



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 Q 1/06
C 12 M 1/34

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

641 493

⑳ Gesuchsnummer:	3772/79	㉗ Inhaber:	President and Fellows of Harvard College, Cambridge/MA (US)
㉑ Anmeldungsdatum:	20.04.1979		
㉓ Priorität(en):	20.04.1978 US 898291	㉘ Erfinder:	Gary C. du Moulin, Newton/MA (US) Susan E. Lynch, Boston/MA (US) John Hedley-Whyte, Brookline/MA (US)
㉔ Patent erteilt:	29.02.1984		
㉕ Patentschrift veröffentlicht:	29.02.1984	㉙ Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur Bestimmung von gram-negativen Bakterien.**

⑤⑦ Es wird ein Verfahren sowie eine Arbeitsausrüstung zur Bestimmung von gram-negativen Bakterien in biologischen Flüssigkeiten beschrieben. Die Bestimmung erfolgt, indem man Zellen in einer Flüssigkeit bei einem pH-Wert von 6 bis 8 lysiert und sodann die Zellinhaltsstoffe entfernt, die Mikroorganismen aus der flüssigen Phase bei 5000 G oder mehr sedimentiert, die Mikroorganismen in einem amöbocytischen Lysat von *Limulus polyphemus* in einem wässrigen Medium inkubiert und sodann das Ausmass der so erhaltenen Trübung bestimmt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von gram-negativen Bakterien, welche in biologischen Flüssigkeiten enthalten sind, dadurch gekennzeichnet, dass man die Zellen, die in den Flüssigkeit enthalten sind, bei einem pH-Wert von 6 bis 8 aufbricht, die Inhaltsstoffe der Zellen und der die Mikroorganismen enthaltenden flüssigen Phase abtrennt, die Mikroorganismen von der flüssigen Phase abtrennt und sie wäscht, um Pyrogene davon zu entfernen, und dass man die genannten Mikroorganismen mit einem amöbocytischen Lysat von *Limulus polyphemus* behandelt und das Ausmass der Trübung misst, welches während der genannten Behandlung entsteht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen von der flüssigen Phase abgetrennt werden, indem man die flüssige Phase einer Zentrifugalkraft von mindestens 5000 G unterwirft, um die Mikroorganismen von der genannten flüssigen Phase durch Sedimentation abzutrennen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Zellaufbrechung der biologischen Flüssigkeit durch Zumischung eines oberflächenaktiven Mittels zu der Flüssigkeit erfolgt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellinhaltsstoffe durch Filtration durch ein pyrogenfreies Filter abgetrennt werden, und dass die Sedimentation der Mikroorganismen durch Zentrifugation bei 5000 bis 12.000 G ausgeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Flüssigkeit Blut ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Zellaufbrechung in der biologischen Flüssigkeit unter Zumischung eines oberflächenaktiven Mittels zu der Flüssigkeit erfolgt, die Zellinhaltsstoffe durch Filtration durch ein pyrogenfreies Filter abgetrennt werden, und dass die Abtrennung der Mikroorganismen durch Zentrifugation bei 5000 bis 12.000 G ausgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellinhaltsstoffe durch Filtration durch ein pyrogenfreies Filter abgetrennt werden, und dass die Abtrennung der Mikroorganismen durch Zentrifugation bei 5000 bis 12.000 G ausgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenaktive Mittel nichtionisch ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das oberflächenaktive Mittel nichtionisch ist.

10. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Behälter mit zellauflösender, oberflächenaktiver Substanz, einen Behälter mit amöbocytischem Lysat von *Limulus polyphemus* und eines oder mehrere Verdünnungsmittel umfasst, welche bekannte Mengen gram-negativer Bakterien enthalten.

Die vorliegende Erfindung wurde im Rahmen einer Arbeit gemacht, die vom Departement für Gesundheit, Erziehung und Wohlfahrt finanziert wurde.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung von gram-negativen Bakterien in biologischen Flüssigkeiten und auf eine Arbeitsmaterialzusammenstellung für die Ausführung einer derartigen Bestimmung.

