



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 147 005

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11)	147 005	(44)	11.03.81	3 (51)	G 01 N 33/48
(21)	AP G 01 N / 216 966	(22)	16.11.79		
(31)	PCT/DE 79/00123	(32)	19.10.79	(33)	DE

(71) siehe (72)

(72) Romano, Amalia. Dr., IL

(73) siehe (72)

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin,
Wallstraße 23/24

(54) Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionen

(57) Es handelt sich um ein Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionen vor oder neben Virusinfektionen des Auges und anderer Organe, bei dem man eine Probe, die von einem körpereigenen Stoff, wie Tränen oder dergleichen, an der Infektionsstelle entnommen worden ist, einer für bakterielle Enzyme reaktivierenden Behandlung unterwirft und die bakteriellen Enzyme in dem so erhaltenen Material nachweist. Der Nachweis wird insbesondere durch Anfärben einer Probe des nach der reaktivierenden Behandlung erhaltenen Materials in einem von den bakteriellen Enzymen zersetzbaren Substrat und Feststellen der Bildung von Halonen (aufgehellten Höfen) und gegebenenfalls deren Größe durchgeführt. Das Verfahren ist von Bedeutung, weil bakterielle Enzyme, die ohne Anwendung von Antibiotika bei Virusinfektionen im Organismus entstehen können, die Bildung von antiviralem Interferon in der Zelle beeinträchtigen oder hindern.

216966 -1-

Berlin, den 9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionen vor oder neben Virusinfektionen des Auges und anderer Organe.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Behandlung von Viruserkrankungen des Auges wurden bisher schon antivirale Substanzen wie Interferon verwendet (Emödi u. a. 1974, Jordan, 1974). Es wurde damit im allgemeinen eine Besserung der Virusinfektion erreicht, doch konnte vielfach ein erneutes Auftreten einer akuten Virusinfektion nicht verhindert werden.

Im Rahmen der Erfindung wurde festgestellt, daß ein enger Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Infektion und einer Viruserkrankung besteht, d. h., daß einer Viruserkrankung immer eine bakterielle Infektion vorangeht oder eine Viruserkrankung von einer solchen bakteriellen Infektion begleitet wird. Vor und während einer Viruserkrankung sind bakterielle Enzyme beim Krankheitsherd vorhanden. Diese bakteriellen Enzyme, wie die Hyaluronidase, beeinträchtigen bzw. hindern eine Bildung von antiviralem Interferon in der Zelle, wodurch ein Eindringen und ein Ausbreiten des Virus ermöglicht wird.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Nachweis bakterieller Infektionen vor oder neben Virus-

216966

-2-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

infektionen des Auges und anderer Organe, wodurch dann eine wirksame Behandlung der Virusinfektionen durch Verabreichung geeigneter Antibiotika außer antiviralen Substanzen und dadurch eine Unterdrückung einer Bildung von bakteriellen Enzymen erreicht werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, bakterielle Enzyme sichtbar zu machen.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß man eine Probe, die von einem körpereigenen Stoff, wie Tränen oder dergleichen, an der Infektionsstelle entnommen worden ist, einer für bakterielle Enzyme reaktivierenden Behandlung unterwirft und in dem so erhaltenen Material bakterielle Enzyme nachweist.

Nach einer Ausgestaltung der Erfindung setzt man der Probe vor oder nach der reaktivierenden Behandlung für bakterielle Enzyme ein Antibiotikum oder mehrere Antibiotika zu. Die Antibiotika wirken bakteriostatisch oder bakterizid zerstören jedoch nicht die bakteriellen Enzyme der Probe.

Bei positivem Nachweis von bakteriellen Enzymen in der Probe können diese im einzelnen durch "Neutralisieren" mit geeigneten Substanzen, wie z. B. Hyaluronidase mit Heparin, Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Zinksulfat, Sterole usw., bestimmt werden.

216966

-3-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Das Verfahren der Erfindung ermöglicht den Nachweis bakterieller Infektionen neben Virusinfektionen aufgrund der Feststellung von bakteriellen Enzymen auch dann, wenn die Bakterien selbst nicht nachweisbar sein sollten.

Nach einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung färbt man zum Nachweis der bakteriellen Enzyme in dem nach der reaktivierenden Behandlung erhaltenen Material eine Probe des letzteren in einem von den bakteriellen Enzymen zersetzbaren Substrat an und stellt die Bildung von Halonen (aufgehellten Höfen) und gegebenenfalls deren Größe fest.

Mit Vorteil kann bei Durchführung der Erfindung als Substrat ein Glucosaminoglycansubstrat und zum Anfärben desselben Toluidinblau verwendet werden.

