



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

645 670

②① Gesuchsnummer: 1502/82

⑥② Teilgesuch von: 11927/77

②② Anmeldungsdatum: 29.09.1977

③① Priorität(en): 02.10.1976 DE 2644622

②④ Patent erteilt: 15.10.1984

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.10.1984

⑦③ Inhaber:
Behringwerke Aktiengesellschaft, Marburg/Lahn
(DE)

⑦② Erfinder:
Blobel, Hans-Georg, Prof. Dr., Leihgestern (DE)
Schaeg, Werner, Dr., Giessen (DE)
Brückler, Jörg, Dr., Heuchelheim (DE)

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte, Schaad, Balass, Sandmeier, Alder,
Zürich

⑤④ **Diagnostisches Mittel.**

⑤⑦ Ein diagnostisches Mittel zum Nachweis von Fibrinogen und/oder Fibrinspaltprodukten enthält als wesentlichen Bestandteil eine Suspension eines Clumping-Faktor positiven Mikroorganismus, der weder lösliche Koagulase enthält noch Spontan-Agglutination zeigt. Die Suspension enthält 3 bis 50 % mindestens eines darin löslichen mehrwertigen Alkohols.

PATENTANSPRÜCHE

1. Diagnostisches Mittel zum Nachweis von Fibrinogen und/oder Fibrinospaltprodukten, dadurch gekennzeichnet, dass es als wesentlichen Bestandteil eine Suspension eines Clumping-Faktor positiven Mikroorganismus enthält, der weder lösliche Koagulase enthält noch Spontan-Agglutination zeigt, wobei die Suspension 3 bis 50% mindestens eines darin löslichen mehrwertigen Alkohols enthält.

2. Diagnostisches Mittel nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus ein Staphylococcus ist.

3. Diagnostisches Mittel nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus Staphylococcus aureus K 807, ATCC 31 243 ist.

4. Diagnostisches Mittel nach einem der Patentansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus mit einem Farbstoff, vorzugsweise Basic Red 23 gemäss Colour Index, eingefärbt ist.

Die Erfindung betrifft ein diagnostisches Mittel zum Nachweis von Fibrinogen und/oder Fibrinospaltprodukten.

Mikroorganismen enthalten bekanntlich eine Vielzahl von Substanzen, die zu unterschiedlichen Reaktionen Anlass geben können. Wegen der häufigen Überschneidung derartiger Reaktionen sind Einzelabläufe selten beobachtbar. Es besteht oft der Wunsch, differenzierte, durch Einzelbezirke bedingte Reaktionen zu beobachten, wozu unerwünschte Bestandteile entfernt werden müssen.

Es ist bekannt, dass eine Reihe von Staphylococcus aureus Stämmen sowohl mit Fibrinogen als auch mit den Abbauprodukten des Fibrins unter Verklumpung zu reagieren vermögen. Der für die Reaktion verantwortliche Faktor ist als Clumping-Faktor (CF) bekannt. Die Clumping-Faktor-Reaktion hat wegen der Einfachheit ihrer Durchführung zur Diagnose der erhöhten Fibrinolyse praktische Bedeutung erlangt. Zur Durchführung der Clumping-Faktor-Reaktion hat man bisher nur ausgewählte CF-positive Staphylokokken verwendet. Insbesondere ist es nicht erwünscht, dass die betreffenden Staphylokokken neben CF auch lösliche Koagulase bilden. Eine Reihe von Staphylococcus aureus Stämmen zeigt zudem die unerwünschte Eigenschaft einer Spontan-Agglutination, für die bestimmte, nicht charakterisierte Proteine verantwortlich gemacht werden.

Es besteht demnach ein Bedarf an Clumping-Faktor enthaltenden Staphylokokken, die weder lösliche Koagulase enthalten noch Spontan-Agglutination zeigen.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein diagnostisches Mittel zum Nachweis von Fibrinogen und/oder Fibrinospaltprodukten das dadurch gekennzeichnet ist, dass es als wesentlichen Bestandteil eine Suspension eines Clumping-Faktor positiven Mikroorganismus enthält, der weder lösliche Koagulase enthält noch Spontan-Agglutination zeigt, wobei die Suspension 3 bis 50% mindestens eines darin löslichen mehrwertigen Alkohols enthält.