Bisher ist es vorgeschlagen worden, die Gelierung des Lysates von Amöbocyten von *Limulus polyphemus* als Test für die Anwesenheit von bakteriellen Endotoxinen in biologischen Flüssigkeiten zu verwenden, aber nähere Untersu-

chungen haben gezeigt, dass verschiedene pyrogene Verbindungen, die von diesen Endotoxinen verschieden sind, positive Testresultate ergeben, wie dies von «Elin et al., im J. of Infectious Diseases, Vol. 128, 349-352 (1973)» berichtet wird. Andere Untersuchungen zeigten, dass der LAL-Test für Endotoxin in Blutproben in vielen Fällen nicht mit Blutkulturen übereinstimmt, welche die Gegenwart einer Vielzahl von gram-negativen Bakterien zeigen. Siehe dazu «Martinez-G et al., im J. of Infectious Diseases, Vol. 127, 102-105 (1973)». Aus diesen Gründen ist der LAL-Test nicht wirksam für die Bestimmung von biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, obwohl quantitative Bestimmungen von Biomassen von gram-negativen Bakterien in Meerwasser von «Watson et al [Applied and Environmental Microbiol., Vol. 33, 940-946 (1977)]» durchgeführt wurden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Abtrennung der gram-negativen Bakterien in der biologischen Flüssigkeit von extrazellulären Pyrogenquellen wie auch von freien Endotoxinen, wodurch es ermöglicht wird, dass die Menge von Lipopolysaccharid, welche durch die Inkubation der gram-negativen Bakterien mit amöbocytischem Lysat von *Limulus polyphemus* gebildet wird, als quantitatives Mass für die Menge der in der Probenflüssigkeit anwesenden Bakterien verwendet werden kann. Das erfindungsgemässe Verfahren ist insbesondere nützlich für die Bestimmung von gram-negativen Bakterien im Blut, aber das erfindungsgemässe Verfahren ist ebenso auf andere biologische Flüssigkeiten anwendbar, wie z.B. auf cerebro-spinale Flüssigkeiten (Rückenmarks- und Gehirnflüssigkeiten), Urin, Säuren der freien Bauchhöhle (Ascites) und ähnliche anwendbar.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Bestimmung von gram-negativen Bakteriengehalten in biologischen Flüssigkeiten zur Verfügung, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die in der Flüssigkeit vorhandenen Zellen bei einem pH-Wert von 6 bis 8 aufgebrochen werden, man die Zellinhaltsstoffe von der Mikroorganismen enthaltenden flüssigen Phase abtrennt, die Mikroorganismen aus der flüssigen Phase abtrennt, und zwar vorzugsweise, indem man die flüssige Phase einer Zentrifugalkraft von mindestens 5000 G unterwirft, um die Mikroorganismen aus der genannten Flüssigkeit durch Sedimentation abzutrennen, die sedimentierten Mikroorganismen wäscht, um die Pyrogene davon zu entfernen, und sodann die sedimentierten Mikroorganismen mit einem amöbocytischen Lysat von *Limulus polyphemus* behandelt, und das Ausmass der Trübung oder die Menge des unlöslichen Niederschlages, welcher sich während der Inkubation bildet, bestimmt. Eine Arbeitsausrüstung für die Ausführung einer derartigen Bestimmung enthält als wesentliche Komponenten ein Zellauflösungsmittel, ein amöbocytisches Lysat von *Limulus polyphemus*, mindestens einen Standard, der eine bekannte Menge von gram-negativen Bakterien oder einen Endotoxin enthält.

