

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 611/94

(51) Int.Cl.⁶ : **C12Q 1/58**

(22) Anmeldetag: 23. 3.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1998

(45) Ausgabetag: 25. 3.1999

(56) Entgegenhaltungen:

WO 93/19200A1

(73) Patentinhaber:

DEJACO RAINER-MARIA DR.
A-4470 ENNS, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) VERWENDUNG EINER EINRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG VON HELICOBACTER PYLORI

(57) Beschrieben wird die Verwendung einer Einrichtung in einem Verfahren zur Bestimmung von *Helicobacter pylori* in Gewebeproben, wobei die Probe in eine wässrige Harnstofflösung gebracht und durch das entstehende Ammonium eine die Gegenwart der Bakterien anzeigende Reaktion ausgelöst wird. Die Bestimmung erfolgt quantitativ durch Messung des aus der alkalisch gemachten Lösung abgeschiedenen Ammoniakgases mittels einer zur Bestimmung des Ammoniakgehaltes von menschlichem Blut bekannten Einrichtung.

AT 404 840 B

Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung einer Einrichtung, welche das aus einer flüssigen Probe austretende Ammoniakgas quantitativ bestimmt, insbesondere eines Teststreifens, welcher sich je nach der Menge des Gases unterschiedlich verfärbt, zur an sich bekannten Bestimmung von *Helicobacter pylori* mittels Reaktion einer Gewebeprobe mit einer wäßrigen Harnstofflösung.

Entzündliche Erkrankungen und Geschwüre der unteren Speiseröhre, des Magens und des Zwölffingerdarms werden bekanntlich durch das Bakterium *Helicobacter pylori* verursacht. Diese Bakterien enthalten Urease und ihre Gegenwart kann somit durch Zugabe von Harnstoff zu einer aus dem Magen entnommenen Gewebeprobe festgestellt werden. Der Harnstoff wird nämlich durch die Urease gespalten und es entsteht Ammoniak und CO_2 , wodurch ein Rückschluß auf das Vorhandensein der Bakterien möglich ist.

WO-A1-93/19200 zeigt die Verwendung eines Teststreifens, der bei Aufbringen einer Gewebeprobe, welche Urease enthält, durch das entstehende Ammoniakgas verfärbt wird. Die vorveröffentlichte Einrichtung erlaubt lediglich eine Entscheidung darüber, ob *Helicobacter pylori* vorliegt oder nicht.

Durch Versuche wurde festgestellt, daß eine quantitative Bestimmung des Bakteriengehaltes von gastrischem Gewebe wünschenswert wäre, da die Menge der Bakterien in guter Korrelation zu den histologischen Befunden über den Grad der Entzündung des Gewebes steht. Die Erfindung besteht somit zunächst in der Forderung nach quantitativer Feststellung des Bakteriengehaltes des Gewebes.

Dies setzt zunächst voraus, daß die Harnstofflösung im wesentlichen mit der ganzen im Gewebe enthaltenen Urease zur Reaktion kommt. Außerdem muß die nach Alkalisierung der Lösung entstehende Gasmenge für eine quantitative Bestimmung ausreichen. Es ist nun aber bekannt, daß diese Bedingung bei menschlichem Blut erfüllt ist, welches etwa 20 - 100 $\mu\text{g/dl}$ NH_3 enthält.

Zur Analyse des Ammoniumgehaltes des Blutes wurden bereits Teststreifen entwickelt, welche aus einer beidseits beschichteten porösen Trägerfolie bestehen. Auf einer Seite der Trägerfolie befindet sich eine Mischung aus Borsäure und Natronlauge, welche einen aufgetragenen Blutstropfen alkalisch macht, auf der anderen Seite ein Indikator, welcher sich in Abhängigkeit von einem pH-Wert verfärbt. Wie stark sich der pH-Wert verändert, hängt davon ab, wieviel Ammoniak durch die Poren der Trägerfolie dissipiert. Die Verfärbung der beispielsweise aus Bromkresolgrün bestehenden Indikatorschicht kann maschinell gemessen werden, sodaß der Ammoniumgehalt des Blutstropfens unmittelbar abgelesen oder ausgedruckt werden kann.

Erfindungsgemäß ist nunmehr vorgesehen, daß die Masseverhältnisse von Gewebeprobe, Harnstoff und Wasser so gewählt werden, daß die entstehende Ammoniumkonzentration zumindest jener im menschlichen Blut entspricht.

Die bekannten, zur Ammoniumbestimmung des menschlichen Blutes entwickelten Verfahren können damit direkt auf die Untersuchung von gastrischen Gewebeproben angewendet werden.