Dieses Mittel kann hergestellt werden, indem man den Mikroorganismus, vorzugsweise einen Clumping-Faktor positiven Staphylococcus, insbesondere einen Staphylococcus aureus, mit einer 4- bis 8-molaren, vorzugsweise 6-molaren, wässrigen Lösung eines Guanidinsalzes behandelt, danach von diesem freiwäscht und die erforderliche Alkoholmenge zugibt. Gegebenenfalls kann danach lyophilisiert werden.

Zum Einsatz als CF-Reagens werden die Staphylokokken zweckmässig in einer Pufferlösung, die gewünschtenfalls einen Suspensionsstabilisator enthält, suspendiert. Als Pufferlösungen können hierfür die bei biochemischen Arbeiten üblichen Puffersysteme verwendet werden, beispielsweise Tris-

hydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid, Imidazol-Kochsalzpuffer oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung. Sofern Suspensions-Stabilisatoren erwünscht sind, werden zweckmässig Proteine vom Albuminoidtyp, beispielsweise Serumalbumin, bevorzugt Rinder-Serumalbumin, verwendet. Deren Konzentration liegt im allgemeinen bei etwa 0,005 bis 0,1, vorzugsweise 0,01%, Rinderserumalbumin.

Die Keimkonzentration der Staphylokokken in der betreffenden Pufferlösung, die vorteilhaft auf einen pH-Wert um den Neutralpunkt eingestellt wird, beispielsweise auf einen pH-Wert zwischen 7,0 und 7,5, beträgt im allgemeinen etwa 0,1 bis 10%. Besonders vorteilhaft ist eine Konzentration von um 0,15 bis 0,3%.

Die Bestimmung wird zweckmässig im Titrierverfahren vorgenommen. Günstig ist hierbei ein Mikro-Titrierverfahren, bei dem jeweils zu etwa 20 µl der gepufferten Keimsuspension von etwa 0,15 bis 0,3% etwa 50 µl einer fortlaufenden Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Lösung, beispielsweise Blutplasma oder Blutserum, insbesondere Humanplasma oder Humanserum, zugesetzt werden.

Überraschenderweise wurde bei der nachfolgenden Inkubation des Gemisches gefunden, dass die Empfindlichkeit hinsichtlich der Nachweismöglichkeit von Fibrin-Spaltprodukten wesentlich erhöht werden kann, wenn die Reaktionsgemische intensiv geschüttelt werden.

Eine zeitliche Begrenzung der Schütteldauer bis zur Ableitung des Endpunktes der Reaktion hat sich als vorteilhaft erwiesen. Beim Mikro-Titrierverfahren werden dabei im allgemeinen etwa 3 bis 10 Minuten eingehalten.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung wurde gefunden, dass die Verklumpungsreaktion der Mikroorganismen besonders deutlich ablesbar wird, wenn die Mikroorganismen, insbesondere die Staphylokokken, mit einem geeigneten Farbstoff eingefärbt werden. Geeignete Farbstoffe im Sinne der Erfindung sind im allgemeinen solche, die eine ausreichende Affinität zu Proteinen zeigen, direkt aufziehen, Oxydations- und Alkalibeständigkeit besitzen und infolge Fehlens reaktiver Gruppen nicht zur Agglutination der Mikroorganismen beitragen. Besonders günstig hat es sich erwiesen, die Mikroorganismen mit Farbstoffen der Colour Index Bezeichnung (CI) Basic Red 23, Basic Blue 45 oder Basic Orange 30 einzufärben.

Zur Färbung können die extrahierten Mikroorganismen in einer wässrigen Lösung suspendiert, mit einer verdünnten Lösung des betreffenden Farbstoffes versetzt und nach einer experimentell als günstig ermittelten Einwirkdauer von der Farbstofflösung getrennt werden. Zweckmässig werden die Keime zur Abtrennung der Farbstofflösung hochtourig zentrifugiert, beispielsweise bei etwa 10 000 bis 20 000 × g. In einem der oben beschriebenen Puffer suspendiert und mit einem Suspensions-Stabilisator versetzt, sind die gefärbten Mikroorganismen besonders geeignete Reagenzien-Bestandteile für den Nachweis von Fibrin-Spaltprodukten. Gewünschtenfalls können die gefärbten Mikroorganismen in gefriergetrockneter Form aufbewahrt und unmittelbar vor dem Gebrauch resuspendiert werden.