Der erste Schritt des erfindungsgemässen Verfahrens, nämlich die Auflösung der Zellen, die in der biologischen Flüssigkeit anwesend sind, wird ausgeführt, indem man die Flüssigkeitsprobe mit einer wässrigen Lösung eines oberflächenaktiven Mittels bei einem pH-Wert von 6 bis 8 mischt und sie bei Zimmertemperatur stehen lässt. Innerhalb weniger Minuten wird ein sternklares Lysat erhalten. Das oberflächenaktive Mittel, das angewandt wird, ist vorzugsweise ein nichtionisches Mittel, wie z.B. Kondensate von Äthylenoxid mit hydrophoben Basen, die gebildet werden, indem man Propylenoxid kondensiert; oder Alkylphenoxypolyäthoxylyat wie z.B. Octylphenoxypolyäthoxyäthanol, iso-Octylphenoxypolyäthoxyäthanol, Decylphenoxypolyäthoxyäthanol und ähnliche. Insbesondere bevorzugt ist Octylphenoxypolyäthoxy-(9-10)-äthanol, das unter dem Han-

delsnamen Triton X-100 vertrieben wird. Die Konzentration des oberflächenaktiven Mittels kann in einem weiteren Bereich variieren, und zwar im Bereich von 0,1 bis 10 Gew.-% bezogen auf die biologische Flüssigkeit und vorzugsweise im Bereich von 0,5 bis 1,5 Gew.-%. Das oberflächenaktive Mittel wird vorzugsweise zuerst in Wasser (pyrogenfrei) gelöst, um eine Lösung zu erhalten, welche 0,01 bis 1 Gew.-% oberflächenaktiven Mittels enthält, und die biologische Flüssigkeit wird mit der wässrigen Lösung in geeigneten Anteilen vermischt, wodurch man das erwünschte Verhältnis des oberflächenaktiven Mittels zur biologischen Flüssigkeit erhält. Die Lösung des oberflächenaktiven Mittels enthält vorzugsweise ebenso einen Puffer, wie z.B. Natriumcarbonat-Natriumbicarbonat in 0,01 molarer Konzentration, wodurch man den pH-Wert der Lösung und der Mischung der Lösung mit der biologischen Flüssigkeit in einen pH-Bereich von 6 bis 8 erhält.

Nach Auflösung der Zellen, wie oben beschrieben, werden die relativ groben Zellinhaltsstoffe von der flüssigen Phase zur Filtration abgetrennt. Das verwendete Filter muss pyrogenfrei sein und eine Porengrösse aufweisen, die ausreichend gross (d.h. 5 bis 60 Mikrometer, und vorzugsweise 40 bis 60 Mikrometer) ist, so dass die Mikroorganismen mit der flüssigen Phase hindurchtreten, während die Feststoffe mit grösserer Teilchengrösse, nämlich die Zellinhaltsstoffe, zurückgehalten werden.

Die flüssige Phase wird sodann einer Kraft von mindestens 5000 G, und vorzugsweise 5000 bis 12.000 G beispielsweise durch Zentrifugation unterworfen, wodurch man die Sedimentation und Abtrennung der Mikroorganismen von der flüssigen Phase auf einer sammelnden Oberfläche, wie z.B. der Oberfläche eines Glas- oder Kunststoffzentrifugenröhrchens, erreicht. Anschliessend an die Sedimentation wird die überstehende, flüssige Phase entfernt, und zwar vorzugsweise durch Absaugen, und die sedimentierten Mikroorganismen werden mindestens einmal mit pyrogenfreiem Wasser gewaschen, von welchem sie abermals durch Sedimentation abgetrennt werden. Der Niederschlag oder das Pellet der Mikroorganismen wird sodann mit einem amöbocytischen Lysat von *Limulus polyphemus* inkubiert.

Nach Absaugen der überstehenden Flüssigkeit werden die sedimentierten Mikroorganismen vorzugsweise weiter gewaschen, indem man sie in 5 ml pyrogenfreiem Wasser abermals suspendiert und durch ein pyrogenfreies Filter filtriert, welches eine Porengrösse von 0,4 bis 0,6 Mikrometer aufweist, welches die Mikroorganismen zurückhält, während die restlichen kleinen Teilchen des Blutzellengrundgewebes als Abfall hindurchtreten. Das Filter, welches die Mikroorganismen trägt, wird sodann mit einer 3%igen wässrigen Kochsalzlösung (Natriumchlorid) gewaschen, wodurch man eine Suspension der Mikroorganismen erhält.