Bei positivem Nachweis bakterieller Infektionen vor oder neben Virusinfektionen nach dem Verfahren der Erfindung kann beispielsweise folgende Behandlung beim Patienten vorgenommen werden:

1. Zur lokalen Behandlung (Tropfen oder Salbe)

Antibiotika: Gentamycinsulfat	oder
Chloramphenicol	oder
Cephalotinnatrium (Cephalin)	oder
Terramycin	oder
andere weitere Antibiotika, die dem Antibiogramm nach verwendbar sind.	

216966

-4-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Diese Antibiotika werden wegen ihrer direkten antiviralen Wirkung zur ophtalmischen Behandlung eingesetzt. Die angewendeten Mengen entsprechen den üblichen, müssen aber noch wirksam sein können (bakterizide Mindestwirkung). Im allgemeinen schwanken die angewendeten Mengen zwischen 3 mcg/ml und 100 mcg/ml.

Es wird außerdem die zusätzliche Verwendung von Polymixin B-Sulfat mit/oder Neomycinsulfat in einer Konzentration von 0,25 % bis 0,50 % empfohlen, und zwar nicht nur wegen der antibakteriellen Wirkung dieser beiden Antibiotika, sondern hauptsächlich wegen derer Fähigkeit, die bakteriellen Enzyme zu neutralisieren. Besonders Neomycinsulfat unterstützt das Interferon und erleichtert das Eindringen desselben.

2. Neutralisatoren für bakterielle Enzyme

- a. Polymixin B-Sulfat,
Neomycinsulfat,
Metalle, wie Silber, Kupfer, Quecksilber, ferner Jod.
Als Beispiel wird Zinksulfat, 0,5 %, in Kochsalzlösung angegeben.
- b. Heparinsulfat, 0,05 %, lokal oder subconjunctival, wie auch allgemein,
DEAE (Diäthylaminzellulosedextran) in Dosen von 400 mcg/ml/Tag lokal oder allgemein zur Unterstützung der Interferoneindringung.
- c. Essbare Säure, 0,1 bis 1 %, in Kochsalzlösung (pH7).
(Sie ist nicht gleichzeitig mit Metallen zu verwenden),
L-Cystein (freie Base), 1,2 % bis 3 %.

216966

-5-

9.4.1980

G 01 N/ 216 966

(56 589/11)

aliphatische Alkohole, die Sulfate enthalten,
N-Acetylcystein (eine weitere Form der Cysteingruppe,
wird auch als Interferon-Stabilisator empfohlen).

3. Interferon und/oder Initiatoren dafür

- a. Menschliches fibroblastisches Interferon für lokale Anwendung in einer Dosierung von 1×10^6 ref. Einheiten/ml 2 bis 6x/Tag während wenigstens 7 Tagen. Es ist eine Kochsalzlösung von Phosphatpuffer (pH7), die auch eine Lösung von menschlichem Albumin (0,3 %) enthält.
- b. Menschliches leukocytisches Interferon für lokale Anwendung in einer Dosierung von 1×10^6 ref. Einheiten/ml 2 bis 6x/Tag während wenigstens 7 Tagen.
- . Beide Substanzen sollen in plastischen Kapillarröhrchen von 0,5 bis 1 ml (= 1 bis 2 Tropfen) für eine einmalige Anwendung in einer Kühlanlage aufbewahrt werden.
- c. Poly I:C (Polylysin-CA-Zellulose), gelöst in Phosphatpuffer (pH 7) in einer Dosierung von 1000 mcg/ml, wird in einer Kühlanlage aufbewahrt. Für lokale Anwendung werden 100 bis 200 Einheiten/0,1 cm³ 6 bis 8x/Tag wenigstens während 7 Tagen verabreicht. (Therapeutische Gesamtdosis von 5000 bis 30 000 mcg). Für die intravenöse Anwendung wird eine therapeutische Gesamtdosis von 30 mcg/70 kg Körpergewicht verabreicht (das sind 4000 bis 6000 Einheiten in 24 Stunden). Die oben angegebenen Neutralisatoren sind wenige Minuten vor der

216966

-6-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Verabreichung von Poly I:G anzuwenden, um dadurch eine Depolarisierung des Gewebes zu erreichen. Diese Depolarisierung bereitet das Eindringen von Interferon vor.

4. Interferon-Stabilisatoren

- a. N-Acetylcysteindextran, 0,05 ml/Tropfen
- b. Dextran in allen seinen Formen
- c. Polyvinylpyrrolidon (Polyvinylpirididon)

5. Zusätzlich zu den vorstehenden Interferon-Stabilisatoren können die folgenden Substanzen bei schweren Infektionen angewendet werden:

- a. Steroide für die lokale Anwendung, 0,05 % bis 0,5 % bis 1 %, 4x/Tag, für die allgemeine Anwendung 5 bis 50 mg/Tag.
- b. Indomed als Antiprostaglandinmaterial, 1 % bei lokaler Anwendung, 10 mg bei parenteraler Anwendung.
- c. I.D.U. oder Trifluorothymidin in kleinen Mengen, das entgegenwirkt und eine mögliche Reaktivierung des Virus verhindert.

