



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 10 485 T2 2006.11.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 427 843 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 10 485.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB02/03990

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 755 291.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2003/025208

(86) PCT-Anmeldetag: 02.09.2002

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 27.03.2003

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.06.2004

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 05.04.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.11.2006

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0122790 21.09.2001 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(73) Patentinhaber:

The Secretary of State for Defence, Salisbury, GB

(72) Erfinder:

SQUIRRELL, James, David, Salisbury, Wiltshire
SP4 0JQ, GB; LESLIE, Louise, Rachel, Salisbury,
Wiltshire SP4 0JQ, GB; BOWN, J., Kevin,
Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ, GB

(74) Vertreter:

BEETZ & PARTNER Patentanwälte, 80538
München

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES VORHANDENSEINS VON BAKTERIEN, DIE GEGEN
ZELL-LYSIERENDE ANTIBIOTIKA RESISTENT SIND

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins eines oder mehrerer Target-Bakterien, die gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum oder zell-lysierende Antibiotika resistent sind, in einer Probe. Die Erfindung betrifft insbesondere, aber nicht ausschließlich, ein Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins eines oder mehrerer Methicillin-resistenter Bakterien in einer klinischen Probe.

[0002] Das Auftreten von Bakterien mit Resistenz gegen üblicherweise verwendete Antibiotika stellt ein immer vorherrschender werdendes Problem dar, das mit ernsten Auswirkungen für die Behandlung infizierter Individuen verbunden ist. So sind die sogenannten Superbugs, wie etwa *Staphylococcus aureus*, in vielen Fällen gegen sämtliche der stärksten Antibiotika resistent. Das Problem wurde in der Krankenhausumgebung besonders akut, wo eine nosokomiale Infektion von Individuen mit geschwächtem Immunsystem durch antibiotikaresistente Bakterien zu gravierenden Komplikationen und sogar zum Tod führen kann. Dementsprechend besteht ein Bedürfnis nach einer Minimierung des Infektionsrisikos in einer solchen Umgebung. Ein Weg zur Minimierung des Risikos liegt in der frühen Bestimmung des Vorhandenseins solcher Bakterien, um so Individuen und auch eine Umgebung sorgfältig überwachen und erforderlichenfalls in einem frühen Stadium behandeln zu können.

[0003] Die gegenwärtigen Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens von gegen Antibiotika resistenten Bakterien sind allerdings zeitaufwendig und erfordern zunächst eine Kultivierung der Bakterien in reiner Form und dann die Exposition gegenüber einer Reihe von Antibiotika, um festzustellen, ob ihr Wachstum inhibiert wird. Das ganze Verfahren kann mindestens zwei Tage erfordern und zu einer oft kritischen Verzögerung führen, bevor einem infizierten Individuum ein optimales Behandlungsregime verabreicht werden kann. Natürlich sind solche Verzögerungen nicht nur für die Gesundheit von Individuen schädlich, sondern führen auch zu längeren Krankenhausaufenthalten.

[0004] Daher besteht ein Bedürfnis nach einem Verfahren zur schnellen Bestimmung des Vorhandenseins von Bakterien, die gegenüber bestimmten Antibiotika resistent sind, bei einem Patienten oder in einer Umgebung.

[0005] WO 99/37799 offenbart ein schnelles Verfahren zur Bestimmung, ob ein bestimmtes Bakterium, von dem bekannt ist, dass es in einer Kultur vorliegt, gegen ein bestimmtes Antibiotikum empfindlich oder resistent ist. Das Verfahren ist allerdings dahingehend eingeschränkt, dass es vorzugsweise erfordert,

dass das Bakterium als Reinkultur oder als reines Isolat vorliegt. Das Verfahren kann allerdings zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz oder der Antibiotikaempfindlichkeit eines bestimmten Bakteriums in einer gemischten Kultur angepasst werden. In diesem Fall beruht das Verfahren allgemein auf einem vorgeschalteten Trennschritt vor der Behandlung mit dem speziellen Antibiotikum oder der Durchführung einer anderen, für das bestimmte Bakterium spezifischen Maßnahme.

