



Patentdirektoratet
TAASTRUP

-
- (21) Patentansøgning nr.: 1146/92 (51) Int.Cl.5 C 12 Q 1/37
 - (22) Indleveringsdag: 17 sep 1992
 - (24) Løbedag: 02 dec 1986
 - (41) Alm. tilgængelig: 17 sep 1992
 - (45) Patentets meddelelse bkg. den: 28 nov 1994
 - (86) International ansøgning nr.: -
 - (62) Stamansøgning nr.: 5796/86
 - (30) Prioritet: 03 dec 1985 US 803963

 - (73) Patenthaver: *Miles Inc.; 1127 Myrde Street; Elkhart; Indiana 46514, US
 - (72) Opfinder: Angela A. *Michaels; US

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Enhedsscreeningsanordning for gram-negativ bakteriuri samt fremgangsmåde til fremstilling heraf

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag: 1146-92

En enhedsscreeningsanordning for gram-negativ bakteriuri til bestemmelse af tilstedeværelsen af mindst 10⁵ gram-negative bakterier pr. ml af en urinprøve under anvendelse af en fremgangsmåde, ved hvilken

(a) en ufortyndet urinprøve, der skal afprøves, sættes til et reagensglas indeholdende hestekokkrabbe-amebocytlysate og en første puffer, der kan holde pH indenfor pH-intervallet fra 6,3 til 7,5, så at der dannes en reagensglasblanding, hvori lysatkoncentrationen er mindst 3,5 mg pr. ml af den dannede reagensglasblanding,

(b) reagensglasblandingen inkuberes i tilstrækkelig lang tid til at aktivere lysatet,

(c) en prøveanordning bringes i kontakt med den aktiverede reagensglasblanding, idet prøveanordningen omfatter en bærermatrix, hvori der er inkorporeret et syntetisk peptidsubstrat indeholdende en chromogen eller fluorogen af-

fortsættes

DA 10330 D I

gående gruppe, der kan fraspaltes af det aktiverede lysat, og en anden puffer, der kan modstå en pH-ændring i pH-intervallet fra 8,0 til 8,9,

(d) den i kontakt bragte prøveanordning fjernes, og

(e) koncentrationen af den fraspaltede afgående gruppe bestemmes, er således udformet, at den omfatter

(a) en bærermatrix og

(b) en prøvesammensætning, der er inkorporeret i bærermatrixen, hvilken sammensætning omfatter hesteskokrabbe-amebocytlysate, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysatet, en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et pH-interval fra 7,5 til 8,5, samt en stabiliserende komponent, der kan stabilisere lysatet.

Ved en fremgangsmåde til fremstilling af enhedsprøveanordningen udføres følgende trin:

(a) en bærermatrix inkorporeres med en stabiliserende komponent, der kan stabilisere hesteskokrabbe-amebocytlysate,

(b) tørring og

(c) inkorporering af den tørrede matrix af en prøvesammensætning omfattende hesteskokrabbe-amebocytlysate, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysatet, og en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et pH-interval fra 7,5 til 8,5, og

(d) tørring.

Den foreliggende opfindelse angår en enhedsscreeningsanordning for gram-negativ bakteriuri samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

Udtrykket "gram-negativ bakteriuri" refererer til
5 urinvejsinfektioner af gram-negativ etiologi. Urinvejsinfektioner opdeles i fire kategorier på basis af symptomer, tilbagefald og komplikationsfaktorer. Akut ukompliceret gram-negativ bakteriuri kan forsvinde spontant, men efterfølges i reglen af vedvarende eller tilbagevendende bakteriuri, som kan kræve længere tids medikamentel terapi. De
10 tre andre kategorier af bakteriuri kan, hvis de ikke behandles, føre til nyreinfektion eller døden. Medens gram-negativ bakteriuri er almindelig udbredt og svækkende, kan de dermed forbundne symptomer være vanskelige at skelne,
15 idet de giver en type såkaldte asymptomatiske patienter.

Selv om man ved en dyrkning af en urinprøve kan påvise koncentrationer på 10^4 bakterier pr. ml prøve, en koncentration, der undertiden anvendes som grænsen for normalt indhold af gram-negative bakterier, er dyrkningsresultaterne ikke til
20 rådighed de første 18-24 timer. Påvisningen kræver trænet personale og er kostbar at opnå. Mikroskopisk undersøgelse er hurtigere, idet den kun kræver ca. 45 minutter, men undersøgelsen er kun følsom over for 10^5 bakterier pr. ml og kræver også anvendelse af øvet personale. Ingen af metoderne
25 kan betragtes som screeningsmetoder. En screeningsmetode, der er hurtig, bekvem og omkostningsvenlig, ville være særlig nyttig til afprøvning i stor skala af en befolkningsgruppe, såsom skolebørn eller militært personel.

"Limulus Amebocyte Lysate"-(LAL)-prøven er baseret
30 på anvendelsen af et lysat afledt fra et naturligt materiale ekstraheret fra en bestemt krabbearart. Det har for nylig vist sig, at lysatet indeholder proenzym og et naturligt substratkoagulogen. Lysatkaskaden aktiveres ved hjælp af endotoksin, en komponent i cellevæggen
35 hos gram-negative bakterier. Aktivering af kaskaden resulterer naturligt i dannelsen af en gel som afslutning.

En anordning, som består af et transparent rør, der indeholder reagenser til LAL-geleringsprøven, er blevet omtalt til bestemmelse af endotoksin i EP offentliggørelses-skrift nr. 0.121.868. En hvilken som helst væskeprøve kan
5 analyseres.

Forekomsten af endotoksin i urin har også været relateret til tilstedeværelsen af bakteriuri med instrumenter, som kan påvise den uklarhed, der er resultatet af aktiveringen af "Limulus Amebocyte Lysate"-enzymkaskaden ved hjælp
10 af endotoksin. Uklarhedsgraden efter aktiveringen af kaskaden ved hjælp af endotoksin måles og bringes i relation til tilstedeværelsen af bakteriuri. Påvisningsgrænsen anføres at være 10^5 bakterier pr. ml prøve. På grund af de høje omkostninger til det nødvendige apparatur kan denne frem-
15 gangsmåde imidlertid ikke betragtes som en screeningsmetode.

I den senere tid har man kunnet få syntetiske peptid-substrater indeholdende chromogene eller fluorogene grupper, som kan spaltes af det koagulationsenzym, der produceres, når LAL-kaskaden aktiveres ved hjælp af endotoksin. Der er
20 blevet omtalt en række forskellige syntetiske substrater, jfr. f.eks. GB patentskrift nr. 1.547.747 og US patentskrift nr. 4.188.264. I almindelighed har en sekvens på to aminosyrer, glycin-arginin, vist sig at være kritisk for spaltning af en chromogen eller fluorogen fraspaltelig gruppe ved
25 hjælp af koagulationsenzymet. Fraspaltelige afgangende grupper, såsom nitrophenyl, methylcoumarin-derivater, p-(N,N-diethyl-amino)anilin og indoxyl, er blevet omtalt. JP patentskrift nr. 56.42597 beskriver måling af endotoksin i en hvilken som helst legemsvæske, herunder urin, med et substrat, hvis
30 spaltningsprodukt kan reagere med 1-naphthol-2-sulfonsyre, så at der fremkommer en blå farve.

