions-Pad 3b in Kontakt steht, ist der Indikatorzonenbereich 7b (Serumgegenprobe) angeordnet. Dieser wird aus diagonal versetzten, in definierten X- und Y-Positionen angeordneten, punktförmigen Indikatorzonen VII – IX gebildet, wobei die Indikatorzonen des Indikatorzonenbereiches 7b aus den folgenden Bindungselementen bestehen:

- 41 -

Indikatorzone	Bindungselement	Spezifikation
VII	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe A
VIII	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe B
IX	Erythrozyten-Ghosts	Blutgruppe 0 (Kontrolle)

In Fig. 12 wird eine Explosionsdarstellung der in Fig. 11 dargestellten erfindungsgemäßen Vorrichtung für Lateral-Fluss-Tests mit bidirektionalem Fluss gezeigt, die aus den Komponenten Trägerschicht 1, einer porösen Membran 2a für die Blutgruppenbestimmung, einer von Membran 2a sich unterscheidenden porösen Membran 2b für die Serumgegenprobe, den Absorptions-Pads 3a und 3b, einem dreidimensionalen, in Trogform ausgeführten Dichtelement 4, und einem Konjugat-Pad 6 bestehen. Die Probenaufgabezone erstreckt sich über beide porösen Membranen mit der Probenaufgabezone 5a der Membran 2a und der Probenaufgabezone 5b der Membran 2b und wird durch das in Trogform ausgeführte Dichtelement 4 von den übrigen Flächen der Membranen 2a und 2b separiert. Die Membran 2a enthält den Indikatorzonenbereich 7a mit den von proximal nach distal diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen I-VI, während die Membran 2b den Indikatorzonenbereich 7b mit den von proximal nach distal diagonal versetzt angeordneten Indikatorzonen VII-IX enthält.

Beispiele

Beispiel 1: Simultane Blutgruppenbestimmung (direkter Assay) und Serumgegenprobe (direkter Bindungsassay)

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, einem Indikatorzonenbereich
5 und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065
werden in Streifen auf eine Größe von 15 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zu-
rechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet, z. B. von G&L) auf-
geklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indi-
katorzonenbereiche „Serumgegenprobe“ (proximal zur Aufgabezone angeordnet)
10 und Blutgruppenbestimmung (distal zur Aufgabezone angeordnet) aufteilt, je 0,2
 μ l Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter Verwendung eines Dispen-
sers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ – Suspensionen von Erythrozyten-
Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgruppe B und Blut-
15 gruppe 0 (hergestellt aus Erythrozytenkonzentraten) sowie Anti-human IgG/IgM
Antikörper (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759)
als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Anti-
körper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4
(Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone AB6, AB26, AB92 (Me-
20 dion Diagnostics, 010062); anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of
anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serum-
gegenprobe“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in
Position $x=2,5$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend
25 in Abständen von $x=2,5$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position der Erythrozyten-Ghosts der
Spezifikation Blutgruppe A1 dispensiert. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-
0.5 %ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v)
Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzentration

von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=3$ mm/
5 $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=3$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

10 Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2
15 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=5$ mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 100 µl unverdünntes bzw. 1:3 oder 1:6 in Verdünnungspuffer (EnlisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
20 gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der Membran zu entfernen. Im Anschluß werden 50 µl anti-IgG/A/M konjugierte Goldpartikel (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800,
25 CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0.08 % Gelatine, 0.5 % Albumin, auf die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabezone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

(a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone IX, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone V, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“) charakteristisch purpurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist.

(b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoagglutinine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen.

Beispiel 2: Simultanbestimmung von Blutgruppen (direkter Assay) und Serumgegenprobe (Kompetitionsassay)

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, zwei Indikatorzonenbereichen zu beiden Seiten der Aufgabezone und zwei Absorptionsbereichen. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065 und HiFlow Plus 140 werden in Streifen auf eine Größe von 15 mm x 20 mm (Breite/Länge; x/y) zurechtgeschnitten und nebeneinander auf eine Trägerschicht (Backing Sheet, z. B. von G&L) aufgeklebt. Auf der HiFlow Plus 140 Membran wird zusätzlich ein Konjugat Pad, in das anti-A/anti-B/anti-H konjugierte Goldpartikel eingetrocknet sind, so aufgebracht, dass es sich zwischen Dichtelement (Klebestreifen) und Indikatorzonen befindet. An-

stelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“, der sich auf der HiFlow Plus 065 Membran befindet, je 0,2 µl Punkte folgender Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen: Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

10 In gleicher Weise werden im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“, der sich auf der HiFlow Plus 140 Membran befindet, – Suspensionen von Erythrozyten-Ghosts der Blutgruppe A, Blutgruppe B und Blutgruppe 0 (hergestellt aus Erythrozytenkonzentraten) aufgetragen.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serumgegenprobe“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A in Position $x=3$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=3$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position der Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A dispensiert. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-0.5 %ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=2,5$ mm/ $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Test-

durchführung aufbewahrt. An den beiden zur Aufgabezone distalen Enden wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=5$ mm über die
5 gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 100 μ l unverdünntes bzw. 1:3 oder 1:6 in Verdünnungspuffer (En-
10 lisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zwei-
malig mit 100 μ l EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der
Membran zu entfernen.

Ergebnis:

(a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzonen-
15 bereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt)
zeigt und wenn die Erythrozyten-Blutgruppe 0 Kontrolle (Indikatorzonenbereich
„Serumgegenprobe“) charakteristisch purpurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der
verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist.

(b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blut-
20 gruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzo-
nenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse
Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoaggluti-
nine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das Fehlen der
entsprechenden Bande gekennzeichnet. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins ist
25 die entsprechende Bande charakteristisch angefärbt.