[0006] Alternativ, und unter der Voraussetzung, dass die Wirkungsweise des Antibiotikums bekannt ist, kann das Verfahren die Antibiotikumsresistenz oder Antibiotikumsempfindlichkeit eines bestimmten Bakteriums, von dem bekannt ist, dass es in einer gemischten Kultur vorliegt, durch vergleichende Analyse des Gehalts an intrazellulärer Adenylatkinase von vier aus der gemischten Kultur stammenden Aliquoten nachweisen, die i) ohne Gegenwart eines Antibiotikums, ii) in Gegenwart eines Antibiotikums, iii) in Gegenwart eines für das Bakterium spezifischen Bakteriophagen und iv) in Gegenwart eines Gemisches des Antibiotikums und des Bakteriophagen kultiviert wurden. So kann beispielsweise ein gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum empfindliches Bakterium auf der Grundlage ermittelt werden, dass die intrazelluläre Adenylatkinase in der mit dem Antibiotikum und dem Bakteriophagen kultivierten Probe im Vergleich zu der mit dem Bakteriophagen allein kultivierten Probe verringert ist.

[0007] Obgleich unterstellt werden könnte, dass die in WO 99/37799 offenbarten Verfahren das Vorhandensein eines gegen ein bestimmtes Antibiotikum resistenten Bakteriums in einer gemischten Kultur in einfacher Weise anzeigen können, kann in der Praxis ein solches Resultat nicht in eindeutiger und verlässlicher Weise erzielt werden, insbesondere, wenn die Konzentrationen der resistenten Bakterien niedrig sind.

[0008] Selbst wenn dies möglich wäre, ist klar, dass die Bestimmung eines solchen Vorhandenseins immer noch die Durchführung einer Reihe von wiederholten Schritten erfordert, zu denen die Kultivierung, die Behandlung und der Test von mindestens vier unterschiedlichen Aliquoten der gemischten Kultur gehören. Derartige Wiederholungen sind unelegant und erhöhen die Fehlermöglichkeit. Darüber hinaus ist das Verfahren mit einer inhärenten Verzögerung verbunden, da die Behandlung eines Aliquots der gemischten Kultur mit einem Bakteriophagen Zeit erfordert, um sicherzustellen, dass die Bakterien sich in der Log-Phase ihres Wachstums befinden.

[0009] Dementsprechend besteht nach wie vor ein Bedürfnis nach einem einfachen, schnellen Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins von Bakterien mit Antibiotikumsresistenz in einer Probe. Insbe-

sondere besteht nach wie vor ein Bedürfnis nach einem einfachen und schnellen Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins von Bakterien mit Antibiotikumsresistenz in einer klinischen Probe.

[0010] Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein einfaches und schnelles Verfahren zur Bestimmung, ob antibiotikumsresistente Bakterien in einer Probe vorliegen, insbesondere einer klinischen Probe, die zum Beispiel durch einen Abstrich von infizierten Individuen gewonnen wurde, anzugeben, das nur ein Minimum an erforderlichen Schritten beinhaltet.

[0011] Die vorliegende Erfindung geht von der Feststellung aus, dass eine sehr große Zahl von Bakterien allgemein gegen zell-lysierende Antibiotika empfindlich sind, sowie, dass demzufolge das intrazelluläre Material von empfindlichen Bakterien in einer gemischten Kultur vorteilhaft zunächst verworfen werden kann.

[0012] Dementsprechend gibt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung des Vorliegens von Target-Bakterien, die gegen ein zelllysierendes Antibiotikum resistent sind, in einer Probe an, das die nachstehenden aufeinanderfolgenden Schritte umfasst:

- i) Inkubieren der Probe in einem Inkubationsmedium, welches das zell-lysierende Antibiotikum enthält,
- ii) Einfangen nichtlysierten Zellen der Target-Bakterien auf einem festen Träger, der ein Einfangmittel aufweist,
- iii) Einwirkenlassen eines Mittels, das zur Zell-Lyse befähigt ist, auf die nichtlysierten Zellen der Target-Bakterien,
- iv) Bestimmen des Vorhandenseins von intrazellulärem Material aus den lysierten Zellen der Target-Bakterien.