Chromogene eller fluorogene substrater har overvejende været anvendt ved prøver for endotoksin i intravenøse opløsninger og i blod. Målinger i blod har været relateret til

bakteriæmi (bakterieinfektion i blodet). Endotoksinbestemmelse i blod kompliceres af tilstedeværelsen af inhibitorer i LAL-kaskaden. De fleste patentskrifter og andre litteraturskilder drejer sig enten om eliminering af disse interfererende faktorer eller om nye syntetiske substrater, jfr. 5 f.eks. EP offentliggørelsesskrift nr. 0.080.649 rettet på fjernelsen af forstyrrende faktorer ved måling af endotoksin. Skriftet omtaler anvendelsen af den pågældende fremgangsmåde til fjernelse af forstyrrende faktorer ved bestemmelsen af 10 bakteriuri.

JP patentansøgning nr. 56.35994 angår et apparat til bestemmelse af endotoksin, hvilket apparat indeholder en del med en enzymprecursor, som er blevet adskilt fra lysatet, og en del med et optisk måleligt peptidsubstrat indesluttet 15 i en separat beholder.

En chromogen LAL-opløsningsbestemmelse er beskrevet af Nachum og Berzofsky i J. Clin. Microbiology 21, nr. 5, 759-763 (1985) til bestemmelse af mindst 10^5 gram-negative bakterieceller pr. milliliter til diagnosticering af gram- 20 negativ bakteriuri ved hjælp af M.A. Whittaker, Bioproducts', Walkeville, MD-sæt (QCL-1000). Ved bestemmelsen i henhold til den nævnte artikel fortyndes urinprøver inden bestemmelsen med pyrogenfrit vand; denne fortynding er påkrævet til undertrykkelse af urinens naturlige farve til undgåelse af 25 interferens ved afløsning af bestemmelsesresultatet.

Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der en enhedsscreenings- eller prøveanordning i fast form, der er følsom overfor en urinprøve med mindst 10^5 gram-negative bakterier pr. ml. Ikke blot er der ifølge opfindelsen til- 30 vejebragt en screeningsanordning, der kan anvendes til bestemmelse af et klinisk signifikant bakterieniveau til diagnosticering af urinvejsinfektioner, men analyseresultatet kan aflæses enten visuelt eller med instrumenter. Dette er betydningsfuldt, eftersom praktisk taget alle andre screeningsmetoder fordrer en eller anden type instrumentation, 35 idet resultaterne ikke kan aflæses visuelt.

Opfindelsen skal illustreres nærmere ved hjælp af tegningen, på hvilken

fig. 1 viser en grafisk fremstilling af data samlet ved hjælp af den her omhandlede reagensglas/prøveanordningsmetode. Prøveanordningen fremstilles med et chromogent LAL-substrat indeholdende 3-aminoindol som fraspaltelig gruppe og en farvestabiliserende polymer. Den grafiske fremstilling er en computer-afsætning af reflektionskoefficient (procent reflektans), %R, som funktion af bølgelængde, λ . Farveudviklingen i prøveanordningen overvåges hvert 45. sekund efter kontakt med en reagensglasblanding fremstillet med en negativ urinprøve fastsat til at indeholde 10^4 celler. E. coli pr. ml.

Den punkterede linie viser prøveanordningens reflektionskoefficient (reflektans) umiddelbart efter kontakt (tid = 0). De afbrudte linier viser reflektionskoefficienten 45 og 90 sekunder senere. De fuldt optrukne linier, som overlapper, viser reflektionskoefficienten mellem 135 og 225 sekunder. Reflektionskoefficienten i % fra anordningen aftager, efterhånden som farvemængden stiger. Fig. 1 viser, at der opnås stabil farve på 135 sekunder (ca. 2 minutter). Den grafiske fremstilling viser resultaterne fra pkt. 3, side 23-24.

Fig. 2 er en grafisk fremstilling, der viser reflektionskoefficientdata samlet med en enhedsanordning i fast form. Reflektionskoefficienten i procent ved 405 nm udtrykkes som K/S , hvor K er absorptionskoefficienten, og S er spredningskoefficienten. Beregningen af K/S ud fra %R foretages med Kubelka-Munk-ligningen. Værdien af K/S tiltager, efterhånden som farvemængden, der udvikles i anordningen, stiger. K/S er afsat som funktion af tiden (t) i sekunder. Efter inkubation af den kontaktede prøveanordning i 7 minutter ved 37°C følges reflektionskoefficienten ved 405 nm i 6 minutter. Enhedsprøveanordningen fremstilles ved forbehandling af papir med "Gantrez"[®] AN 119, der fås fra GAF Corp., New York, N.Y. og imprægnering af det forbehandlede papir

med lysat fra Associates of Cape Cod, puffer og et i handelen
værende p-nitroanilid-substrat. Strimlerne dyppes i bakterie-
-saltvandsopløsninger. De fuldt optrukne linier i fig. 2
viser resultaterne af blindforsøg; de afbrudte linier viser
5 10^5 E. coli pr. ml, og de punkterede linier viser 10^6 E.
coli pr. ml. Drastiske forøgelser af K/S eller farve udvises
af sådanne strimler, der er dyppet i de sidstnævnte prøver.
Fig. 2 viser, at enhedsprøveanordningen kan give resultater,
der skelner mellem negative prøver og dem, der indeholder
10 10^5 gram-negative bakterier. Den grafiske fremstilling viser
resultaterne fra pkt. 4, side 24-25.

Opfindelsen angår således en enhedsscreeningsanordning
for gram-negativ bakteriuri til bestemmelse af tilstedevæ-
relsen af mindst 10^5 gram-negative bakterier pr. ml af en
15 urinprøve under anvendelse af den nedenfor angivne frem-
gangsmåde samt en fremgangsmåde til fremstilling af den
omhandlede prøveanordning for gram-negativ bakteriuri.

Screeningsfremgangsmåden for gram-negative bakterier
til bestemmelse af tilstedeværelsen af mindst 10^4 gram-nega-
20 tive bakterieceller pr. ml af en urinprøve udføres ved, at

(a) en ufortyndet urinprøve, der skal afprøves, sættes
til et reagensglas indeholdende hesteskokrabe-amebocytlysat
og en første puffer, der kan holde pH indenfor pH-inter-
vallet fra 6,3 til 7,5, så at der dannes en reagensglasblan-
25 ding, hvori lysatkoncentrationen er mindst 3,5 mg pr. ml af
den dannede reagensglasblanding,

(b) reagensglasblandingen inkuberes i tilstrækkelig
lang tid til at aktivere lysatet,

(c) en prøveanordning bringes i kontakt med den ak-
30 tiverede reagensglasblanding, idet prøveanordningen omfatter
en bærermatrix, hvori der er inkorporeret et syntetisk pep-
tidssubstrat indeholdende en chromogen eller fluorogen af-
gående gruppe, der kan fraspaltes af det aktiverede lysat,
og en anden puffer, der kan holde pH indenfor pH-intervallet
35 fra 8,0 til 8,9,

(d) den i kontakt bragte prøveanordning fjernes, og
(e) koncentrationen af den fraspaltede afgående gruppe bestemmes.