Beispiel 3: Simultane Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörper-such-Test bei Empfängern

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabezone, einem Indikatorzonenbereich
5 und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065
werden in Streifen auf eine Größe von 20 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zu-
rechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet, z. B. von G&L) auf-
geklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indi-
katorzonenbereiche „Serumgegenprobe/ Antikörpersuche“ (proximal zur Aufga-
10 bezone angeordnet) und „Blutgruppenbestimmung“ (distal zur Aufgabezone an-
geordnet) aufteilt, je 0,2 μ l Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter
Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ – Suspensionen von
Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgrup-
15 pe B, Blutgruppe 0, Blutgruppe 0 Rh-Formel $R_1R_1^W$ (Suchzelle 1), Blutgruppe 0
Rh-Formel R_2R_2 (Suchzelle 2), Blutgruppe 0 Rh-Formel R_1R_1 (Suchzelle 3), so-
wie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-
3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ -
Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper –
20 Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper- (Klone AB6, AB26,
AB92 (Medion Diagnostics, 010062); anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG
Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serum-
gegenprobe“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in
25 Position x=3 mm/ y=10 mm, die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Spe-
zifikation Blutgruppe A2, B, 0 folgt iterierend in Abständen von x=2 mm/ y=1,5
mm. Die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Suchzelle 1 erfolgt in Posi-
tion x=11 mm/ y=10 mm, die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Such-
zellen 2 und 3 sowie des humanen IgG/IgM iterierend in Abständen von x=2 mm/

- 48 -

y=1,5 mm. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-0.5%ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzentration von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

- 5 Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position x=4 mm/ y=20 mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von x=4 mm/ y=1,5 mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdün-
- 10 (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Test-

15 Membran um 3 mm überlappendes 20x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position y=5 mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

- 20 Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 120 µl unverdünntes bzw. 1:3 oder 1:6 in Verdünnungspuffer (EnlisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
- 25 Membran zu entfernen. Im Anschluß werden 75 µl anti-IgG/A/M konjugierte Goldpartikel (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800, CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS, 0.08 % Gelatine, 0.5 % Albumin, auf die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab Fran-

ce/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabzone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 120 µl EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

(a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone
5 XII, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VIII, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Die anti-IgG/IgM-Kontrolle muss in jedem Fall angefärbt sein, so dass
10 bei einer Person mit Blutgruppe AB, die keine irregulären Antikörper hat, die Anfärbung dieser Indikatorzone bei völliger Abwesenheit anderer Signale im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ auf eine korrekte Testdurchführung verweist. Die Indikatorzone IV (Erythrozyten-Ghosts Blutgruppe 0) ist eine negative Kontrolle für Isoagglutinine. Eine Anfärbung dieser Indikatorzone
15 bedeutet, dass neben Isoagglutininen auch irreguläre Antikörper vorhanden sein müssen, d. h. dass mindestens eine der drei Indikatorzonen V, VI, VII ebenfalls angefärbt sein muss. Ist dies nicht der Fall, so ist der Test ungültig.

(b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoagglutinine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind
25 keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen. Bei Vorhandensein eines irregulären Antikörpers sind ein, zwei oder alle drei der Indikatorzonen mit den Erythrozyten-Ghosts der Suchzellen 1, 2 oder

3 durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel angefärbt oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar.

- 5 **Beispiel 4:** Simultane Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuch-Test für Spender

Herstellung der Teststreifen:

Der grundsätzliche Aufbau der Teststreifen entspricht dem Teststreifenaufbau in Beispiel 2. Das Format der Millipore HiFlow Plus 065 Membran beträgt 15 mm x
10 35 mm (Breite/Länge; x/y). Der Indikatorzonen des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ entsprechen dem Beispiel 2. Im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ werden je 0,2 µl Punkte der folgenden Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) dispensiert:

- 15 Suspensionen von Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1, Blutgruppe A2, Blutgruppe B, Blutgruppe 0, Erythrozytenghosts aus einem Gemisch der Suchzellen 1-3 (siehe Beispiel 2), sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ startet mit Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A1 in Position x=2,5 mm/ y=10 mm, die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts der Spezifikation Blutgruppe A2, B, 0 iterierend in Abständen von x=2 mm/ y=1,5 mm. Die Positionierung der Erythrozyten-Ghosts des Gemisches der Suchzellen 1-3 erfolgt in Position x=10,5 mm/ y=13 mm, die des humanen
25 IgG/IgM in Position x=12,5 mm/ y=14,5 mm. Die Erythrozyten-Ghosts werden als 0.1-0.5%ige (v/v) Suspensionen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper als 1:1 Gemisch in Konzent-

- 51 -

ration von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

- Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=3$ mm/ $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches werden iterierend in Abständen von $x=3$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.
- Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=6$ mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Der Testansatz entspricht dem Ansatz in Beispiel 1.

Ergebnis:

- (a) Kontrollen: Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone X, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Die anti-IgG/IgM-Kontrolle muss in jedem Fall angefärbt sein, so dass bei einer Person mit Blutgruppe AB, die keine irregulären Antikörper hat, die Anfärbung dieser Indikatorzone bei völliger Abwesenheit anderer Signale im Indi-

katorzonenbereich „Serumgegenprobe/Antikörpersuche“ auf eine korrekte Testdurchführung verweist. Die Indikatorzone IV (Erythrozyten-Ghosts Blutgruppe 0) ist eine negative Kontrolle. Eine Anfärbung dieser Indikatorzone bedeutet, dass neben Isoagglutininen auch irreguläre Antikörper vorhanden sein müssen, d. h. dass mindestens eine der drei Indikatorzonen V, VI, VII ebenfalls angefärbt sein muss. Ist dies nicht der Fall, so ist der Test ungültig.