[0013] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren ferner einen Waschschritt und/oder einen Filtrationsschritt vor Schritt iii), um intrazelluläres Material und Material, das von den gegen das zell-lysierende Antibiotikum empfindlichen Zellen stammt, zu entfernen.

[0014] Es ist festzuhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Anmeldung der Ausdruck "zell-lysierendes Antibiotikum" ein Mittel beschreibt, das die bakterielle Zellwandsynthese während der Zellreplikation zum Erliegen bringt. So sind zum Beispiel beliebige β -Lactam-Antibiotika zur Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung geeignet. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das zell-lysierende Antibiotikum ein Penicillin wie Ampicillin oder Methicillin.

[0015] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden

Erfindung kann das Einfangmittel für lediglich eine bestimmte Spezies von Bakterien spezifisch sein. Bei anderen Ausführungsformen kann das Einfangmittel für einen bestimmten Bakterienstamm spezifisch sein. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Einfangmittel Fibrinogen, das *Staphylococcus aureus* bindet. Alternativ ist das Einfangmittel ein für *Staphylococcus aureus* spezifischer Antikörper.

[0016] Es ist selbstverständlich klar, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung einen zusätzlichen zwischengeschalteten Schritt oder zusätzliche zwischengeschaltete Schritte umfassen kann, um das Vorhandensein von mehr als einem Target-Bakterium bestimmen zu können. Typischerweise können diese Schritte das Einfangen nichtlysiert Zellen der Target-Bakterien auf einem festen Träger umfassen, der ein oder mehrere Einfangmittel aufweist.

[0017] Das Kulturmedium zur Durchführung der vorliegenden Erfindung ist vorteilhaft ein flüssiges Nährmedium. Bei dieser Ausführungsform kann der feste Träger aus magnetischen Kugelchen bestehen, die mit einem geeigneten Antikörper oder einem anderen Einfangmittel beschichtet sind. Alternativ dazu kann der feste Träger eine Spatel, eine Spachtel oder ein Filter sein, die mindestens teilweise mit einem geeigneten Antikörper oder einem anderen Einfangmittel beschichtet sind.

[0018] Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das zur Zell-Lyse befähigte Mittel gegenüber den Target-Bakterien selektiv. Das Mittel ist bevorzugt für *Staphylococcus aureus* selektiv. Noch bevorzugter ist das zur Zell-Lyse befähigte Mittel Lysostaphin.

[0019] Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das zur Zell-Lyse befähigte Mittel ein gegenüber den Target-Bakterien selektiver Bakteriophage oder ein davon abgeleitetes Lysin. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das zur Zell-Lyse befähigte Mittel ein Colicin.

[0020] Es ist selbstverständlich auch festzuhalten, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung eine Reihe solcher Schritte umfassen kann, sodass das Vorhandensein von anderen Target-Bakterien ebenfalls bestimmt werden kann.

[0021] Die Bestimmung des von den lysierten Zellen der Target-Bakterien stammenden intrazellulären Materials kann mit irgendeinem geeigneten, im Stand der Technik bekannten Assay erfolgen. Das Assay ist bevorzugt ein Biolumineszenz-Assay. Das Biolumineszenz-Assay beruht bevorzugt auf der Adenylatkinase (AK), wie zum Beispiel in WO 94/17202 und WO 96/02665 beschrieben ist. Das Assay kann allerdings alternativ auch ein kolorimetrisches oder fluorimetrisches Assay sein, das auf intrazellulären En-

zymmarkern beruht, zum Beispiel einer Phosphatase oder Peroxidase.

[0022] Nach einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens der Erfindung angegeben. Der Testkit ist bevorzugt ein Einweg-Testkit. Der Testkit kann die geeigneten Komponenten enthalten, damit das gewählte Assay durchgeführt werden kann. Der Testkit enthält bevorzugt ein geeignetes Kulturmedium, das ein ausgewähltes zell-lysierendes Antibiotikum enthält. Noch bevorzugter enthält der Testkit einen festen Träger, der ein Einfangmittel aufweist, das für die Target-Bakterien spezifisch ist, eine Waschlösung sowie ein Mittel, das zur Zell-Lyse der Target-Bakterien befähigt ist.