Denne screeningsfremgangsmåde er bekvem, billig og
5 er tilstrækkelig følsom til påvisning af koncentrationer på 10^4 gram-negative bakterier pr. ml urinprøve, en koncentration, som anses for klinisk signifikant, men som ofte findes hos asymptomatiske patienter.

Enhedsscreeningsanordningen ifølge opfindelsen, der
10 er af den ovenfor angivne art, er ejendommelig ved, at den omfatter

(I) en bærermatrix og

(II) en prøvesammensætning, der er inkorporeret i
bærermatrixen, hvilken sammensætning omfatter hesteskokrabe-
15 amebocytlysat, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysatet, en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et pH-interval fra 7,5 til 8,5, samt en stabiliserende komponent, der kan stabilisere lysatet.

20 Denne screeningsanordning i fast form er særlig egnet til screening af store befolkningsgrupper og har en følsomhed svarende til dyrere, tidsrøvende anordninger, der findes på markedet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling
25 af den her omhandlede enhedsscreeningsanordning er ejendommelig ved, at den omfatter følgende trin:

(A) en bærermatrix inkorporeres med en stabiliserende komponent, der kan stabilisere hesteskokrabe-amebocytlysat,

(B) tørring og

30 (C) inkorporering i den tørrede matrix af en prøvesammensætning omfattende hesteskokrabe-amebocytlysat, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysatet, og en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et
35 pH-interval fra 7,5 til 8,5, og

(D) tørring.

Eftersom bakteriuri er så fremherskende hos befolkningen, er mange fremgangsmåder blevet udviklet for at påvise og diagnosticere dens forekomst. For øjeblikket findes der ingen screeningsmetode til bakteriuri, som er følsom over
5 for tilstedeværelsen af 10^4 gram-negative bakterier pr. ml ufortyndet urinprøve ved hjælp af LAL-kaskaden med et syntetisk substrat. Der findes heller ikke nogen enhedsprøveanordning i fast form, der er egnet til at påvise forekomsten af mindst 10^5 gram-negative bakterier pr. ml ufortyndet
10 urinprøve ved hjælp af LAL-kaskaden med et syntetisk substrat.

Prøven til påvisning af bakteriuri er baseret på den naturlige enzymkaskade, der forekommer i hestekrabbe-amebocytlysate. Hestekokkrabbe-amebocytlysate kan
15 fås fra Limulus- eller Tachypleus-arten af krabben. Limulus-arten er en vestlig hestekokkrabbeart, og Limuluslysate fås fra Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA. Dette er den foretrukne lysatekilde, eftersom den har vist sig at have en ensartet kvalitet og kan fås i koncentreret form, der kan anvendes i forbindelse med opfindelsen. Selv om man har ment, at lysate-kaskaden er for følsom over for tilstedeværelsen af endotoksin til at udgøre en anvendelig prøve for bakteriuri, tilvejebringer opfindelsen to systemer, der er omhyggeligt udformede til at give en positiv indikation af tilstedeværelsen af en tærskelkoncentration af gram-negative bakterier i en urinprøve, en koncentration, der anses for at være tegn på en infektion med gram-negative bakterier i urinvejene.

30 A. Normale endotoksinkoncentrationer i urin

For at kunne anvendes skal en screeningsmetode tilvejebringe en positiv indikation af en tærskelkoncentration af en analyt, der signalerer et muligt medicinsk problem, uden at give et uacceptabelt højt antal falske
35 positive prøver. Almindeligvis kræves en opfølgning efter et positivt resultat med en screeningsmetode. En

screeningsmetodes anvendelighed beror derfor på dens mulighed for at udgøre en hurtig, bekvem og billig fremgangsmåde til konstatering af, hvorvidt der må udføres mere kostbare prøver. Med hensyn til bakteriuri skal en vellykket screeningsmetode give en positiv indikation af en ønsket koncentration af gram-negative bakterier pr. ml urinprøve uden at give en falsk positiv indikation, når der blot forekommer en normal koncentration af sådanne bakterier.

10 Selvom både instrumentale uklarhedsmålinger og gram-farvning har en følsomhed på 10^5 celler pr. ml, mener nogle lægelige autoriteter, at påvisning af 10^4 celler pr. ml vil muliggøre udpegning af nogle asymptomatiske patienter eller patienter, hvis symptomer er vanskelige at
15 forbinde med bakteriuri. Disse patienter kunne hjælpes i de tidlige stadier af bakteriel infektion, men kan gå tabt med de for tiden til rådighed stående screeningsmetoder, såsom nitritreagensstrimler, der påviser forekomst af nitrat-reducerende bakterier (en klasse gram-negative bakterier)
20 eller leukocyt-reagensstrimler, som påviser leukocytter, der produceres af organismen på grund af en infektion.

Nachum og Berzofsky, J. Clin. Microbiology 21, nr. 5, 759-763 (1985) har vist, at normal urin kan indeholde op til 20 nanogram frit endotoksin pr. ml, en koncentration, der ville vise tilstedeværelsen af 10^3 gram-negative bakterier pr. ml. Resultater med geleringsprøven understøtter disse resultater. Denne baggrund påvirker hverken den her omhandlede reagensglas/prøveanordningsmetode eller enhedsprøveanordningssystemet. Reagensglas/prøveanordningsmetoden
30 udføres under sådanne betingelser, at den bliver ufølsom over for sådanne endotoksinniveauer, og enhedsprøveanordningen påviser ikke frit endotoksin.

B. Reagensglas/prøveanordningsmetoden

Der er som nævnt tilvejebragt en screeningsmetode
35 til bakteriuri, hvilken metode er følsom over for 10^4 gram-negative bakterier pr. ml ufortyndet urinprøve. Ved frem-

gangsmåden sættes den ufortyndede urinprøve til et reagensglas, der indeholder lysat og en første puffer, og der blandes og inkuberes i tilstrækkelig lang tid til at aktivere lysatet over for tilstedeværelsen af 10^4 gram-negative bakterieceller pr. ml prøve. Dannelsen af koagulationsenzymet ved hjælp af LAL-kaskaden efter kontakt med endotoksin omtales her som aktivering. En prøveanordning, der omfatter en bærematrix, hvori der er inkorporeret en anden puffer og et syntetisk peptidsubstrat, bringes i kontakt med den aktiverede reagensglasblanding. Prøveanordningen fjernes derpå, og anordningens påviselige respons konstateres. Syntetiske substrater, der indeholder fluorogene eller chromogene fraspaltelige grupper, kan anvendes. Imidlertid foretrækker man som påviseligt respons farve, eftersom resultatet af prøven derpå kan bestemmes enten visuelt eller instrumentelt ved hjælp af refleksionskoefficienten (reflektansen).

Ved at regulere lysatkonzentrationen, inkubationstiden og -temperaturen kan bestemmelsen gøres følsom overfor 10^4 gram-negative bakterier pr. ml urinprøve uden at påvise det normale baggrundsbakterieniveau på 10^3 . For at kunne opnå et meningsfuldt resultat for 10^4 celler, bør der anvendes en ren mellemstrøms-urinprøve.

1. Reagensglas

(a) Lysatet. Lysatet kan fås i lyophiliseret form fra Associates of Cape Cod. Lysatmængden i reagensglasset skal være stor nok til at give en koncentration på 3,5-7 mg lysat pr. ml dannet reagensglasblanding, efter at prøven er sat til reagensglasset.