Die Einfärbung der Mikroorganismen führt zu besonders günstiger Ablesung der Reaktion, da die gefärbten Partikel zur Erhöhung des Kontrastes gegenüber der Umgebung bedeutend beitragen. Vorteilhaft wirkt sich weiterhin die Möglichkeit aus, die Konzentration der Mikroorganismen im Testsystem herabsetzen zu können. Die Empfindlichkeit kann gesteigert werden, die Endpunkte der Reaktion werden schärfer.

Clumping-Faktor-positive Mikroorganismen sind aus der Literatur bekannt. Durch Hitze inaktivierte Clumping-Faktor-positive Mikroorganismen können zur Bestimmung von Fibrin-Spaltprodukten verwendet werden. All diese literatur-

bekannten Stämme von Mikroorganismen sind für bestimmungsgemäße Verwendung geeignet. Es können aus ihnen Reagenzien mit verminderter Störanfälligkeit hergestellt werden. Besonders günstige Ergebnisse hinsichtlich der Empfindlichkeit und einer geringen Störanfälligkeit des Verfahrens zum Nachweis von Fibrinogen und/oder Fibrin-Spaltprodukten liefert eine *Staphylococcus aureus* mit der Bezeichnung K 807 (ATCC-Nr. 31 243), dessen Charakteristika in folgender Weise beschrieben werden:

Der Stamm wurde von einer an Mastitis erkrankten Kuh isoliert. Der Stamm K 807 wurde am 19. August 1976 bei ATCC deponiert unter der Bezeichnung ATCC 31 243. In flüssigem Nährmedium wächst er diffus. Er ist gram-positiv. Weitere charakteristische Eigenschaften:

Kristallviolett: Typ A

Clumping Faktor	+
Koagulase	+
Protein A	+
Panton Valentine Leukozidin (PVL)	—
PVL R (Rind)	+
Hämolysine α	+
Hämolysine β	+
Hämolysine δ	—
Saure Phosphatase	+
Alkalische Phosphatase	—
Fibrinolytin	+
Eigelfaktor	—
Penicillinase	—
Nuclease	+

Wachstum auf festen Medien:

Staphylococcus Medium 110 (Baltimore Biological Lab.): gutes Wachstum, weisslich-graue Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm.

Pferdeblutagar: gutes Wachstum, weisslich-graue Kolonien, kaum hämolytisch.

Nähr-Agar: weisslich-graue Kolonien, zuweilen unregelmässig ausgebildet.

Mac Concey-Agar Nr. 3 (Oxoid): kein Wachstum.

Antibiogramm:

Chloramphenicol	empfindlich
Erythromycin	empfindlich
Sulphafurazol	resistent
Methicillin	empfindlich
Penicillin	empfindlich
Ampicillin	empfindlich
Streptomycin	empfindlich
Tetracyclin	empfindlich

Der Stamm *Staphylococcus aureus* K 807 zeigt folgende Stoffwechselleistungen:

Vergärung von:

Dextrose	nach 6 Tagen	bei 37 °C	++
Lactose	nach 6 Tagen	bei 37 °C	++
Saccharose	nach 6 Tagen	bei 37 °C	++
Maltose	nach 6 Tagen	bei 37 °C	++
Mannit	nach 6 Tagen	bei 37 °C	++
Salizin	nach 13 Tagen	bei 37 °C	—
Inulin	nach 13 Tagen	bei 37 °C	—
Aeskulin	nach 13 Tagen	bei 37 °C	—

Wachstum in Gegenwart von NaCl:

4%	+
5%	+
6%	+
7%	+
8%	+

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemässen diagnostischen Mittels enthält als wesentlichen Bestandteil eine 0,1- bis 10%ige Suspension homogen verteilter, extrahierter Clumping-Faktor-positiver Mikroorganismen, vorzugsweise eines Clumping-Faktor-positiven *Staphylococcus aureus*, insbesondere des *Staphylococcus aureus* K 807 (ATCC-Nr. 31 243), der gegebenenfalls mit einem geeigneten Farbstoff eingefärbt ist.