[0023] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält der Testkit ein flüssiges Nährmedium, das Methicillin enthält. Das flüssige Nährmedium, das Methicillin enthält, wird bevorzugt in einer gefriergetrockneten Form bereitgestellt.

[0024] Der Testkit kann vorteilhaft in Form eines mit mehreren Vertiefungen versehenen Behälters geliefert werden, wie er in der Patentanmeldung GB 0110476.9 beschrieben ist.

[0025] Ein Vorteil des Verfahrens der vorliegenden Erfindung liegt in der schnellen (etwa 3 Stunden dauernden) Bestimmung des Vorhandenseins von Bakterien, die gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum resistent sind, wobei ein einziges Assay für intrazelluläres Material eingesetzt wird. Hinzu kommt, dass bei dem Verfahren keine mehrfachen, vergleichenden Assays erforderlich sind und das Verfahren ferner mit dem Vorteil verbunden ist, dass die Ergebnisse in einer eindeutigen, unabhängig qualitativen Weise, und nicht in einer vergleichenden oder quantitativen Weise, interpretiert werden können.

[0026] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden unter Bezug auf nicht einschränkende Ausführungsformen und die folgenden Zeichnungen erläutert; es zeigen:

[0027] [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung zur Erläuterung der wesentlichen Schritte des Verfahrens der vorliegenden Erfindung;

[0028] [Fig. 2](#) ein Diagramm, in dem der Unterschied zwischen negativen und positiven Tests aufgezeigt ist;

[0029] [Fig. 3](#) ein Diagramm, das Testergebnisse an Methicillin-resistenten und Methicillin-empfindlichen Stämmen von *Staphylococcus aureus* nach 3,5 h Inkubation mit 50 µg/ml Ampicillin oder 4 µg/ml Methicillin zeigt, und

[0030] [Fig. 4](#) eine Querschnittsansicht eines Testkits gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0031] Zunächst wird auf [Fig. 1](#) Bezug genommen. Eine in Form eines Abstrichs, zum Beispiel von einem Patienten, gewonnene Probe, die ein Gemisch von Bakterien enthält, das allgemein Methicillinresistente Bakterien **11** und allgemein Methicillin-empfindliche Bakterien **12** enthält, wird bei 37 °C in einem flüssigen Nährmedium von etwa 1 ml Volumen kultiviert, das etwa 4 µg des Antibiotikums enthält.

[0032] Methicillin-resistente Bakterien **11** überleben und können sich vermehren. Methicillin-empfindliche Bakterien **12** entwickeln allerdings nach einer anfänglichen Wachstumsphase geschwächte Zellwände **13** und lysieren, wobei ihr intrazelluläres Material **14** in das flüssige Nährmedium abgegeben wird.

[0033] Nach einem Zeitraum von 2 bis 4 Stunden enthält das flüssige Nährmedium deshalb ein Gemisch von Methicillin-resistenten, nichtlysierten Bakterien und Methicillin-empfindlichen lysierten Bakterien.

[0034] Das Vorliegen der bestimmten Bakterien, zum Beispiel von *Staphylococcus aureus*, wird dann durch Zugabe von paramagnetischen Kugelchen **15**, die mit Fibrinogen beschichtet sind, zu dem flüssigen Nährmedium bestimmt. Fibrinogen ist ein spezifisches Bindungsmittel für *Staphylococcus aureus*. Nach einer Zeitdauer von 2 bis 10 Minuten werden die Kugelchen magnetisch aus der Brühe entfernt und vor einem Analyseschritt gewaschen.

[0035] Die Kugelchen **15** und die daran angehefteten Target-Bakterien **11** werden dann in einem getrennten Gefäß mit einem Detergens behandelt, das befähigt ist, die Zellen zu lysieren. Das so erhaltene intrazelluläre Material wird unter Verwendung eines Luciferin-Luciferase-Biolumineszenzprotokolls auf Adenylatkinase analysiert. Das Vorhandensein von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* wird durch ein Signal **16** angezeigt. Das Signal **16** kann aus Sicherheitsgründen mit einem geeigneten Kontrollsignal verglichen werden, um Anomalien auszuschließen, die von Untergrundkonzentrationen an Adenylatkinase stammen.