(b) Divalent kation. Til aktivering af lysatkaskaden kræves en divalent kation. I handelen værende lysatpræparater indeholder calciumion som stabilisator i tilstrækkelig mængde til at aktivere lysatet. Eventuelt kan det være ønskeligt at tilsætte yderligere kation. Den divalente kation kan vælges blandt kationerne af calcium, magnesium, strontium og mangan; calciumkationen foretrækkes. Hvis der anvendes en kation-frit lysatpræparat, skal der tilføjes divalent

kation.

(c) Første puffer. Den første puffer skal kunne modstå en pH-ændring i pH-intervallet fra 6,3 til 7,5. Natrium- eller kaliumphosphat kan anvendes til at fremstille en foretrukken første puffer til aktiveringstrinnet. Valg af en sådan egnet første puffer ligger inden for fagmandens kunnen.

2. Prøveanordning til reagensglas/prøveanordningsmetoden

Prøveanordningen er sammensat af en bærermatrix, hvori der er inkorporeret et syntetisk peptidsubstrat indeholdende en chromogen eller fluorogen fraspaltelig gruppe, der kan fraspaltes ved hjælp af det aktiverede lysat, en puffer nr. 2, der kan modstå en pH-ændring i pH-intervallet fra 8,0 til 8,9, når den bringes i kontakt med reagensglasblandingen. Eventuelt kan der være inkorporeret en sur polymer, der kan stabilisere den fraspaltede gruppe og/eller en divalent kationgruppe.

(a) Bærermatrix. Bærermatrixen kan være et hvilket som helst stof, hvori der kan inkorporeres de nødvendige komponenter, når blot stoffet er i det væsentlige indifferent i forhold til disse komponenter, porøst og/eller absorberende med hensyn til urinprøven. Udtrykket "bærermatrix" refererer til enten sugende eller ikke-sugende matrixer, som er uopløselige i og opretholder deres strukturelle integritet, når de udsættes for vand eller andre fysiologiske væsker. En foretrukken bærermatrix er papir, i reglen filterpapir af høj kvalitet, såsom det, der fås fra Whatman®, Clifton, N.J.

Inkorporering kan ske ved en hvilken som helst metode, såsom neddykning, spredning eller sprøjtning, der tillader at substratet og den anden puffer inkorporeres i bærermatrixen. Dette kan ske ved at imprægnere en papirbærermatrix med en vandig opløsning, der indeholder substratet og den anden puffer, hvorefter den tørres. Tørring kan ske på en hvilken som helst måde, der ikke på skadelig måde påvirker den inkorporerede sammensætning, i reglen ved hjælp af en luftovn. Det tørrede papir kan derefter udskæres og monteres

på den ene ende af en understøtning, f.eks. en stiv eller halvstiv polystyrenfilmstrimmel. Når papiret skal monteres på polystyrenen, kan dette gøres ved hjælp af dobbeltsidigt adhæsivt tape, såsom det, der fås fra 3M Co., St. Paul, Minnesota. Understøtningen udgør et passende håndgreb, der letter anvendelse af prøven.

(b) Syntetisk substrat. Selv om dannelsen af det naturlige slutpunkt for kaskaden, gelering, har været anvendt til at påvise bakteriuri, kan kvantitative resultater derpå kun opnås ved hjælp af kostbart udstyr, der måler lysspredning. Omkostningerne ved dette udstyr gør de prøver, der for øjeblikket står til rådighed, uegnede til rutinescreening. Desuden er det blevet rapporteret, at lysspredningsmetoders følsomhed er 10^5 celler pr. ml.

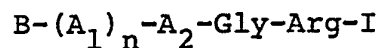
Det er mere ønskeligt at anvende et syntetisk substrat, som kan give et let skelneligt kolorimetrisk eller fluorimetrisk slutpunkt. På markedet findes en række chromogene eller fluorogene LAL-substrater til endotoksin-LAL-prøver, og de kan anvendes sammen ved den her beskrevne screeningsmetode.

Fluorogene substrater for LAL fås fra Peninsula Labs, Belmont, California, og indeholder N-methylcoumarin som fraspaltelig gruppe. Disse kan anvendes sammen med urinprøver, eftersom urins naturlige fluorescerende baggrund er for lav til at bevirke signifikant interferens med prøvens ønskede følsomhed.

Chromogene syntetiske substrater er særligt foretrukne, eftersom farve kan bestemmes enten med forholdsvis enkelt og billigt apparatur eller, hvad der er mere bekvemt, visuelt ved sammenligning med egnede farvekort, som udleveres til brugeren. De eneste chromogene substrater, der fås på markedet, indeholder p-nitroanilin som fraspaltelig gruppe, hvilket giver en gul farve, når den spaltes af det aktiverede lysat. Det har overraskende vist sig, til trods for det frembragte gule slutpunkt, at disse p-nitroanilin-holdige substrater kan anvendes med held til at opnå den ønskede

følsomhed med en urinprøve i reagensglas/prøveanordnings-systemet. Eftersom kliniske urinprøver imidlertid kan være stærkt farvede, f.eks. urin med høj massefylde, foretrækkes anvendelse af syntetiske substrater, der kan danne en anden
5 farve end gul.

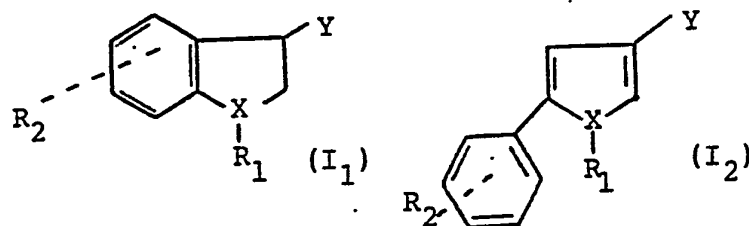
Egnede chromogene substrater har den almene formel



- 10 hvor n er tallet 0 eller 1,
 A_1 er valin eller leucin,
 A_2 er leucin eller serin,
 Gly er glycin,
 Arg er arginin,
 15 B er en blokerende gruppe for den endestillede aminogruppe, og
 I er en chromogen indikatorgruppe.

De blokerende grupper t-butyloxycarbonyl, acetyl, benzoyl eller tosyl er fortrukne, idet t-butyl-oxycarbonyl (tBOC) er særlig fortrukket. Der kan anvendes andre ækvivalente aminosyresekvenser, men i reglen foretrækkes sådanne, der har en glycin-arginin-sekvens, der støder op til den fraspaltelige afgående gruppe.

De foretrukne chromogene indikatorgrupper er
 25 sådanne, hvor I har en af formlerne I_1 og I_2



- hvor Y er en hydroxy- eller aminogruppe,
 X er svovl, nitrogen eller oxygen,
 R_1 er en lavere alkyl-, aryl-, amido- eller cyanogruppe, og

35

0

R_2 kan være en enkelt eller flere substituenter, der er ens eller forskellige, såsom hydrogen, lavere alkyl, aryl eller fortrinsvis elektron-fjernende grupper, såsom chlor og nitro.

5

Indikatorgruppen er bundet til arginin ved hjælp af Y, så at der dannes en amid- eller esterbinding, der kan spaltes ved indvirkning af det koagulationsenzym, der dannes sammen med aktivering af lysatet.