Die Suspension der Mikroorganismen in der 3%igen wässrigen Kochsalzlösung (oder ein Aliquot der Suspension) wird sodann bei einer konstanten Temperatur zwischen 35 und 45°C während etwa 1 Stunde mit einem amöbocytischen Lysat von *Limulus polyphemus* inkubiert. Ein Leerwert oder ein Vergleichsversuch wird parallel ausgeführt, indem man eine sterile 3%ige wässrige Kochsalzlösung anstelle der biologischen Probenflüssigkeit verwendet. Während der Inkubationszeitspanne entwickelt sich eine Trübung in der Suspension, aufgrund der Bildung eines Niederschlages oder eines Coagulates, und dessen Menge wird mittels der Bestimmung der optischen Dichte mittels üblicher Verfahrensweisen bestimmt, das beispielsweise von «Watson et al., im Applied and Environmental Microbiol., Vol. 33, 940-946 (1977)» umschrieben wird. Eine Reihe von Standardlösungen, welche bekannte Mengen von gram-negativen Bakterien, wie z.B. *Escherichia* (*E. coli*), *Klebsiella* (*K. pneumonia*),

Bacteroides (*B. fragilis*) oder ähnliche, enthalten oder welche bekannte Mengen von Endotoxinen, wie z.B. *E. coli* Endotoxin, enthalten, werden ebenso in getrennten Ansätzen mit amöbocytischen Lysaten von *L. polyphemus* inkubiert. Nach Abzug der Werte der optischen Dichte für den Leerwert von denjenigen Werten der unbekannten Proben wie auch von den Proben der Standardlösungen kann die Menge der gram-negativen Bakterien in den unbekannten Proben leicht aufgrund des Vergleiches der optischen Dichte der unbekannten Proben mit einer Eichkurve, die aufgrund der Resultate, die mit den bekannten Proben erhalten wurden, erstellt wurde, ermittelt werden. Wenn die verwendeten Standards Endotoxine sind, wird ein Korrektionsfaktor angewandt, um die Resultate in Biomasse der gram-negativen Bakterien umzurechnen. Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht eine Empfindlichkeit bis herab zu 20 gram-negativen Bakterien pro Millimeter biologischer Flüssigkeit.

Das erfindungsgemässe Bestimmungsverfahren weist eine besondere Bedeutung auf, nicht nur wegen seiner Empfindlichkeit sondern auch, weil es in einer kurzen Zeitspanne von weniger als 4 Stunden abgeschlossen ist. Das Eindringen von gram-negativen Bakterien in den Blutstrom ist eine schwierige und häufig lebensgefährliche Komplikation bei vielen klinischen Zwischenfällen, wie auch als Vorläufer für postoperative, chirurgische Sepsis. Die Gefährlichkeit des Bakterienbefalls wird weiterhin dadurch erläutert, dass es eine ansteigende Zahl von Patienten, welche Defekte im Immunsystem aufweisen, welche hervorgerufen werden durch eine Behandlung zur Verhinderung der Abstossung von Organtransplantaten und weil Bakteriämie eine hohe Mortalitätsrate bei Patienten aufweist. Im Lichte dieser Tatsache ist die schnelle und genaue Diagnose der Bakteriämie, welche mittels des erfindungsgemässen Bestimmungsverfahrens möglich ist, ein wesentlicher wissenschaftlicher Fortschritt. Anhand des folgenden Beispiels wird eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung näher erläutert.

Beispiel

Ein Aliquot von 4 ml einer venösen Blutprobe, welche in einer heparinisierten Spritze durch Punktur einer Vene nach Desinfektion der Haut gesammelt wurde, wird in eine pyrogenfreie Gasflasche, welche 36 ml lysierende Lösung enthielt, eingefüllt. Diese Lysierungslösung enthält pyrogenfreies Wasser, welches 0,1 Gew.-% Octylphenoxypolyäthoxy-(9-10)-äthanol (Triton X-100) enthält und 0,01 Mol an Natriumcarbonat-Natriumbicarbonat ist, und welche einen pH-Wert von 6 bis 8 aufweist. Nach leichtem Durchmischen der Inhaltsstoffe wird die Flasche bei Zimmertemperatur stehengelassen bis eine vollständige sternklare Zellauflösung beobachtet wird, was innerhalb von etwa 3 bis 5 Minuten auftritt. Eine bekannte sterile Blutprobe wird in identischer Weise behandelt, um als Vergleichsversuch zu dienen. Jede lysierte Probe wird sodann der Vakuumfiltration durch eine 60 ml fassende grobe Allihn-Filterröhre, die eine gefilterte Glasfilteroberfläche von 40 bis 60 Mikrometer Porendurchmesser aufweist, unterworfen.