(b) Testergebnisse: Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen im Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ rote Punkte (positiv) oder die fast weiße Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Die korrespondierenden Isoagglutinine sind im Indikatorzonenbereich „Serumgegenprobe“ durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel als purpurfarbene Punkte oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar. Bei Abwesenheit eines Isoagglutinins sind keine sich vom Hintergrund unterscheidenden Signale in diesen Positionen zu erkennen. Bei Vorhandensein eines irregulären Antikörpers sind ein, zwei oder alle drei der Indikatorzonen mit den Erythrozyten-Ghosts der Suchzellen 1, 2 oder 3 durch das charakteristische Purpur der Goldpartikel angefärbt oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel erkennbar.

20

Beispiel 5: Simultane Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Infektionsmarkern

Herstellung der Teststreifen:

Die Teststreifen bestehen aus einer Aufgabeezone, einem Indikatorzonenbereich und einem Absorptionsbereich. Membranen der Sorte Millipore HiFlow Plus 065 werden in Streifen auf eine Größe von 15 mm x 35 mm (Breite/Länge; x/y) zu-

rechtgeschnitten und auf eine Trägerschicht (Backing Sheet z. B. von G&L) aufgeklebt. Diagonal versetzt werden im Indikatorzonenbereich, der sich in die Indikatorzonenbereiche „Nachweis von Infektionsmarkern“ (proximal zur Aufgabezone angeordnet) und „Blutgruppenbestimmung“ (distal zur Aufgabezone angeordnet) aufteilt, je 0,2 µl Punkte der verschiedenen Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) aufgetragen:

Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“ – Lösungen rekombinanter Antigene (Syphilis; TpN 15, TpN 17, TpN 47), synthetischer Peptide aus Sequenzen der Glykoproteine gp-14, gp-41 (HIV-1; HIV-O) und gp-36 (HIV-2), rekombinante HCV Antigene (C-100, C-200, C33c, C22), monoklonale Antikörper (HBsAg) sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); Anti-D Antikörper – Klone LDM3/ESD1 (SNBTS), Anti-CDE Antikörper – Klone MS-24/MS-201/MS 80/MS-258 (Serologicals), Anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139).

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Nachweis von Infektionsmarkern“ startet mit synthetischen Peptiden der Spezifität HIV-1 (gp-14, gp-41) in Position $x=2,5$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position der Indikatorzone I dispensiert. Die Bindungselemente der Indikatorzonen I-V werden in geeigneten Konzentrationen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ startet mit dem Anti-A Antikörper in Position $x=2,5$ mm/ $y=20$ mm. Alle anderen Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches werden

- 54 -

iterierend in Abständen von $x=2$ mm/ $y=1,5$ mm zur Position des anti-A Antikörpers dispensiert. Die Verdünnungen der Antikörper erfolgen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol) wie folgt: Anti-A Antikörper 1:3, anti-B Antikörper 1:2, anti-AB Antikörper 1:4, anti-RBC Antikörper 1:3.

- 5 Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2
10 mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position $y=6$ mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen Test werden 100 μ l unverdünntes bzw. 1:3 bzw. 1:6 in Verdünnungspuffer (EnlisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
15 gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zweimalig mit 100 μ l EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der Membran zu waschen.

Im Anschluß werden 50 μ l eines Gemisches aus anti-IgG/A/M konjugierten
20 Goldpartikeln (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800, CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS , 0.08 % Gelatine, 0.5 % Albumin, sowie anti-HbsAg konjugierten Goldpartikeln (Arista Biologicals, ABHBS-0500) in geeigneter Verdünnung auf die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100 bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden,
25 z.B. von Merck Eurolab France/Estapor. Wenn diese die Aufgabezone verlassen haben, wird die Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 μ l EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

- 55 -

Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone XII, Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“) charakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt ist. Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen rote Punkte (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen HIV-1, HIV-2, Syphilis bzw. von Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) ist die jeweilige Position durch das für Gold-Partikel charakteristische Purpur angefärbt und als purpurfarbene Punkte erkennbar. Wenn Polystyrolpartikel als Indikatorpartikel verwendet werden, ist die jeweilige Position in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt. Im weitaus häufigsten Fall, nämlich einer negativen Reaktion für alle Infektionsmarker, wird nur die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone VI, Indikatorzonenbereich „Nachweis von Infektionsmarkern“) angefärbt.

Beispiel 6: Simultane Blutgruppenbestimmung und Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene

20 Herstellung der Teststreifen:

Der grundsätzliche Aufbau und das Format der Teststreifen entspricht dem Teststreifenbau in Beispiel 4. Der Indikatorzonenbereich untergliedert sich in die Indikatorzonenbereiche „Blutgruppenbestimmung“ und „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“. Es werden je 0,2 µl Punkte der folgenden Bindungselemente unter Verwendung eines Dispensers, z.B. AD3200 (Biodot) dispensiert:

Indikatorzonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ – Membranproteine von Thrombozyten der Blutgruppe 0 mit distinkten HPA-Antigenprofilen wie HPA 1bb3aa5bb und HPA 1aa3bb5aa sowie Anti-human IgG/IgM (Goat anti human IgG, Goat anti human IgM, Sigma, I-3382, I-0759) als Kontrolle; Indikatorzonenbereich „Blutgruppenbestimmung“ - Anti-A Antikörper – Klon Birma-1 (Serologicals, TLJ0105); Anti-B Antikörper – Klon ES-4 (Serologicals, NCA0201); Anti-AB Antikörper - Klone AB6, AB26, AB92 (Medion Diagnostics, 010062); Anti-D Antikörper – Klone LDM3/ESD1 (SNBTS), Anti-CDE Antikörper – Klone MS-24/MS-201/MS 80/MS-258 (Serologicals), Anti-Erythrozyten Antikörper (Rabbit IgG Fraction of anti Human RBC, Rockland, 209-4139). Als Alternative zu den Membranproteinen der Thrombozyten können auch rekombinante Antigene mit den entsprechenden Merkmalsausprägungen (HPA-Antigenprofile) aufgetragen werden.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“ startet mit Membranproteinen Antigenprofil HPA 1bb3aa5bb in Position $x=4$ mm/ $y=10$ mm. Alle anderen Bindungselemente werden iterierend in Abständen von $x=3,5$ mm/ $y=2$ mm zur Position der Indikatorzone I dispensiert. Die Bindungselemente der Indikatorzonen I und II werden in geeigneten Konzentrationen in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol, die anti-human IgG/IgM Antikörper in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in 15 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 10% (v/v) Methanol dispensiert.

Die Positionierung der Bindungselemente des Indikatorzonenbereiches „Blutgruppenbestimmung“ entspricht dem Beispiel 4.

Die Membranen werden nach dem Dispensieren der Bindungselemente für 20 min bei 40°C getrocknet und anschließend bei konstanter Luftfeuchte bis zur Testdurchführung aufbewahrt. Am zur Aufgabezone distalen Ende wird ein mit der Membran um 3 mm überlappendes 15x15 mm großes Absorptions-Pad (Schleicher & Schüll, 300) aufgeklebt. Die Aufgabezone wird durch Aufkleben eines 1-2

- 57 -

mm breiten Klebestreifens (Tesa 4124) in Position y=6 mm über die gesamte Membranbreite von der übrigen Membran separiert.

Testansatz:

Als Blutproben werden antikoagulierte Vollblute verwendet. Für den eigentlichen
5 Test werden 100 µl unverdünntes bzw. 1:3 bzw. 1:6 in Verdünnungspuffer (En-
lisstII, Medion Diagnostics oder Diluent 1, DiaMed) verdünntes Blut in die Auf-
gabezone aufgetragen. Wenn das Blut die Aufgabezone verlassen hat, wird zwei-
malig mit 100 µl EnlisstII gewaschen, um ungebundene Erythrozyten aus der
Membran zu waschen.

10 Im Anschluß werden 50 µl eines Gemisches aus anti-IgG/A/M konjugierten
Goldpartikeln (20 bis 40 nm, Arista Biologicals, CGIGA-0800, CGIGG-0800,
CGIGM-0800), 1:10 (v/v) verdünnt in TBS , 0.08 % Gelatine, 0.5 % Albumin, auf
die Aufgabezone aufgetragen. Anstelle der Goldpartikel können auch farbige, 100
bis 400 nm Polystyrolpartikel verwendet werden, z.B. von Merck Eurolab Fran-
15 ce/Estapor. Wenn die Goldpartikel die Aufgabezone verlassen haben, wird die
Membran nochmals ein- oder zweimalig mit 100 µl EnlisstII gewaschen.

Ergebnis:

Der Test ist gültig, wenn die anti-RBC Kontrolle (Indikatorzone IX, Indikatorzo-
nenbereich „Blutgruppenbestimmung“) ein deutlich positives Signal (Roter
20 Punkt) zeigt und wenn die anti-IgG/IgM-Kontrolle (Indikatorzone III, Indikator-
zonenbereich „Nachweis von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene“) cha-
rakteristisch pupurn (Goldpartikel) oder in der Farbe der verwendeten Polysty-
rolpartikel gefärbt ist. Je nach Anwesenheit oder Abwesenheit der jeweiligen
Blutgruppenantigene erscheinen an den entsprechenden Positionen rote Punkte
25 (positiv) oder die fast weisse Hintergrundfärbung der Membran (negativ). Bei
Vorhandensein von Antikörpern gegen thrombozytäre Antigene ist die jeweilige
Position durch das für Gold-Partikel charakteristische Purpur angefärbt und als
purpurfarbene Spots erkennbar. Wenn Polystyrolpartikel als Indikator-Partikel

- 58 -

verwendet werden, ist die jeweilige Position in der Farbe der verwendeten Polystyrolpartikel gefärbt.

Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung zum gleichzeitigen und qualitativen oder quantitativen Bestimmen mehrerer Analyten in einer flüssigen Probe, umfassend mindestens eine Membran (2) mit
- einer Aufgabezone (5) zum Auftragen der flüssigen Probe,
 - mindestens einer Gruppe von mindestens zwei Indikatorzonen, die mit
 - 10 dem/den Analyten in Wechselwirkung treten können und
 - mindestens einem Absorptionsbereich (3), welcher die Flüssigkeit nach Passieren der Indikatorzonen aufnimmt,
- wobei die Indikatorzonen zwischen der Aufgabezone (5) und dem Absorptionsbereich (3) liegen, dadurch gekennzeichnet, dass
- 15 die Fließrichtungen von der Aufgabezone (5) durch die jeweiligen Indikatorzonen einer Gruppe zu einem Absorptionsbereich (3) (Fließspuren) im Wesentlichen parallel sind und mindestens zwei unterschiedliche Fließspuren vorliegen.
- 20 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Indikatorzonen so angeordnet sind, dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Indikatorzonen in einer diagonalen,
- 25 V-, W-, M-, N-förmigen oder linearen Reihe angeordnet sind.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens zwei Reihen von Indikatorzonen in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich versetzt angeordnet sind und die Indikatorzonen der verschiedenen Reihen zuein-

ander auf Lücke angeordnet sind, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur nicht mehr als eine Indikatorzone durchströmt.