10

Lavere alkylgrupper er alkylgrupper med 1-4 carbonatomer. Omfattet af betydningen "lavere alkyl" er methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek.butyl og tert.butyl. Grupperne kan eventuelt være substituerede, forudsat, at substitueringerne ikke griber ind i den enzymatiske spaltning af amid- eller esterbindingen.

15

Udtrykket "aryl" har den normale betydning, der er velkendt for fagmænd inden for syntetisk organisk kemi, dvs. en organisk gruppe afledt fra et aromatisk carbonhydrid ved fjernelse af ét atom, f.eks. phenyl fra benzen.

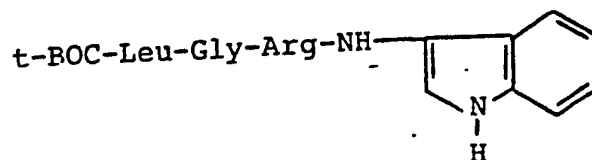
20

En sådan substituent kan eventuelt også være substitueret forudsat, at eventuelle substituentter ikke griber ind i den enzymatiske spaltning af ester- eller amidbindingen af koagulationsenzymet. Disse substrater er i reglen substrater for arginin-specifikke proteaser. Imidlertid er koncentrationen af sådanne proteaser i urin så lav, at den ikke griber ind i bakteriuriprøvens følsomhed.

25

Et særlig foretrukket chromogent substrat er

30



35

hvor indikatorgruppen I og bindingsgruppen Y danner 3-aminoindol.

Når 3-aminoindol-substratet anvendes, skal der inkorporeres en koblingskomponent i prøveanordningen for at få et kolorimetrisk respons. Egnede koblingskomponenter er diazonium-forbindelser, såsom 2-methoxy-4-morpholinobenzen-diazonium-chlorid, 2,4-dichlorbenzen-diazonium, 2,6-dichlorbenzen-diazonium, 5-chlor-2-methoxybenzen-diazonium ("Fast Red RC") og 2,3'-dimethylazobenzene-diazonium ("Fast garnet GBC"). Diazo-saltet 2-methoxy-4-morpholinobenzen-diazonium-chlorid (MMBD) foretrækkes. Prøveanordningen, der således fremstilles og anvendes, bliver lyserød, når urinprøven, der bringes i kontakt hermed, indeholder 10^4 bakterieceller pr. ml. En vinrød farve ses, når bakteriekoncentrationen er 10^6 celler pr. ml.

15 (c) Anden puffer. Den anden puffer skal kunne modstå en pH-ændring i pH-intervallet fra 8,0 til 8,9. En foretrukken puffer er tris(hydroxymethyl)aminomethan (almindelig kendt som TRIS).

20 (d) Sur polymer. For at opnå en farvestabil prøve ved hjælp af reagensglas/prøveanordningsmetoden kan en sur polymer, der kan stabilisere den fraspaltede afgående gruppe, inkorporeres i bærermatrixen. Egnede forbindelser omfatter forbindelser såsom methylvinylether og maleinsyre, der fås under varemærket "Gantrez"[®] hos GAF, New York, N.Y. Når man anvender det foretrukne 3-aminoindol-substrat med et diazoniumsalt i en papirbærer, der er forbehandlet med "Gantrez"[®], fås et purpurfarvet slutpunkt, som er stabilt i dagevis.

30 (e) Divalent kation. Der kan eventuelt inkorporeres yderligere divalent kation i bæreren. Lignende kationer som dem, der anvendes i lysat-aktiveringstrinnet, kan også anvendes på dette stadium. Calciumion foretrækkes.

(3) Anvendelse

35 En alikvot mængde af en ren, midtstrøms opfanget urinprøve kommes i reagensglasset, der indeholder en

0 første puffer og tilstrækkeligt lysat til at give en slut-
koncentration på fra 3,5 til 7 mg/ml dannet reagens-
glasblanding. Reagensglasblandingen inkuberes i tilstræk-
kelig tid til at aktivere lysatet, og prøveanordnin-
5 gen, der er inkorporeret som tidligere beskrevet, bringes
i kontakt med den inkuberede blanding. Den kontaktede
prøveanordning fjernes, og koncentrationen af den fraspal-
tede afgående gruppe bestemmes enten visuelt eller ved
hjælp af apparatur. Der anvendes normale sterile proce-
10 durer, men en forbehandling af prøven er unødvendig.

Den nødvendige aktiveringstid afhænger af den
prøvefølsomhed, der ønskes. En prøve, der er følsom over
for 10^4 bakterier pr. ml prøve, kræver længere inkuba-
tionstid end en prøve, der kun er følsom over for 10^5
15 bakterier. Imidlertid må aktiveringstiden ikke være så
lang, at der opstår følsomhed for baggrundsforurening.
Aktivering sker hurtigere ved forhøjede temperaturer end
ved stuetemperatur. Når der f.eks. anvendes et lysat, der fås
fra Associates of Cape Cod, er inkubation i 15 minutter
20 ved 37°C eller 45 minutter ved stuetemperatur (25°C) så-
ledes nødvendig til aktivering for at få en prøve, der
er følsom over for 10^4 E.coli pr. ml ufortyndet urin.
En prøve, der er følsom over for 10^5 celler pr. ml urin,
kan fås med en inkubationstid på 30 minutter ved 25°C .
25 Fastsættelsen af den tid og temperatur, der er nødvendig
for at opnå en ønsket følsomhed, ligger inden for en
fagmands kunnen under hensyn til det her anførte.

Koncentrationen af den fraspaltede afgående
gruppe kan bestemmes i løbet af 2-5 minutter, efter at
30 prøveanordningen er bragt i kontakt med den aktiverede
reagensglasblanding. Når der er inkorporeret 3-amino-
indol-substrat og diazoniumforbindelse i en bærer, der
ikke er forbehandlet med en stabilisator for den afgåen-
de 3-aminoindol-gruppe, kan den dannede farve stabilise-
35 res ved at dyppe den omsatte prøveanordning i en 25%
(volumen) eddikesyreopløsning.

Reagensglas/prøveanordningssystemet giver en prøve med større følsomhed over for tilstedeværelsen af gram-negative bakterier i en urinprøve end hidtil rapporteret for prøver, der findes på markedet. Desuden kan 5 prøven udføres på mindre end én time, selv om der anvendes inkubation ved stuetemperatur.

B. Enhedsprøveanordning i fast form

Der kan fremstilles en enhedsprøveanordning med et syntetisk substrat til LAL-prøven, som giver samme 10 følsomhed over for bakteriuri (10^5 celler pr. ml urin) som de fremgangsmåder, der for tiden er tilgængelige under anvendelse af LAL-geleringsprøven, og som kræver kostbart udstyr. Enhedsprøveanordningen er sammensat af en bærermatrix, hvori der er inkorporeret en prøvesammensætning 15 bestående af lysat, en divalent kation, et syntetisk substrat, en pufferkomponent og en lysat-stabiliserende komponent. Enhedsprøveanordningssystemet udgør en hurtig, bekvem og billig prøve, der er særlig egnet til screening af store befolkningsgrupper.

