



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 294 568 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) G 01 N 33/566
G 01 N 33/68

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD G 01 N / 330 810 8	(22)	14.07.89	(44)	02.10.91
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, O - 1080 Berlin, DE
(72)	Bürger, Wolf, Dr. sc. nat. Dipl.-Chem.; Ritter, Erika, Dr. med.; Schmidt, Gerhard, Prof. Dr. sc. med.; von Baehr, Rüdiger, Prof. Dr. sc. med., DE
(73)	Humboldt-Universität, Bereich Medizin (Charité), O - 1040 Berlin, DE

(54)	Verfahren zur Bestimmung von C-reaktivem Protein
------	--

(55) C-reaktives Protein; CRP; Konzentrationsbestimmung; Agglutination; Latex; Ligand; Phosphorylverbindung; labordiagnostische Bestimmung

(57) Beschrieben wird ein neuartiges Verfahren zur labordiagnostischen Bestimmung von C-reaktivem Protein mittels Agglutinationsreaktion, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mit einem Liganden konjugierte Teilchen-Suspensionen durch C-reaktives Protein (CRP) und Antikörper gegen CRP agglutiniert werden. Das CRP besitzt Bindungszellen für den Liganden. Als Teilchen werden vorwiegend Latexsuspensionen, als Liganden Phosphorylverbindungen, als Antikörper spezifische poly- bzw. monoklonale Antiseren benutzt. Die Konstruktion des Tests bewirkt, daß falsch positive Reaktionen, wie sie bei herkömmlichen Agglutinationstesten durch Rheumafaktoren (Autoantikörper gegen IgG) stattfinden, nicht mehr vorkommen können. Weiterhin ist die Konstanz der Reaktanden bei Lagerung verbessert. Die Erfindung ist im Labormaßstab erprobt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP) im Serum und anderen Körperflüssigkeiten mittels Agglutinationsreaktion geeigneter Teilchensuspensionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß Teilchen-Ligand-Konjugate eingesetzt werden, zu deren Ligandkomponente das CRP eine oder mehrere Bindungsstellen besitzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß durch Bindung des CRP sowohl an einen Antikörper, der gegen Bindungsstellen des CRP gerichtet ist, als auch an das Teilchen-Ligand-Konjugat, Agglutinate gebildet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Teilchen-Ligand-Konjugate in ihrer Teilchenkomponente in der Regel aus Latexpartikeln und in ihrer Ligandkomponente vorzugsweise aus Phosphorylverbindungen bestehen.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Agglutinationsreaktion auf einen geeigneten Träger, z. B. einer Glasplatte, durchgeführt wird mit visueller Auswertung oder durch Messen der optischen Dichte als Trübungsmessung bzw. durch automatische Bestimmung der Teilchenzahl.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung beschreibt ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung des Gehalts an C-reaktivem Protein (CRP) mittels Agglutinationsreaktion. Es können sowohl semiquantitative Tests (Tropfentest auf Glasplatte) als auch quantitative Messungen (Trübungsmessungen mit Eichkurve) durchgeführt werden. Die Konzentration des CRP im Serum und anderen Körperflüssigkeiten erhöht sich bei bakteriellen Infektionen, Verletzungen, nach chirurgischen Eingriffen, Verbrennungen, Gewebsuntergängen.

Durch die Bestimmung der Konzentration des CRP erhält der Kliniker Hinweise auf den Zustand des Patienten, da bei Gesundheit Normalwerte erreicht werden. Hauptsächliche Anwendungen sind z. Z. Erkennen und Beurteilen von Heilungsverläufen nach chirurgischen Eingriffen und Verletzungen, Sepsis bei Neugeborenen, Nachweis von Infarkten und Nekrosen, Zustand bei chronischen Entzündungen, Verläufe und Differentialdiagnose bei akuten bakteriellen und viralen Infektionen. Anwendungsgebiet ist daher die klinische Laboratoriumsdiagnostik.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Agglutinationstechniken besitzen den Vorzug einfacher Testdurchführung sowie kurzer Reaktionszeiten. Diese Methoden werden in der Regel mit Teilchen (Latexpartikel bzw. Erythrozyten) durchgeführt, an deren Oberfläche adsorptiv oder kovalent Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen gebunden worden sind. Zur Agglutination während des Tests kommt es durch Bindung der Antikörper verschiedener Teilchen an ein Antigen. Die ersten Agglutinationsteste waren Methoden zur Bestimmung von Rheumafaktoren (α -IgG-Autoantikörper), bei denen Teilchen mit IgG (nativ oder aggregiert) an der festen Phase durch erhöhte Rheumafaktortiter in den Proben spontan aggregiert wurden. Diese Reaktion ist natürlich nicht abhängig von der Spezifität der Antikörper, daher ist diese Fehlerquelle falsch positiver Reaktionen bei diesen Tests immer vorhanden. Die beschriebene Problematik tritt vor allem auf bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten und Infektionen. Da dies der Patientenkreis ist, bei dem die CRP-Bestimmung von besonderem Interesse ist, sind RF-unabhängige Bestimmungstechniken wünschenswert. Auf diese Fragen (CRP bei hohen RF-Titern) gehen ein: J. Highton u. P. Hessian in *J. Immunol. Meth.* **68** [1984], 185-192, K. Norregard-Hansen, J. Hangaard u. B. A. Norgaard-Pedersen in *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **44** [1984], 99-103, J. Sjöquist u. A. Larsson in *Clin. Chem.* **34** [1988], 767-769, M. Mirshaki, J. Soria u. C. Soria in *Thromb. Res.* **44** [1986], 715-127.) Nun ergibt sich durch das Prinzip der Ligandbindung, vergl. hierzu die Patente DD-WP 259045 und DD-WP 259046, die Möglichkeit, Unspezifitäten bei der CRP-Bestimmung zu vermeiden, indem auf Antikörper an der festen Phase verzichtet wird. Es zeigte sich jedoch, daß die einfache Übertragung der Anwendung von Ligand-Träger-Konjugaten, wie sie in den Patenten beschrieben ist, nicht möglich ist. Dadurch wird es notwendig, ein völlig neues Prinzip der Ligandbindung zu finden und zu entwickeln, das in diesem Papier dargestellt wird.