Das Filtrat aus beiden Proben wird sodann in zwei Aliquote von je 20 ml geteilt, und diese werden in 30 ml fassende pyrogenfreie Zentrifugenröhrchen eingefüllt, welche mit eloxierten Aluminiumdeckeln verschlossen werden und in einem Rotor des Typs T-30 bei einer relativen Zentrifugalschwerkraft von 10.000 G während 15 Minuten in einer Ultrazentrifuge bei Zimmertemperatur zentrifugiert werden. Am Ende der Zentrifugation wurde die überstehende Flüssigkeit durch vorsichtiges Absaugen entfernt, wodurch man einen nahezu undurchsichtigen Niederschlag erhielt, der aus Mikroorganismen und kleinen Blutzellenfragmenten bestand und der sich auf der inneren Oberfläche der Zentrifugen-

röhre befand. Der Niederschlag wurde in 10 ml sterilem, destilliertem, pyrogenfreiem Wasser resuspendiert und nach leichtem Durchmischen unterwarf man ihn abermals der Zentrifugation und man trennte abermals die überstehende Flüssigkeit unter den gleichen Bedingungen ab. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt.

Nach dem zweiten Waschen und Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 1 ml Kochsalzlösung, die 3 Gew.-% Natriumchlorid in pyrogenfreiem Wasser enthielt, suspendiert.

Sodann wurden aliquote Proben von je 1 ml in getrennte Teströhrchen übergeführt. In andere Teströhrchen wurden als Standarde 1 ml verschiedener Verdünnungen von *E. coli* Stammlösung in 3 % wässriger Kochsalzlösung eingefüllt, wodurch man bekannte Konzentrationen erhielt, welche von 0 bis 100 Organismen/ml reichten. Eine Blindprobe wurde hergestellt, indem man 1 ml 3 % Kochsalzlösung in eine andere Teströhre einfüllte.

In jede Teströhre wurden sodann 0,2 ml wiederhergestelltes amöbocytisches Lysat von *Limulus polyphemus* eingefüllt, welches im Handel erhältlich ist. Nach leichtem Durchmischen wurden die Teströhrchen in einem Wasserbad während 60 Minuten bei 40°C inkubiert. Nach der In-

kubation wurden die Teströhrchen abermals leicht geschüttelt und die optische Dichte der Flüssigkeit wurde jeweils in Messküvetten mit kleinem Volumen bei 360 nm bestimmt. Die optische Dichte des Blindwertes wurde von der optischen Dichte jeder unbekannten und auch jeder Standardprobe abgezogen. Es wurde eine Eichkurve aufgrund der optischen Dichten der bekannten Standarde erstellt, so dass durch Interpolation der optischen Dichte der unbekannten Probe in der Standardkurve die Anzahl der Organismen, die in der unbekannten Probe anwesend sind, bestimmt werden kann.

Ähnliche Resultate können erhalten werden, indem man das Bestimmungsverfahren auf andere biologische Flüssigkeiten anwendet.

Eine Arbeitsausrüstung, die für die Ausführung der erfindungsgemässen Bestimmung angewandt werden kann, kann einen Behälter, beispielsweise eine Ampulle, welche das zellauflösende Mittel oder eine wie oben beschriebene Lösung enthält, einen Behälter mit amöbocytischem Lysat von *Limulus* und eine oder mehrere Standardverdünnungen von gram-negativen Bakterien, wie z.B. *E. coli* Endotoxin, umfassen. Alle Vorrichtungen einschliesslich Filtern und Teströhrchen sowie alle bei diesem Test angewandten Wasser und wässrigen Lösungen müssen pyrogenfrei sein.