20 Bærermatrixen kan være en hvilken som helst af de tidligere beskrevne, når den blot kan rumme tilstrækkelige reagenser, især lysat, til at give en prøve med den ønskede følsomhed. Sugende matrixer, især papir, foretrækkes. Inkorporering i og tørring af matrixen kan 25 ske på en hvilken som helst af de tidligere beskrevne måder. En lysatkoncentration i inkorporationsopløsningen på ca. 15 mg/ml foretrækkes. Et særligt interessant aspekt ved en enhedsprøveanordning, i hvilken der anvendes en papirmatrix, er, at den ikke reagerer på tilstedeværelsen af frit endotoksin, men er følsom over for 30 tilstedeværelse af 10^5 gram-negative bakterier pr. ml urin. Denne anomali understreger vanskeligheden ved at overføre de endotoksin-prøvesystemer, der for øjeblikket står til rådighed, til et enhedsprøveanordningssystem i 35 fast form.

0

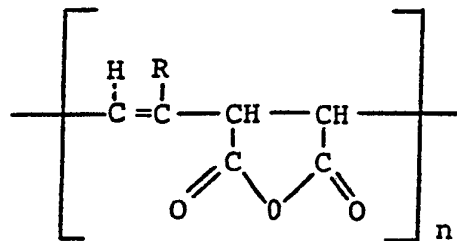
Lysatet, divalent kation og syntetiske substrater er tidligere blevet beskrevet. Foretrukne syntetiske substrater er de på markedet værende, der tidligere er blevet omtalt, med p-nitroanilin som afgående gruppe.

5 For at opnå en enhedsprøveanordning inkorporeres en pufferkomponent, der kan modstå en pH-ændring i pH-området fra pH 7,5 til pH 8,5, fortrinsvis 7,5-8,0. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan er en foretrukken pufferkomponent.

10

Foruden de ovenfor omtalte prøvekomponenter, når alle de komponenter, der er nødvendige for en chromogen LAL-prøve, er inkorporeret i en bærermatrix, såsom papir, er det nødvendigt at tilføje et stabiliseringsmiddel, som stabiliserer proenzymene i lysatet. Denne stabiliseringskomponent kan være en neutral eller negativt ladet polymer og kan vælges blandt gelatine-interpolymere af methylvinylether og maleinsyreanhydrid eller polymere af ethylenglycol og isooctylphenylether. Interpolymerene kan gengives ved formlen

20



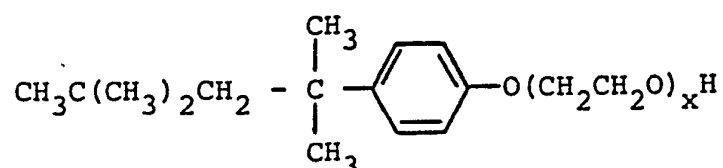
25

hvor R er C₁₋₁₈-alkyl, ether, acetat eller benzyl, og n er et helt tal fra 2 til det samlede antal gentagelsesenheder i polymeren.

30

En foretrukken interpolymer er poly(methylvinylethoxymaleinsyreanhydrid), der fås fra GAF, New York, N.Y., under navnet "Gantrez" [®]. Polyethylenglycol-p-isooctylphenylether kan gengives ved formlen

35



En foretrukken polyethylenglycol-p-isooctylphenylether fås under navnet "Triton"[®] X-100 fra Rohm & Haas, Philadelphia, PA. Den stabiliserende komponent inkorporeres fortrinsvis i papirmatrixen før inkorporering af lysatet.

Ved brug dyppes enhedsprøveanordningen i en ufortyndet urinprøve. Enhedsanordningen inkuberes derpå ved 37°C i et lukket kammer i 15-20 minutter, fortrinsvis med en negativ kontrol. Som tidligere anført kan inkubationens varighed og temperatur varieres. Imidlertid foretrækkes en temperatur på 37°C frem for en lavere temperatur, f.eks. 25°C. En hvilken som helst farvegrad, der er højere end kontrollens, viser, at prøven er positiv. Farve kan stabiliseres med henblik på senere aflæsning ved at dyppe strimlen i 25 eller 50% (volumen) eddikesyre. Der anvendes normale sterile procedurer, men der kræves ingen forbehandling af prøven. Prøven bør være en ren, midtstrøms opfanget urinprøve. Enhedsprøveanordningen reagerer ikke på frit endotoksin i en vandig opløsning, selv om den fungerer således, at den kan skelne tilstedeværelsen af 10⁵ bakterier fra en negativ prøve.

De følgende eksempler beskriver udførte forsøg, hvoraf pkt. 4 illustrerer opfindelsen.

25

30

35

0

Der anvendes følgende forkortelser:

t-BOC tert.butylloxycarbonyl

DMF dimethylformamid

Arg arginin

Leu leucin

5

Gly glycin

L- venstredrejende

MS massespektrometri

FAB hurtigt atombombardement
(ved MS)

10

$[\alpha]_D^{22}$ optisk rotation ved 22°C
ved en bølgelængde for D-
linien for natrium på 5898 Å

CBz carbobenzyloxy

15

1. Fremstilling af standardpræparater

E. coli-skråkulturer fås fra Quality Assurance Department i Ames Division, Miles Laboratories, Inc. 10 ml næringsvæske inokuleres med E.coli og inkuberes ved 37°C i 16-18 timer. Denne vækstperiode giver i reglen 10^{10} E.coli pr. ml næringsvæske. Den faktiske E.coli-koncentration bestemmes ved at fortynde næringsvæsken 7 og 8 gange og udstryge 100 µliter af hver fortynding på blodagarplader. Eftersom hver organisme kun producerer én koloni, fås antallet af organismer i 100 µliter fortynding ved at tælle de kolonier, der viser sig på agaren efter inkubation natten over ved 37°C.

20

Den mængdebestemte næringsvæske anvendes til at fremstille passende E.coli-fortyndinger til LAL-prøven og anvendes inden for én uge. Denne metode sikrer en ensartet mængde frit endotoksin i næringsvæsken mod at spredes under vækst og/eller celledød.

25

2. Fremstilling af foretrukket chromogent substrat

Alle de aminosyrer, der anvendes ved syntesen, har venstredrejende konfiguration.

30

35

0

3-Aminoindol (I)

En rundbundet kolbe på 250 ml udstyret med en kondensator, et tørrerør og en yderligere tilsætnings-
tragt skylles med argon i 15 minutter. Derpå anbringes
1,3 g (57 mmol) natrium, der er frisk skåret i små styk-
ker, og 10 μ liter vandfri ethanol i den rundbundede kolbe
efterfulgt af tildrypning af 9 ml vandfri ethanol. Når
tilsætningen af vandfri ethanol er afsluttet, og reak-
tionsblandingsens milde tilbagesvaling er aftaget, opvar-
mes reaktionsblandingen til mild tilbagesvaling i 15 mi-
nutter. Derpå fjernes varmekilden, og der tilsættes 5 g
(45 mmol) indol. Reaktionsblandingen omrøres, indtil al
indol er opløst. Der tildryppes 12 ml isoamylnitrit (89
mmol), som er tørret med vandfrit kaliumcarbonat før brug,
i løbet af et tidsrum på 30 minutter. Reaktionsblandin-
gen omrøres ved stuetemperatur under argon natten over.