Die weitere Erläuterung der Erfindung erfolgt anhand eines Ausführungsbeispiels und eines Diagramms

Beispiel:

Mittels einer Pipette wurde jeweils 0,5 ml destilliertes Wasser in ein Reaktionsgefäß gebracht. Eine Harnstofftablette mit einer Dicke von 1 mm und einem Durchmesser von 5 mm wurde in das Reaktionsgefäß eingebracht, dieses verschlossen und durch gutes Schütteln die Tablette aufgelöst.

In die vorbereitete Testlösung wurde ein 1 mm^3 großes Gewebestück eingebracht, welches anlässlich einer Gastroskopie mittels einer Gewebezange (Modell FB-25K der Firma Olympus) entnommen worden war. Die Gewebeprobe wurde in das Testmedium eingeführt, unmittelbar darauf das Reaktionsgefäß wieder verschlossen. Nach dreistündiger Inkubation wurden mit einer Mikropipette 0,002 ml auf einem Teststreifen aufgebracht, wie er zur Feststellung des Ammoniakgehaltes im menschlichen Blut von der Firma Menarini unter der Bezeichnung Menagent Ammonia Test Kit II vertrieben wird. Die entsprechende Verfärbung des Teststreifens wurde automatisch mittels des ebenfalls von der Firma Menarini vertriebenen Gerätes Ammonia Checker II beurteilt, welches nach 180 Sekunden eine Ablesung erlaubt.

Der oben beschriebene Versuch wurde mit Gewebeproben von insgesamt 218 Patienten durchgeführt, wobei sich eine Verteilung der Ammoniakwerte gemäß Diagramm ergab. Das Ergebnis wurde einerseits mit dem histologischen Befund, andererseits mit bekannten Tests (CLO der Firma Delta West und JATROX der Firma Rhöm Pharma), welche nur auf das Vorhandensein oder Fehlen von *Helicobacter pylori* ansprechen, verglichen. Dabei bestätigte sich zunächst die wissenschaftlich bereits erhärtete Tatsache, daß chronisch aktive Gastritis vom Typ B ausschließlich durch *Helicobacter pylori* verursacht wird. Die Ammoniakwerte für Patienten, deren histologischer Befund das Vorliegen einer chronisch aktiven Gastritis vom Typ B ausschloß, lagen durchwegs unter 400 Einheiten der im Diagramm gewählten Skala. Diese Werte entsprechen etwa jenen, wie sie auch bei Aufbringen eines Tropfens Blut auf den verwendeten Teststreifen zu

beobachten sind. Werte über 1000 waren hingegen eindeutig einem positiven histologischen Befund auf chronisch aktive Gastritis vom Typ B zuzuordnen. Dabei ergab sich in sechs Fällen (im Diagramm mit B bezeichnet), in denen ein rein qualitativer negativer Farbumschlagtest im Widerspruch zum histologischen Befund gestanden war, nunmehr eine - wenn auch geringe - Erhöhung der Ammoniakwerte auf etwas über 1000 Einheiten. Andererseits konnte bei einem zunächst im Widerspruch zum bekannten Schnelltest und zum histologischen Befund stehenden Fall festgestellt werden, daß nach 24-stündiger Inkubationszeit der Meßwert deutlich angestiegen war und der zunächst niedrige Wert auf ungenügende Durchmischung der Probe zurückzuführen war (Fall A).

Das neue Verfahren bringt nicht nur ein gegenüber den bisherigen, lediglich das bloße Vorhandensein von *Helicobacter pylori* prüfenden Tests verlässlicheres Ergebnis. Vor allem hat sich gezeigt, daß die histologische Zuordnung der Gewebeproben zu einer geringen, mittelgradigen oder hochgradigen Entzündung erstaunlich gut mit den gemessenen Ammoniakwerten korreliert, wenn man den Bereich einer geringfügigen Entzündung im beiliegenden Diagramm von 1000 - 5000 Einheiten, den der mittelgradigen Entzündung von 5000 - 15000 Einheiten und den der hochgradigen Entzündung oberhalb von 15000 Einheiten ansetzt.

Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens kann nicht nur der Grad und die Aktivität einer Entzündung festgestellt werden, es ist insbesondere auch möglich, nunmehr die Entzündungsaktivitäten der einzelnen Magen- und Darmabschnitte zu vergleichen. Insbesondere läßt sich die Prädominanz der Entzündung in einem oder mehreren der folgenden Abschnitte a - f feststellen:

- a) Antrum-G.
- b) Corpus-G.
- c) Fundus + Cardia-G.
- d) dist. Ösophagus - (Reflux)
- e) Duodenum - (Metaplasie)
- f) Pangastritis

Durch diese Lokalisierung des stärksten Befalles mit *Helicobacter pylori* ist ein differenzierter Therapieeinsatz möglich, des weiteren eine rasche Therapie-Kontrolle ohne weitere histologische Befundung.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Einrichtung, welche das aus einer flüssigen Probe austretende Ammoniakgas quantitativ bestimmt, insbesondere eines Teststreifens, welcher sich je nach der Menge des Gases unterschiedlich verfärbt, zur an sich bekannten Bestimmung von *Helicobacter pylori* mittels Reaktion einer Gewebeprobe mit einer wäßrigen Harnstofflösung, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Masseverhältnisse von Gewebeprobe, Harnstoff und Wasser so gewählt werden, daß die entstehende Ammoniumkonzentration zumindest jener im menschlichen Blut entspricht.

Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

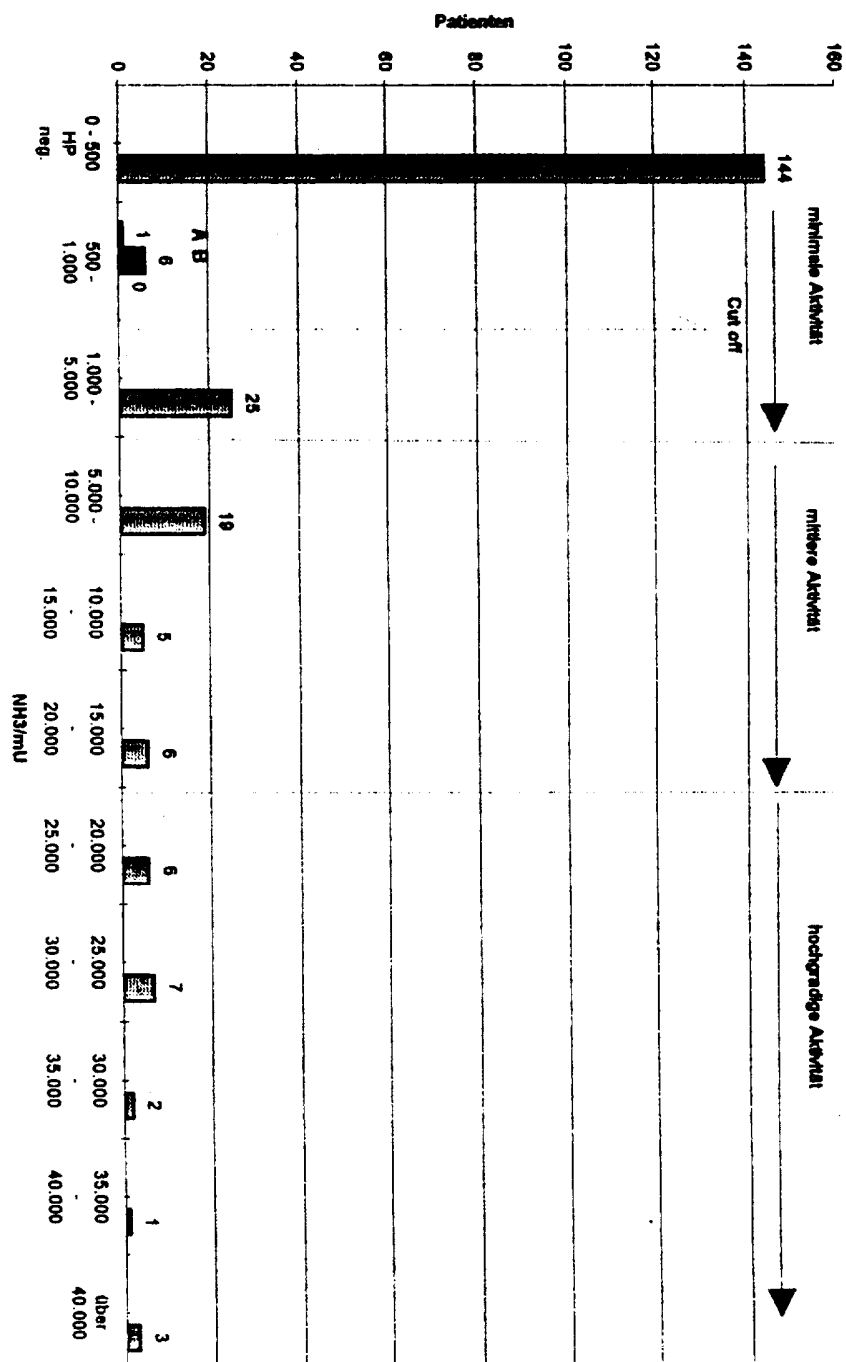


Fig. 1