Die Konstruktion des Tests gewährleistet, daß die Ergebnisse konstant richtig bleiben bei längerer Lagerung der Teilchen-Konjugate, da das kontinuierliche Abgeben der adsorptiv oder kovalent gebundenen Antikörper von der Teilchenoberfläche, wie beim herkömmlichen Verfahren, nicht vorkommen kann.

Die verwendeten Teilchen-Ligand-Konjugate werden aus Latexsuspensionen und Liganden gebildet, zu denen CRP eine oder mehrere Bindungsstellen besitzt. Geeignete Liganden sind Phosphorylverbindungen, wenn sie mit der Phosphorylcholinbindungsstelle des CRP reagieren können. Die Antikörper gegen CRP sind in spezifischen poly- bzw. monoklonalen Antisera enthalten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die labordiagnostische Bestimmung der Konzentration von C-reaktivem Protein zu verbessern und die Nachteile der bisherigen Agglutinationstechniken, insbesondere bei Problemseren, durch ein neues Reaktionsprinzip zu vermeiden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein neues Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von C-reaktivem Protein zu entwickeln. Hierbei sollen vor allem die Nachteile der existierenden Agglutinationsteste vermieden werden, die vor allem bei Problemseren existieren. Derartige Problemseren sind in erster Linie Seren von Patienten mit Autoimmunkrankheiten und Infektionen, da diese oftmals erhöhte Konzentrationen an Rheumafaktoren (Autoantikörper mit Reaktivität gegen IgG) bzw. unspezifisch reagierende Antikörper besitzen, die zu falsch positiven Agglutinationsreaktionen Anlaß geben.

Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein neues Prinzip der Agglutinationsreaktion entwickelt und angewendet wurde. Hierbei werden bei der Reaktion Latex-Teilchen eingesetzt, an die natürliche Liganden mit Bindungsaffinität gegen CRP angekoppelt worden sind. Der Test beruht darauf, daß zu einer Suspension dieser konjugierten Teilchen Antikörper gegen das CRP in die Testlösung gegeben werden und diese Mischung als eigentliche Reagenzlösung benutzt wird. Bei Zugabe einer CRP-haltigen Lösung kommt es zu gleichzeitiger Bindung des CRP an die Teilchen-Konjugate und Vernetzung über die Antikörper in Lösung.

Dieses Verfahren unterscheidet sich grundlegend von bisherigen Methoden, bei denen die Antikörper an die Teilchen gebunden werden und die Vernetzung durch Mehrfachbindung an das in Lösung vorhandene Protein erfolgt. Als Anwendungsverfahren stehen in erster Linie die Latexagglutination auf Glasplatte mit anschließender optischer Auswertung mittels Lupe oder Mikroskop (als semiquantitatives Verfahren oder cut-off-Test) zur Verfügung und quantitative Methoden, bei denen entweder Veränderung der Trübung durch nephelometrische oder turbidimetrische Messung oder Auswertung der Veränderung der Teilchenzahl mittels Teilchenzahlgerät erfolgt. Unspezifische Agglutination durch hohe Titer von Antikörpern gegen den Liganden in der Probe können bei bestimmten schweren bakteriellen Infekten vorkommen und werden durch den gleichen Test ohne Zugabe von Antikörpern zu der Testlösung sicher erfaßt.

Ausführungsbeispiel

(Latexagglutination auf Glasplatte mit visueller Auswertung)

Latexpartikel, an die kovalent über Spacermoleküle ein Phosphorylcholderivat gekoppelt wurde, werden mit Glycinpuffer (0,1 m Glycin/0,15 m NaCl/pH = 8,2) gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5% (w/w) gebracht. Diese Suspension wird vor dem Test mit einem spezifischen α -CRP-Serum (ein Fünfzigstel des Volumens) versetzt. Der eigentliche Test geht so vonstatten, daß 10 μ l Teilchensuspension auf einen Objektträger getropft werden und jeweils 10 μ l einer Patientenserumverdünnung in Ca++-Glycinpuffer (0,05 m CaCl/0,1 m Glycin/0,15 m NaCl/pH = 8,2), die 1:2/1:4/1:8/1:16 angefertigt wird, dazugegeben und vermischt wird. Nach 20 min in einer feuchten Kammer wird optisch (Lupe/Mikroskop) durch Betrachten über schwarzem Grund die Agglutination beurteilt. Bei vorliegender Reaktion wird die Suspension flockig. Die Reaktanden werden so eingestellt, daß bei einer Probenverdünnung von 1:2 eine positive Reaktion oberhalb einer Konzentration von 8 μ g/ml CRP in der Probe stattfindet (cut off - Methode). Eine semiquantitative Einschätzung höherer Konzentrationen ermöglicht die Auswertung der anderen Verdünnungen. Liegt z. B. erst Agglutination der 1:8-Stufe vor, so muß die Konzentration mindestens 32 μ g/ml CRP betragen.