15

Reaktionsblandingen inddampes for at fjerne
alkohol, og der tilsættes 100 ml destilleret vand. Den
opnåede blanding opvarmes til kogning. Under argon til-
dryppes en opløsning af 30 g (540 mmol) kaliumhydroxid
og 23 g (132 mmol) natriumdithionit i 125 ml destille-
ret vand. Der begynder at fraskilles et mørkegrønt fast
stof, og opløsningen får en lysere farve og bliver til
sidst gul. Efter tilsætningen af kaliumhydroxid/natri-
umdithionit-opløsningen tilsættes 100 ml destilleret vand,
og reaktionsblandingen opvarmes til kogning i 10 minut-
ter. Det mørkegrønne faste stof filtreres fra den var-
me opløsning under argon. Gule krystaller i pladeform
skilles ud fra det gule filtrat ved afkøling under ar-
gon. De gule krystaller opsamles og omkrystalliseres fra
varmt vand, hvilket giver 2,7 g lysbeige krystaller, I
(udbytte 48%), smeltepunkt 120°C (bliver mørke), MS(FAB,
 $M^+ = 132$, 100%).

20

25

30

35

0

t-BOC-L-Leu-Gly (II)

En opløsning af 5 g (20 mmol) t-BOC-L-Leucin og 2,3 g (20 mmol) N-hydroxysuccinimid i 25 ml vandfri dimethylformamid afkøles under argon i isbad.

5

Der tilsættes 4,5 g (22 mmol) dicyclohexylcarbodiimid, og reaktionsblandingen omrøres i isbad i 3 timer. Der tilsættes en opløsning af 1,5 g (20 mmol) glycin og 3,4 g (400 mmol) natriumbicarbonat i 48 ml destilleret vand, og den opnåede blanding får lov at varme

10

langsomt op til stuetemperatur og omrøres natten over. Det hvide faste stof udskilles og filtreres fra, og filtratet justeres til pH 3 med 6N saltsyre. Derpå ekstraheres opløsningen to gange med ethylacetat. Ethylacetat-ekstrakten tørres over vandfrit magnesiumsulfat og ind-

15

dampes først på roterende fordamper og derpå under højt vakuum. Inddampningen giver 8 g olieremanens. Efter lynchromatografi ved hjælp af 170 g silicagel og $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH} = 80:20:2$ efter volumen som elueringsopløsningsmiddel fås 2,73 g hvidt fast stof, der er t-BOC-L-

20

-Leu-Gly-ammoniums salt. Ca. 2,3 g af ammoniums saltet opløses i 20 ml destilleret vand, og opløsningen indstilles på pH 3 med 6N saltsyre. Den frie syre ekstraheres to gange med ethylacetat (ialt 100 ml). Ethylacetatopløsningen tørres over magnesiumsulfat, indampes og giver 2,1 g hvidt fast stof, II, smp. 116-117,5°C, MS (FAB, $M + 1 = 289$), $[\alpha]_D^{22} = -28,2^\circ$ ($C = 1,15$, CH_3OH).

25

Analyse: Beregnet for $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$:

C 54,15, H 8,39, N 9,71.

Fundet: C 54,26, H 8,37, N 9,62.

30

 N_α -CBz- N_ω -nitro-L-Arg-3-indolyamid (III)

Under argon afkøles en opløsning af 13,4 g (37,8 mmol) N_α -CBz- N_ω -nitro-L-arginin og 5,3 ml (37,8 mmol) triethylamin i 82 ml vandfri dimethylformamid til -20°C i et methanol/tøris-bad. Der tilsættes 5 ml (37,8 mmol) isobutylchlorformiat, og reaktionsblandingen omrø-

35

0 res ved -20°C i 45 minutter. Derpå tilsættes 2,80 g (21,2
 mmol) 3-aminoindol, og den opnåede blanding får lov at
 varme langsomt op til stuetemperatur og omrøres natten
 over. Der sættes destilleret vand til reaktionsblandin-
 5 gen, og der tilsættes 5%'s natriumbicarbonat, indtil pH
 9 er nået. Derpå ekstraheres opløsningen to gange med
 ethylacetat (250 ml). Ethylacetatekstrakten tørres over
 vandfrit magnesiumsulfat og inddampes, hvilket giver en
 lys brunliggrøn olieremanens. Olien underkastes lynchro-
 10 matografi med 170 g silicagel og $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH} = 95:5$ ef-
 ter volumen som elueringsopløsningsmiddel. Omkrystalli-
 sation fra $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ giver som udbytte 5,18 g (53%)
 hvide krystaller, III, smeltepunkt $202-203^{\circ}\text{C}$, MS (FAB,
 $M + 1 = 468$), $[\alpha]_D^{22} = +13,1$ ($C = 1,08$, DMF).
 15 Analyse: Beregnet for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_5$:
 C 56,52, H 5,39, N 20,97.
 Fundet: C 56,32, H 5,40, N 20,77.

L-Arg-3-indolyamid . 2HOAc (IV)

20 0,93 g (20 mmol) $\text{N}_\alpha\text{-CBz-N}_\omega\text{-nitro-L-Arg-3-indo-}$
 lylamid opløses i 25 ml vandfri ethanol og 25 ml iseddi-
 ke under forsigtig opvarmning, hvilket giver en lysegul
 opløsning. Derpå tilsættes 500 mg 10%'s palladium på
 carbon (Pd/C), og blandingen hydrogeneres under $3,52$
 25 kg/cm^2 hydrogengas i 15 timer. Blandingen filtreres,
 og filtratet inddampes, hvilket giver en lysegrøn olie-
 remanens. Efter lynchromatografi med 63 g silicagel
 og $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH} = 1:1$ efter volumen som elueringsopløs-
 ningsmiddel fås 300 mg lysebrunt fast stof som anført i
 30 overskriften. Udbytte 37%, MS (FAB, $M + 1 = 289$).
 Analyse: Beregnet for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O} \cdot 2\text{HOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:
 C 46,75, H 7,41, N 18,17
 Fundet: C 46,73, H 7,12, N 17,93.

0

t-BOC-L-Leu-Gly-L-Arg-3-indolyamid (V)

Under argon afkøles en opløsning af 158 mg (0,55 mmol) t-BOC-L-Leu-glycin og 0,077 ml triethylamin (0,55 mmol) i 1,6 ml vandfri dimethylformamid til -20°C i et methanol/tøris-bad. Der tilsættes 0,070 ml (0,55 mmol) isobutylchlorformiat, og den opnåede reaktionsblanding omrøres ved -20°C i 25 minutter. Der tilsættes en opløsning af 200 mg (0,49 mmol) L-Arg-3-indolyamid.2HOAc og 0,070 ml (0,49 mmol) triethylamin i 1,1 ml vandfrit dimethylformamid, og den fremkomne reaktionsblanding får lov at varme langsomt op til stuetemperatur og omrøres natten over. Der sættes destilleret vand til reaktionsblandingen, og opløsningen justeres til pH 7,2 med 5%'s natriumhydroxid. Opløsningen inddampes derpå, hvilket giver en olieremanens, som efter lynchromatografi ved hjælp af $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH} = 80:20:5$ efter volumen som elueringsopløsningsmiddel omkrystalliseres fra $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, hvilket giver 200 mg hvidt fast stof som nævnt i overskriften, udbytte 67%, smeltepunkt 125°C (blødgøres), MS(FAB, $M + 1 = 559$), $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -25,2^{\circ}$ ($C = 1,06, \text{CH}_3\text{OH}$); højt resolutionsmassespektrum (positiv ion-måde):

15

Beregnet for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_5 + 1 = 559,33559$
 Fundet: $= 559,33563$.