[0036] Es wird ersichtlich, dass lediglich diejenigen Zellen, die gegenüber Methicillin undurchlässig bleiben und auf den magnetischen Kugelchen immobilisiert sind, ein signifikantes Signal beim Ansprechen auf das Adenylatkinase-Assay liefern.

[0037] Das Vorliegen anderer Methicillin-resistenter Targetspezies kann selbstverständlich durch einen alternativen Schritt oder zusätzliche Schritte untersucht werden, wozu die Zugabe von Kugelchen, die andere Beschichtungen aufweisen, oder von Kugel-

chen, die ein oder mehrere Einfangmittel in ihren Be- schichtungen enthalten, gehört.

[0038] Alternativ oder zusätzlich kann das Verfahren durch Abzielen auf eine bestimmte Art der Bakterienspezies im abschließenden Zell-Lyseschritt mit Spezifität versehen werden. So kann zum Beispiel ein Bakteriophage oder eine Detergenskombination mit Spezifität gegenüber *Staphylococcus aureus* verwendet werden.

[0039] [Fig. 2](#) zeigt die bei der Bestimmung des Vor- handenseins von *Staphylococcus aureus* in einer Reihe von klinischen Proben erhaltenen Biolumineszenzergebnisse. Wie ersichtlich ist, kann ein positives Testergebnis (Proben-Nummern M421000M und M421148L) leicht von einem negativen Testergebnis (Proben-Nummern M421117S und M421131P) unter- schieden werden.

[0040] [Fig. 3](#) zeigt die für verschiedene Stämme von *Staphylococcus aureus*, die in Gegenwart von Ampicillin sowie Methicillin kultiviert worden waren, erhaltenen Biolumineszenzergebnisse. In jedem Fall unterscheidet das Verfahren zwischen dem Vorliegen von Antibiotikums-resistenten Stämmen und Antibiotikumsempfindlichen Stämmen.

[0041] Im Folgenden wird auf [Fig. 4](#) Bezug genommen. Ein Testkit zur Verwendung im Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst ein festes, spritzge- gossenes Polypropylengehäuse, das allgemein mit **17** bezeichnet ist und eine Reihe von Vertiefungen **18**, **19**, **20**, **21**, **22** enthält, die als Vorratskammern und/oder Reaktionskammern für verschiedene ge- eignete Hilfsmittel oder Reagentien (wie unten be- schrieben) dienen.

[0042] Die Kammer **18** enthält eine flüssige Brühe **22**, die ein zellysierendes Antibiotikum enthält und sich zur Inkubation einer Abstrichprobe eignet, die von einem infizierten Individuum erhalten wurde. Die Kammer **18** ist mit einem festen Stab **23** versehen, der einen Tupfer **24** zur Gewinnung der Probe trägt. Der Stab **23** trägt einen Querabschnitt **25**, der als Handgriff für den Stab **18** dient und geeigneterweise eine Lippe **26** aufweist, welche das flüssige Nährme- dium **22**, welches das zell-lysierende Antibiotikum enthält, in der Kammer **18** dicht verschließt.

[0043] Die benachbarten Kammern **19**, **20** enthalten eine wässrige Lösung, die eine Suspension von mag- netischen Kugelchen **27** enthält, beziehungsweise eine wässrige, Phosphat-gepufferte Salzlösung als Waschlösung **28**. Geeignete magnetische Kugelchen sind zum Beispiel die von Dynal unter der Bezeichnung Dynabeads™ erhältlichen Kugelchen. Wie oben erwähnt, sind die Kugelchen mit einem Mittel be- schichtet, das zum Einfangen der Target-Bakterien befähigt ist.