- 5 5. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 3, wobei mindestens zwei Reihen von Indikatorzonen in Fließrichtung hintereinander und/oder seitlich angeordnet sind und die Indikatorzonen der verschiedenen Reihen zueinander nicht auf Lücke angeordnet sind, so dass die Probenflüssigkeit pro Fließspur mehr als eine Indikatorzone durchströmt.
- 10 6. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3, wobei mindestens 2 Gruppen von Indikatorzonen angeordnet sind, welche von der Aufgabezone her in unterschiedlichen Fließrichtungen liegen.
- 15 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Indikatorzonen Antikörper bzw. Antikörperfragmente bzw. Lektine, Antigene bzw. Antigen-Epitope und/oder Zellen bzw. Zellfragmente umfassen.
- 20 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope und Membranen bzw. Zellfragmente von Blutgruppe A1, A2, B und/oder O Erythrozyten umfassen.
- 25 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope und synthetische Peptide, rekombinante Antigene und/oder Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen infektiöse Marker umfassen.
- 30 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Indikatorzonen insbesondere Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente gegen Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope und Fragmente von Thrombozyten und/oder Lymphozyten umfassen.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Membran oder die Membranen (2) vorzugsweise aus Polyethylen, Nitrozellulose oder Nylon, bestehen.
- 5
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei hinter der Aufgabezone (5) und vor den Indikatorzonen auf der Membran (2) mindestens ein Dichtelement (4) angeordnet ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei hinter dem Dichtelement (4) und vor den Indikatorzonen mindestens ein Konjugat-Pad aufgebracht ist.
- 10
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Komponenten der Vorrichtung zur mechanischen Verstärkung auf eine Trägerschicht (1) aufgebracht sind.
- 15
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Komponenten der Vorrichtung in einem Gehäuse integriert sind.
- 20
16. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe und/oder Antikörpersuch-Test.
17. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von infektionsserologischen Markern bzw. Fragmenten davon.
- 25
18. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Analyse von Blut, insbesondere zur simultanen Durchführung der Blutgruppenbestimmung und des Nachweises von Antikörpern gegen Blutzellen, insbesondere
- 30

anti-Thrombozyten oder anti-Lymphozyten Antikörper, bzw. jeweils Fragmenten davon.

5 19. Verfahren zur Bestimmung mehrerer Analyten oder deren Derivate in einer flüssigen Probe, umfassend:

10 das Auftragen der Probe auf die Aufgabezone (5) mindestens einer Membran (2) der Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 15, wobei diese Probe in ausreichender Menge vorliegt, um die Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in Richtung Absorptionsbereich (3) durch die Indikatorzonen zu fließen und um die Analyten oder ihre Derivate in der Probenflüssigkeit dazu zu veranlassen, in den Indikatorzonen einen Komplex zu bilden.

15 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Analyte oder deren Derivate Blutgruppenantigene bzw. -antigen-Epitope, gegen Blutgruppenantigene gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon, gegen Thrombozyten- oder Leukozyten gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon oder gegen infektiöse Agenzien gerichtete Antikörper bzw. Fragmente davon oder Antigene infektiöser Agenzien bzw. Antigen-Epitope sind.

20 21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antigene bzw. Antigen-Epitope der Blutgruppensysteme AB0, Rh und Kell umfassen.

25

22. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antikörper bzw. Fragmente davon gegen Thrombozyten und/oder Lymphozyten umfassen.

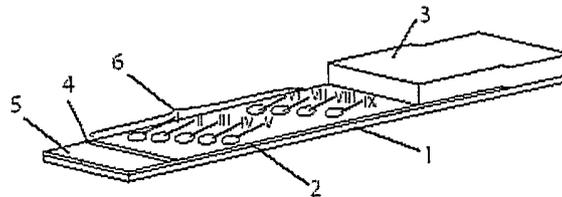
30 23. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Analyte oder deren Derivate insbesondere Antikörper bzw. Fragmente davon gegen bakterielle und/oder vi-

rale Agenzien bzw. virale oder bakterielle Antigene bzw. Antigen-Epitope umfassen.

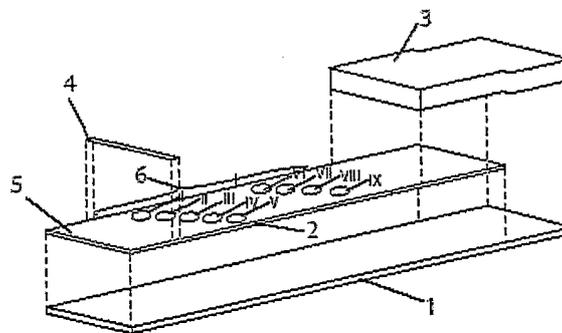
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei die flüssigen Proben
5 vorzugsweise aus Vollblut, Blutzell-Konzentrat, Serum, Plasma und/oder
Testflüssigkeit, beispielsweise Kontrollserum oder Kontrollzellen, bestehen.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 24, wobei mindestens zwei Sor-
ten Indikatorpartikel verwendet werden, von denen mindestens eine Sorte E-
10 rythrozyten sind.