216966 -7-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Ausführungsbeispiel

Das Verfahren der Erfindung wird in dem nachfolgenden Beispiel erläutert.

Beispiel

Kleine Platten von Mikrogewebekulturen werden mit folgenden Substanzen angefüllt:

2 bis 3 cm³ von einem Puffer (pH 7 bis 8,1), der konzentriertes Material nach Hank mit kleinsten Mengen Penicillin-Streptomycin-Mycostatin enthält,

Agarose 1 % in Kochsalzlösung,

ein Glucosaminoglycansubstrat, wie z. B. Chondroitinsulfat, in Konzentrationen von 0,01 %, 0,05 % und 0,1 %, oder Hyaluronidsäure in Konzentrationen von 0,001 % bis 0,1 %.

Außer den obigen Mikroplatten werden folgende Kontrollplatten vorbereitet:

Mikroplatten, die nur Material nach Hank mit 1 % Agarose ohne Substrat enthalten, oder Mikroplatten, die eine Phosphat-Puffer-Kochsalzlösung (PBS) mit 1 % Agarose ohne Substrat enthalten,

Mikroplatten, die Material nach Hank mit Agarose und das Substrat und zusätzlich die Standardenzyme Hyaluronidase (aufgearbeitete Rindertestes) (1 mg/ml oder Lösungen nach

216966

-8-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

einer Standardskala) enthalten, und zwar an einer Stelle der Platte. An eine andere Stelle wird für Vergleichszwecke bakterielles Enzym von Tränen in einer Lösung nach einer Standardskala gebracht,

Mikroplatten, die außer Agarose und Substrat auch Enzym-Neutralisator, wie Heparin, 0,05 % oder Dextransulfat in verschiedenen Verdünnungen und Lösungen, enthalten.

Alle Mikroplatten sollen hermetisch verschlossen in einer Kühlanlage aufbewahrt werden.

Technische Methoden für die Gewinnung des Enzyms aus verschiedenen biologischen Flüssigkeiten und Geweben, Tränen, Blut, Samen, Cornea, Leukocyten und Bakterienkulturen von Infektionsstellen.

Das Gewinnen des Materials wird mit einem Filterpapierstreifen oder einer solchen Scheibe, wie z. B. dem Streifen für den Schirmer-Test oder der gebräuchlichen Scheibe für ein Antibio-gramm, oder mittels Mikrokapillarröhren durchgeführt. Jedes gewonnene Material wird in einige oder alle Mikroplatten gebracht und bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nachher werden die Filterpapierstreifen oder -scheiben von den Mikroplatten genommen und der Anfärbung unterworfen.

Färbungstechnik:

2 cm³ Toluidinblau, 0,1 %, werden gleichmäßig auf jede Mikroplatte gestreut, 5 Minuten dort gehalten und danach mit 7%iger Essigsäure gewaschen.

216966

-9-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Das Verfahren besteht hierbei also aus dem Anfärben eines Glucosaminoglycansubstrats mit Toluidinblau (einer ortho-chromatischen Farbe) und dem darauffolgenden Entfärben, um dadurch einen Halo (aufgehellten Hof) an der Reaktionsstelle zwischen dem Substrat und dem dies zersetzenden Enzym zu erhalten.

216966

-10-

9.4.1980

G 01 N/216 966

(56 589/11)

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zum Nachweis bakterieller Infektionen vor oder neben Virusinfektionen des Auges und anderer Organe, gekennzeichnet dadurch, daß man eine Probe, die von einem körpereigenen Stoff, wie Tränen oder dergleichen, an der Infektionsstelle entnommen worden ist, einer für bakterielle Enzyme reaktivierenden Behandlung unterwirft und in dem so erhaltenen Material bakterielle Enzyme nachweist.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß man die Probe vor oder nach der reaktivierenden Behandlung für bakterielle Enzyme ein Antibiotikum oder mehrere Antibiotika zusetzt.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß man zum Nachweis der bakteriellen Enzyme in dem nach der reaktivierenden Behandlung erhaltenen Material eine Probe des letzteren in einem von den bakteriellen Enzymen zersetzbaren Substrat anfärbt und die Bildung von Halonen (aufgehellten Höfen) und gegebenenfalls deren Größe feststellt.
4. Verfahren nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß man als Substrat ein Glucosaminoglycansubstrat und zum Anfärben desselben Toluidinblau verwendet.