[0044] Die Kammer **21**, die als Reaktionskammer des Kits dient, ist mit einer wässrigen Pufferlösung **29** versehen, die sich zur Durchführung eines Biolumineszenz-Assays auf der Basis der Adenylatkinase eignet. Die Kammer ist ferner mit in Folie eingesiegelten Kapseln **30**, **31** oberhalb der Pufferlösung **29** ver- sehen, die ein Biolumineszenzreagens auf der Basis von Luciferin/Luciferase beziehungsweise eine wässrige Lösung von Adenosindiphosphat enthalten, die ein Detergens oder ein Mittel enthält, das zur Lyse der Zellen der Target-Bakterien befähigt ist. Eine Quelle für Magnesium, wie etwa Magnesiumacetat, das als Promotor für das Biolumineszenz-Assay dient, ist in dem Raum **32** vorgesehen, der durch die in Folie eingesiegelten Kapseln abgeteilt wird.

[0045] Die Kammer **22** ist mit einem hohlen Stab **33** versehen, der eine scharfe konische Spitze **34** trägt, die geeignet ist, die in Folie eingesiegelten Kapseln **30**, **31** zu durchstoßen. Der Stab **33** ist mit einem Querbereich **35** versehen, der Eingriffsmittel (zum Beispiel Schlitze – nicht dargestellt) zum Eingriff ei- nes Mechanismus aufweist, der sich zum Bewegen des Stabs **33** in vertikaler und horizontaler Richtung unter der Kontrolle einer Steuerhardware oder Steu- ersoftware (nicht dargestellt) eignet. Der Querbereich **35** ist ferner mit einer Öffnung (nicht dargestellt) ver- sehen, die es erlaubt, in den Stab **33** einen zurück- ziehbaren zylindrischen Magneten (nicht dargestellt) einzuführen.

[0046] Die Kammern **19**, **20**, **21**, **22** sind mit auflami- nierten Abdichtmitteln in Form einer Metallfolie **36** ver- sehen. Im Gegensatz zu den Abdichtmitteln, mit denen die Kammer **18** versehen ist, dient das Lami- nat als Abdichtmittel nicht zur Wiederverwendung nach dem Aufreißen.

[0047] Bei der Verwendung wird der feste Stab **23**, der den Tupfer **24** trägt, manuell mit dem Handgriff **25** aus der Kammer **18** entnommen und zur Gewinnung einer Probe von einem infizierten Individuum verwen- det. Der Stab **23** wird sofort wieder in die Kammer eingesetzt, sodass der Tupfer **24** in das flüssige Nährmedium **22** eingetaucht wird, und die Abdich- tung zwischen der Lippe **26** und der Kammer **18** wird wieder hergestellt.

[0048] Der Testkit wird für eine Zeitdauer von etwa 3 h unter geeigneten Bedingungen gehalten, um die Probe des Patienten zu inkubieren. Am Ende dieses Zeitraums wird der Stab **23** aus der Kammer **18** ent- nommen, und die Metallfolie, mit der die Kammern **19**, **20**, **21**, **22** versiegelt sind, wird abgezogen.

[0049] Der hohle Stab **33** (der den zurückziehbaren Magneten enthält) wird mit dem Bewegungsmecha- nismus in Eingriff gebracht. Unter der Kontrolle einer Hardware oder unter Softwarekontrolle wird der Stab **33** in die Kammer **19** bewegt, wo er die magnetischen

Kügelchen aus der Suspension **27** aufsammelt, worauf der Magnet in die Kammer **18** gebracht wird, wo durch Zurückziehen des Magneten, zum Beispiel durch einen Schneckenantrieb, die Kügelchen im Nährmedium abgelagert werden.

[0050] Nach einer geeigneten Zeitdauer, und erforderlichenfalls unter Rühren, wird der Magnet wieder in den Stab **33** zurückgebracht, sodass er die Kügelchen aufsammelt. Der Stab **33** wird dann in die Kammer **20** bewegt, wo die Kügelchen in der Waschlösung **28** abgelagert werden, worauf sie nach einer weiteren geeigneten Zeitdauer, wie oben beschrieben, wiedergewonnen werden.

[0051] Der Stab **33**, der die gewaschenen Kügelchen trägt, wird anschließend zur Reaktionskammer **21** bewegt, sodass die scharfe, konische Spitze **34** den Inhalt der in Folie eingesiegelten Kapseln **30, 31** in die Pufferlösung **29** hinein freisetzt. Die Kügelchen werden dann durch Zurückziehen des Magneten aus dem Stab **33** in die Lösung **29** freigesetzt, und der Stab wird wieder in die Kammer **22** gebracht.