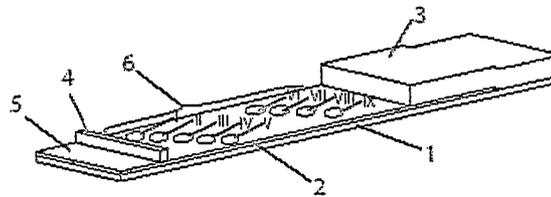
Figur 1



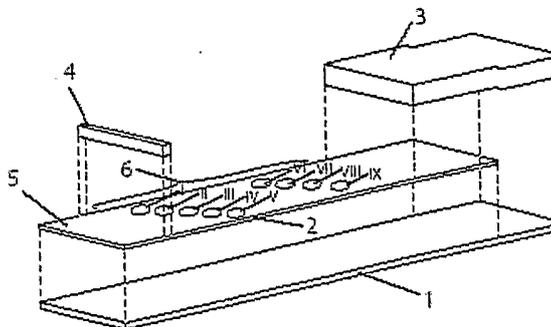
Figur 2



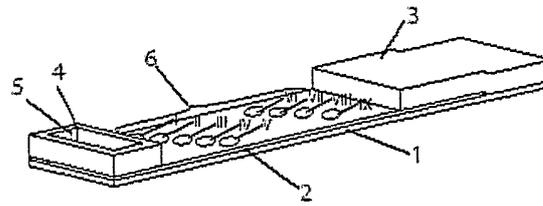
Figur 3



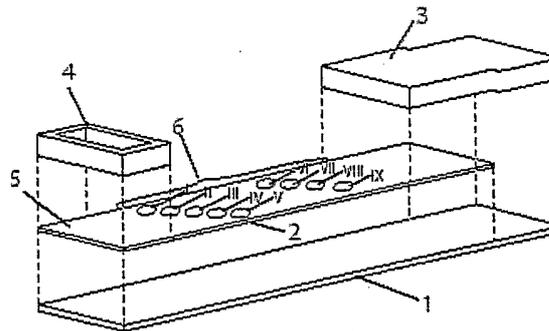
Figur 4



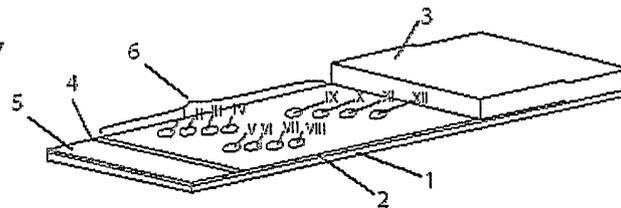
Figur 5



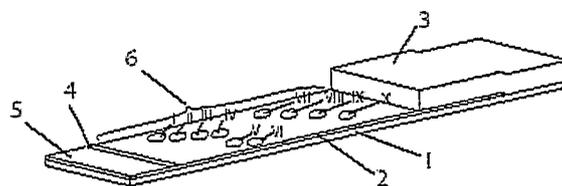
Figur 6

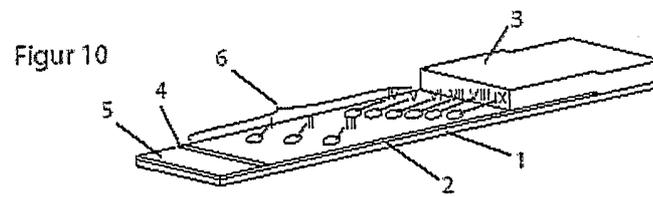
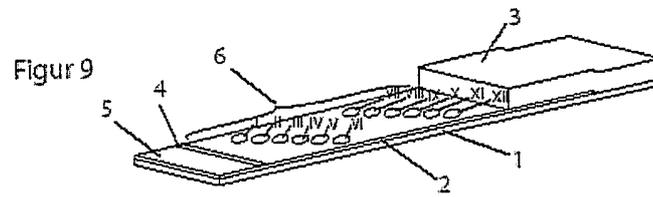


Figur 7

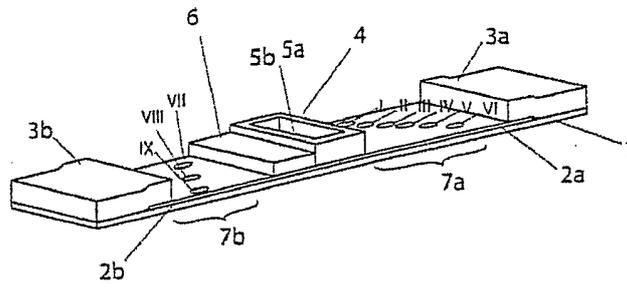


Figur 8

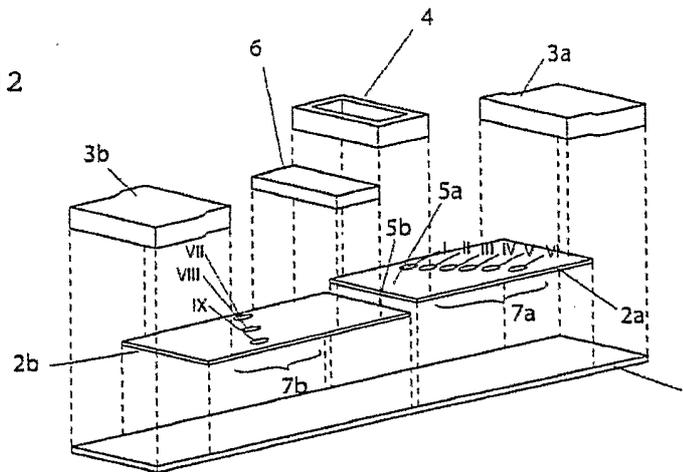




Figur 11



Figur 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/558 G01N33/80

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/31268 A (UNIVERSAL HEALTHWATCH INC ; BERNSTEIN DAVID (US)) 28 August 1997 (1997-08-28) page 5, line 17 - line 25 page 5, line 33 - page 6, line 33 page 8, line 14 - page 9, line 19 page 12, line 6 - line 20 page 13, line 34 - page 14, line 27 page 17, line 15 - line 25 page 21, lines 1-16 page 23, line 23 - page 24, line 2 claims 1,2,18 figures 2,3 <div style="text-align: center;">----- -/--</div>	1-25