Das erfindungsgemässe diagnostische Mittel kann für die Bestimmung von Fibrinogen und/oder Fibrin-Spaltprodukten in Körperflüssigkeiten, vorzugsweise in Plasma oder Serum, nach bekannten Verfahren eingesetzt werden. Nach Inkubation je eines Anteils der Reagenziensuspension mit je einem Anteil der zu bestimmenden Lösung in steigender Verdünnung werden die Ansätze vorteilhaft wenige Minuten geschüttelt und diejenige höchste Verdünnung der Körperflüssigkeit registriert, die noch eine positive Verklumpung der Keime aufweist. Wird dieser Wert mit einem durch Verdünnung von Serum gesunder Person erhaltenen Wert in Beziehung gesetzt, kann danach das Resultat als Abweichung vom Normalwert festgestellt werden.

Die Erfindung soll am nachstehenden Beispiel näher erläutert werden.

Beispiel

Staphylococcus aureus K 807 (ATCC-Nr. 31 243) wird in einem Medium folgender Zusammensetzung vermehrt:

Vorkultur: TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid) 100 ml in 1000 ml Erlenmeyer-Kolben

Hauptkultur: 14 l TSB in 16-l-Fermenter unter Zusatz von 0,25% Liebig Fleischextrakt (B.B.L.B.); Beimpfung mit 6 Vorkulturkanolben.

Die Keime werden nach Zentrifugation bei $74\,000 \times g$ gewonnen, danach zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Aus einem 16 l Fermenter werden ca. 50 g *Staphylokokken* erhalten. Die Bakterien aus einem Fermenter werden mit 200 ml 6 M Guanidinhydrochloridlösung 18 Stunden stehengelassen. Danach werden die Keime von der Guanidinhydrochloridlösung abgetrennt und die Behandlung mit Guanidinhydrochlorid insgesamt viermal wiederholt. Schliesslich werden die *Staphylokokken* so lange gewaschen oder dialysiert, bis mit alkalischer 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure und Hydroxylamin nach Sullivan und Hess (1936) in Hoppe Seyler Thierfelder, Physiologie und Pathol. Chemische Analyse, 10. Auflage, Band III, 2, S. 1091., Guanidinhydrochlorid nur noch in Spuren nachweisbar ist. Nach Resuspension der *Staphylokokken* in destilliertem Wasser werden die Keime lyophilisiert.

Zur Färbung werden die lyophilisierten, extrahierten Keime in einer Konzentration von 1,5 mg/ml in 0,14 M NaCl suspendiert und pro ml mit 0,3 ml einer 0,1%igen Lösung von Astrazonrot BBL® (eingetragenes Warenzeichen der Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen) = CI Basic Red 23, in 0,14 M Kochsalzlösung versetzt und 5 Minuten gerührt. Danach werden die *Staphylokokken* bei $14\,600 \times g$ abzentrifugiert und die Keime in dem ursprünglichen Volumen 0,14 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 6,4 suspendiert. Der Puffer enthält 0,05% Rinderserumalbumin.

Für die Clumping-Faktor Reaktion im Röhrchentest werden die *Staphylokokken* in einer 1%igen Suspension, beispielsweise in 0,05 M Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Puffer

fer pH 7,4, mit einem Zusatz von 0,01% Rinderserumalbumin eingesetzt.

Im Mikrotitrationsverfahren nach Leavelle: (Amer. J. Clin. Path., Vol. 55 (1971) S. 452–457) werden die Staphylokokken in 0,3%iger Suspension in 0,017 M Imidazol-NaCl-

Puffer pH 7,4 eingesetzt. Für die Mischung des Reaktionsansatzes hat sich besonders vorteilhaft ein Plattenschüttler (Mikro-Shaker AM 69 der Flow Laboratories, Bonn) erwiesen.