[0052] Ein Photomultiplier (nicht dargestellt), der unterhalb der Kammer **21** des Polypropylengehäuses **17** angeordnet ist, erfasst das von der anschließenden Biolumineszenzreaktion emittierte Licht (eine detaillierte Beschreibung der Reaktion ist in WO 94/17202 und WO 96/02665 gegeben).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins von Target-Bakterien, die gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum resistent sind, in einer Probe, das die nachstehenden aufeinanderfolgenden Schritte umfasst:
i) Inkubieren der Probe in einem Inkubationsmedium, welches das Zell-lysierende Antibiotikum enthält,
ii) Einfangen nichtlysierter Zellen der Target-Bakterien auf einem festen Träger, der ein Einfangmittel aufweist,
iii) Einwirkenlassen eines Mittels, das zur Zell-Lyse befähigt ist, auf die nichtlysierenden Zellen der Target-Bakterien,
iv) Bestimmen des Vorhandenseins von intrazellulärem Material aus den lysierten Zellen der Target-Bakterien.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem vor Schritt iii) ein Waschschnitt und/oder ein Filtrations-schritt durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem das Einfangmittel ein gegen *Staphylococcus aureus* spezifischer Antikörper ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem das Einfangmittel Fibrinogen ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Mittel, das zur Zell-Lyse befähigt ist, gegenüber *Staphylococcus aureus* selektiv ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem das Mittel, das zur Zell-Lyse befähigt ist, Lysostaphin ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem das Mittel, das zur Zell-Lyse befähigt ist, ein Bakteriophage ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Kulturmedium ein flüssiges Nährmedium ist.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der feste Träger magnetische Kügelchen sind.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem Schritt iv) ein Biolumineszenz-Assay umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem das Biolumineszenz-Assay auf Adenylatkinase basiert.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, bei dem Schritt iv) ein kolorimetrisches oder fluorimetrisches Assay umfasst, das auf einem intrazellulären Enzymmarker basiert.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das zell-lysierende Antibiotikum Methicillin ist.

14. Testkit, der ein festes, durch Spritzgießen hergestelltes Propylengehäuse, wie in [Fig. 4](#) dargestellt, aufweist, zur Bestimmung des Vorhandenseins von Target-Bakterien, die gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum resistent sind, in einer Probe, der aufweist: ein Kulturmedium, welches das zelllysierende Antibiotikum enthält, einen oder mehrere feste Träger, die ein für die Target-Bakterien spezifisches Einfangmittel aufweisen, ein oder mehrere Mittel, die zur Zell-Lyse der Target-Bakterien befähigt sind, und Reagenzien zur Bestimmung des Vorhandenseins von intrazellulärem Material aus den lysierten Zellen der Target-Bakterien.

15. Testkit nach Anspruch 14, bei der das zell-lysierende Antibiotikum Methicillin ist.

16. Testkit nach Anspruch 14 oder 15, bei dem das eine Einfangmittel oder eines von mehreren Einfangmitteln ein gegenüber *Staphylococcus aureus* spezifisches Einfangmittel ist.

17. Testkit nach einem der Ansprüche 14 bis 16, bei dem das eine Einfangmittel oder eines von mehreren Einfangmitteln Fibrinogen ist.

18. Testkit nach einem der Ansprüche 14 bis 17, bei dem das eine zell-lysierende Mittel oder eines von mehreren zell-lysierenden Mitteln Lysostaphin ist.

19. Testkit nach einem der Ansprüche 14 bis 18, bei dem die Reagenzien zur Bestimmung des Vorhandenseins von intrazellulärem Material aus den lysierten Zellen der Target-Bakterien zur Durchführung eines Biolumineszenz-Assays, eines kolorimetrischen Assays oder eines fluorimetrischen Assays für intrazelluläre Enzymmarker geeignet sind.

20. Verwendung des Testkits nach den Ansprüchen 14 bis 19 zur Bestimmung des Vorhandenseins von Target-Bakterien in einer Probe, wobei die Target-Bakterien gegen ein zell-lysierendes Antibiotikum resistent sind, und Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 13.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Fig.1