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

3 November 2004

17/11/2004

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

 Angioni, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 203 757 B1 (CHAN LIANG ET AL) 20 March 2001 (2001-03-20) figures 2-7 column 1, lines 5-12 column 3, lines 47-58 column 4, lines 2-4 column 6, lines 47-60 claim 1	1-25
X	US 2003/045001 A1 (BUCHANAN IAN ET AL) 6 March 2003 (2003-03-06) figures 1-4 page 1, paragraph 2 page 2, paragraphs 11-13,18 page 3, paragraph 21-25 page 4, paragraphs 32-34,40-42 page 8, paragraph 67	1-25
X	US 2003/040021 A1 (CLARK SCOTT M ET AL) 27 February 2003 (2003-02-27) figures 1,4-6,9 page 1, paragraphs 2,8 page 4, paragraph 79 page 5, paragraph 91-115 - page 7	1-25
A	US 6 372 515 B1 (CASTERLIN DOUGLAS ET AL) 16 April 2002 (2002-04-16) figures 1-26 column 1, lines 13-17 column 2, lines 8-12,28-41,62,63 column 4, lines 40-42	1-25
A	WO 97/34148 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 18 September 1997 (1997-09-18) figures 3,4 page 7, lines 23-28 page 14, lines 4-7 page 23, line 10 - page 24, line 2 page 25, line 15 - page 27, line 3	1-25
A	WO 94/29696 A (QUIDEL CORP) 22 December 1994 (1994-12-22) figure 3 the whole document	1-25
A	WO 88/03650 A (GENE LABS INC) 19 May 1988 (1988-05-19) figure 2 the whole document	1-25
A	US 2002/110803 A1 (PAL ARINDAM ET AL) 15 August 2002 (2002-08-15) figures 1a,1b,2-5 the whole document	1-25
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007525

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 943 522 A (EISINGER ROBERT W ET AL) 24 July 1990 (1990-07-24) the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/007525

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9731268	A	28-08-1997	AU 2050297 A 10-09-1997
			WO 9731268 A1 28-08-1997
US 6203757	B1	20-03-2001	NONE
US 2003045001	A1	06-03-2003	NONE
US 2003040021	A1	27-02-2003	US 6436722 B1 20-08-2002
			AU 5335401 A 12-11-2001
			CA 2406724 A1 08-11-2001
			EP 1275001 A2 15-01-2003
			JP 2003532118 T 28-10-2003
			WO 0184153 A2 08-11-2001
US 6372515	B1	16-04-2002	US 5976895 A 02-11-1999
			AU 4329100 A 02-11-2000
			BR 0006069 A 20-03-2001
			CA 2334802 A1 26-10-2000
			DE 20021659 U1 23-08-2001
			EP 1088230 A1 04-04-2001
			GB 2354320 A 21-03-2001
			HU 0102458 A2 28-11-2001
			NO 20006492 A 21-02-2001
			TW 466345 B 01-12-2001
			WO 0063697 A1 26-10-2000
			US 6403383 B1 11-06-2002
			US 2002137231 A1 26-09-2002
			US 2003232451 A1 18-12-2003
			US 2001012637 A1 09-08-2001
			US 2002031845 A1 14-03-2002
			AT 408696 B 25-02-2002
			AT 900197 A 15-06-2001
			AU 715966 B2 10-02-2000
			AU 2195397 A 01-10-1997
			BR 9702113 A 28-12-1999
			CA 2181775 A1 12-09-1997
			CA 2219529 A1 18-09-1997
			CN 1181695 A 13-05-1998
			DE 19780221 T0 23-04-1998
			DE 29724307 U1 28-09-2000
			EP 0830082 A1 25-03-1998
			ES 2210508 T3 01-07-2004
			GB 2314625 A , B 07-01-1998
			GB 2339616 A , B 02-02-2000
			JP 11506213 T 02-06-1999
			OA 10630 A 24-04-2001
PL 323189 A1 16-03-1998			
WO 9733519 A1 18-09-1997			
WO 9734148	A	18-09-1997	AT 234467 T 15-03-2003
			AU 730911 B2 22-03-2001
			AU 1936697 A 01-10-1997
			CA 2248709 A1 18-09-1997
			DE 69719737 D1 17-04-2003
			DE 69719737 T2 05-02-2004
			EP 0888547 A1 07-01-1999
			WO 9734148 A1 18-09-1997
			JP 2000506610 T 30-05-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/007525

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429696	A	22-12-1994	EP 0705426 A1	10-04-1996
			JP 8511621 T	03-12-1996
			WO 9429696 A1	22-12-1994
WO 8803650	A	19-05-1988	AU 8328287 A	01-06-1988
			DK 388088 A	12-06-1988
			EP 0287655 A1	26-10-1988
			JP 1501819 T	22-06-1989
			WO 8803650 A1	19-05-1988
US 2002110803	A1	15-08-2002	NONE	
US 4943522	A	24-07-1990	AT 117436 T	15-02-1995
			CA 1313616 C	16-02-1993
			DE 3852786 D1	02-03-1995
			DE 3852786 T2	17-08-1995
			EP 0296724 A2	28-12-1988
			ES 2069545 T3	16-05-1995
			JP 1059069 A	06-03-1989

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/007525

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/558 G01N33/80		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97/31268 A (UNIVERSAL HEALTHWATCH INC ; BERNSTEIN DAVID (US)) 28. August 1997 (1997-08-28) Seite 5, Zeile 17 - Zeile 25 Seite 5, Zeile 33 - Seite 6, Zeile 33 Seite 8, Zeile 14 - Seite 9, Zeile 19 Seite 12, Zeile 6 - Zeile 20 Seite 13, Zeile 34 - Seite 14, Zeile 27 Seite 17, Zeile 15 - Zeile 25 Seite 21, Zeilen 1-16 Seite 23, Zeile 23 - Seite 24, Zeile 2 Ansprüche 1,2,18 Abbildungen 2,3 ----- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
3. November 2004		17/11/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Angioni, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007525

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 203 757 B1 (CHAN LIANG ET AL) 20. März 2001 (2001-03-20) Abbildungen 2-7 Spalte 1, Zeilen 5-12 Spalte 3, Zeilen 47-58 Spalte 4, Zeilen 2-4 Spalte 6, Zeilen 47-60 Anspruch 1	1-25
X	US 2003/045001 A1 (BUCHANAN IAN ET AL) 6. März 2003 (2003-03-06) Abbildungen 1-4 Seite 1, Absatz 2 Seite 2, Absätze 11-13,18 Seite 3, Absatz 21-25 Seite 4, Absätze 32-34,40-42 Seite 8, Absatz 67	1-25
X	US 2003/040021 A1 (CLARK SCOTT M ET AL) 27. Februar 2003 (2003-02-27) Abbildungen 1,4-6,9 Seite 1, Absätze 2,8 Seite 4, Absatz 79 Seite 5, Absatz 91-115 - Seite 7	1-25
A	US 6 372 515 B1 (CASTERLIN DOUGLAS ET AL) 16. April 2002 (2002-04-16) Abbildungen 1-26 Spalte 1, Zeilen 13-17 Spalte 2, Zeilen 8-12,28-41,62,63 Spalte 4, Zeilen 40-42	1-25
A	WO 97/34148 A (SPECTRAL DIAGNOSTICS INC) 18. September 1997 (1997-09-18) Abbildungen 3,4 Seite 7, Zeilen 23-28 Seite 14, Zeilen 4-7 Seite 23, Zeile 10 - Seite 24, Zeile 2 Seite 25, Zeile 15 - Seite 27, Zeile 3	1-25
A	WO 94/29696 A (QUIDEL CORP) 22. Dezember 1994 (1994-12-22) Abbildung 3 das ganze Dokument	1-25
A	WO 88/03650 A (GENE LABS INC) 19. Mai 1988 (1988-05-19) Abbildung 2 das ganze Dokument	1-25
A	US 2002/110803 A1 (PAL ARINDAM ET AL) 15. August 2002 (2002-08-15) Abbildungen 1a,1b,2-5 das ganze Dokument	1-25

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/007525

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	US 4 943 522 A (EISINGER ROBERT W ET AL) 24. Juli 1990 (1990-07-24) das ganze Dokument -----	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9731268	A	28-08-1997	AU 2050297 A WO 9731268 A1	10-09-1997 28-08-1997
US 6203757	B1	20-03-2001	KEINE	
US 2003045001	A1	06-03-2003	KEINE	
US 2003040021	A1	27-02-2003	US 6436722 B1 AU 5335401 A CA 2406724 A1 EP 1275001 A2 JP 2003532118 T WO 0184153 A2	20-08-2002 12-11-2001 08-11-2001 15-01-2003 28-10-2003 08-11-2001
US 6372515	B1	16-04-2002	US 5976895 A AU 4329100 A BR 0006069 A CA 2334802 A1 DE 20021659 U1 EP 1088230 A1 GB 2354320 A HU 0102458 A2 NO 20006492 A TW 466345 B WO 0063697 A1 US 6403383 B1 US 2002137231 A1 US 2003232451 A1 US 2001012637 A1 US 2002031845 A1 AT 408696 B AT 900197 A AU 715966 B2 AU 2195397 A BR 9702113 A CA 2181775 A1 CA 2219529 A1 CN 1181695 A DE 19780221 T0 DE 29724307 U1 EP 0830082 A1 ES 2210508 T3 GB 2314625 A ,B GB 2339616 A ,B JP 11506213 T OA 10630 A PL 323189 A1 WO 9733519 A1	02-11-1999 02-11-2000 20-03-2001 26-10-2000 23-08-2001 04-04-2001 21-03-2001 28-11-2001 21-02-2001 01-12-2001 26-10-2000 11-06-2002 26-09-2002 18-12-2003 09-08-2001 14-03-2002 25-02-2002 15-06-2001 10-02-2000 01-10-1997 28-12-1999 12-09-1997 18-09-1997 13-05-1998 23-04-1998 28-09-2000 25-03-1998 01-07-2004 07-01-1998 02-02-2000 02-06-1999 24-04-2001 16-03-1998 18-09-1997
WO 9734148	A	18-09-1997	AT 234467 T AU 730911 B2 AU 1936697 A CA 2248709 A1 DE 69719737 D1 DE 69719737 T2 EP 0888547 A1 WO 9734148 A1 JP 2000506610 T	15-03-2003 22-03-2001 01-10-1997 18-09-1997 17-04-2003 05-02-2004 07-01-1999 18-09-1997 30-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429696 A	22-12-1994	EP 0705426 A1	10-04-1996
		JP 8511621 T	03-12-1996
		WO 9429696 A1	22-12-1994
WO 8803650 A	19-05-1988	AU 8328287 A	01-06-1988
		DK 388088 A	12-06-1988
		EP 0287655 A1	26-10-1988
		JP 1501819 T	22-06-1989
		WO 8803650 A1	19-05-1988
US 2002110803 A1	15-08-2002	KEINE	
US 4943522 A	24-07-1990	AT 117436 T	15-02-1995
		CA 1313616 C	16-02-1993
		DE 3852786 D1	02-03-1995
		DE 3852786 T2	17-08-1995
		EP 0296724 A2	28-12-1988
		ES 2069545 T3	16-05-1995
		JP 1059069 A	06-03-1989