25 3. Reagensglas/prøveanordningssystem

Et reagensglas, der er egnet til brug ved reagensglas/prøveanordningsmetoden med 100 mikroliter urinprøve fremstilles ved at sætte 50 μ liter 100 mM phosphatpuffer og 1,7 mg lysat, der fås fra Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA, til reagensglasset. "Whatman[®]" 31 ET-papir dyppes i en 2%'s (w/w) vandig opløsning af "Gantrez[®]" AN-119, der fås fra GAF, New York, N.Y., pufret mellem pH 8 og 9 med tris(hydroxymethyl)aminomethan. Derpå tørres papiret i en luftovn ved 50°C i 10 minutter. Det tørrede forbehandlede papir dyppes i en opløsning,

0 pufret til pH 8,7, indeholdende 10 mM calciumion, 1 mM indolsubstrat (V) og 0,24 mM 2-methoxy-4-morpholino-benzen-diazoniumchlorid. Det dobbelt præparerede papir tørres igen ved 50°C.

5 En 100 µliter alikvot mængde af en rent optaget urinprøve anbringes i reagensglasset, og reagensglasblandingen, der dannes, inkuberes ved 37°C i 15 minutter. Prøveanordningen, der dannes ved at fikseret et stykke af det dobbelt tørrede og imprægnerede papir på
10 en plastunderstøtning som håndgreb, dyppes i den inkuberede reagensglasblanding og fjernes. To minutter efter kontakt med blandingen aflæses farveudviklingen i den reagerede prøveanordning. Resultaterne er vist grafisk i fig. 1. Systemet kan påvise 10^4 celler pr. ml.
15 Prøveanordningen antager mørkere nuancer purpurrødt, efterhånden som E.coli-koncentrationen forøges til 10^6 celler pr. ml. Farveudviklingen ophører hovedsagelig efter ca. 2 minutter. Sammenlignelige resultater opnås, når reagensglasblandingen inkuberes ved 25°C (stuetemperatur) i 45 minutter. Der opnås sammenlignelig følsomhed (10^4) med Eaton og Dikeman[®] 205-papir som bærer.

4. Enhedsprøveanordning i fast form

En enhedsprøveanordning i fast form, der er følsom over for tilstedeværelsen af mindst 10^5 celler
25 pr. ml urin, fremstilles på følgende måde. Eaton og Dikeman[®] 205-papir dyppes i en 2% opløsning af "Gantrez"[®] AN 119 fra GAF, New York, N.Y. justeret til pH ca. 7,5 med natriumhydroxid. Det forbehandlede papir tørres ved 50°C i mindst 10 minutter. Der fremstilles en lysatopløsning ved at rekonstituere lysat ("Pyrotell"[®] fra
30 Associates of Cape Cod) i en vandig opløsning pufret til ca. pH 7,8 med 50 mM Tris-puffer. Opløsningen indeholder også ca. 1,1 mM "Spectrozyme"[®] LAL-substrat fra American Diagnostica, Greenwich, CT. "Spectroenzyme"[®] er
35 et tripeptid med p-nitroanilin som afgående gruppe (a-

0

cetyl-D-hexahydrotyrosin-glycin-arginin-p-nitroanilin).
"Pyrotell[®]"-tilberedningen indeholder calciumion og andre stabilisatorer.

5 Det tørrede forbehandlede papir dyppes i lysatopløsningen og tørres igen ved 50°C i ca. 10 minutter. Det dobbelt tørrede og imprægnerede papir skæres i rektangulære små stykker og fikseres på en polystyren-understøtning med dobbeltsidigt klæbestof. Anordningen bringes i kontakt med en urinprøve, fjernes og inkuberes ved 37°C i ca. 15 minutter, og der aflæses en refleksionskoefficient. Resultaterne, der ses i fig. 2, viser enhedsprøveanordningens evne til at skelne 10⁵ celler pr. ml fra en negativ prøve. Lignende resultater er opnået med "Mallinkrodt[®]"-substrat i "Color Lysate Chemistry"-sættet.
15

Eksperimentelle forsøg på at anvende prøveanordningen med opløsninger, der kun indeholder frit endotoksin, viser, at enhedsprøveanordningen ikke er følsom over for frit endotoksin.

20

25

30

35

P A T E N T K R A V.

1. Enhedsscreeningsanordning for gram-negativ bakteriuri til bestemmelse af tilstedeværelsen af mindst 10^5 gram-negative bakterier pr. ml af en urinprøve under anvendelse af en fremgangsmåde, ved hvilken

(a) en ufortyndet urinprøve, der skal afprøves, sættes til et reagensglas indeholdende hesteskokrabe-amebocytlysat og en første puffer, der kan holde pH indenfor pH-intervallet fra 6,3 til 7,5, så at der dannes en reagensglasblanding, hvori lysatkoncentrationen er mindst 3,5 mg pr. ml af den dannede reagensglasblanding,

(b) reagensglasblandingen inkuberes i tilstrækkelig lang tid til at aktivere lysatet,

(c) en prøveanordning bringes i kontakt med den aktiverede reagensglasblanding, idet prøveanordningen omfatter en bærermatrix, hvori der er inkorporeret et syntetisk peptidsubstrat indeholdende en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af det aktiverede lysat, og en anden puffer, der kan modstå en pH-ændring i pH-intervallet fra 8,0 til 8,9,

(d) den i kontakt bragte prøveanordning fjernes, og

(e) koncentrationen af den fraspaltede afgående gruppe bestemmes,

k e n d e t e g n e t ved, at anordningen omfatter

(I) en bærermatrix og

(II) en prøvesammensætning, der er inkorporeret i bærermatrixen, hvilken sammensætning omfatter hesteskokrabe-amebocytlysat, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysatet, en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et pH-interval fra 7,5 til 8,5, samt en stabiliserende komponent, der kan stabilisere lysatet.

2. Enhedsscreeningsanordning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den stabiliserende komponent er valgt blandt gelatine, interpolymere af methylvinylether og maleinsyreanhydrid og polyethylenglycol-p-isooctylphenyl-

ether.

3. Enhedsscreeningsanordning ifølge et hvilket som helst af kravene 1 og 2, k e n d e t e g n e t ved, at den chromogene afgående gruppe er p-nitroanilin.

5 4. Fremgangsmåde til fremstilling af en enhedsscreeningsanordning for gram-negativ bakteriuri ifølge krav 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter følgende trin:

(A) en bærermatrix inkorporeres med en stabiliserende komponent, der kan stabilisere hesteskokrabe-amebocytlysat,

10 (B) tørring og

(C) inkorporering af den tørrede matrix med en prøvesammensætning omfattende hesteskokrabe-amebocytlysat, en divalent kation, et syntetisk peptidsubstrat med en chromogen eller fluorogen afgående gruppe, der kan fraspaltes af lysa-

15 tet, og en pufferkomponent, der kan holde pH indenfor et pH-interval fra 7,5 til 8,5, og

(D) tørring.

FIG. I REAGENSGLAS/PRØVEANORDNINGSSYSTEM

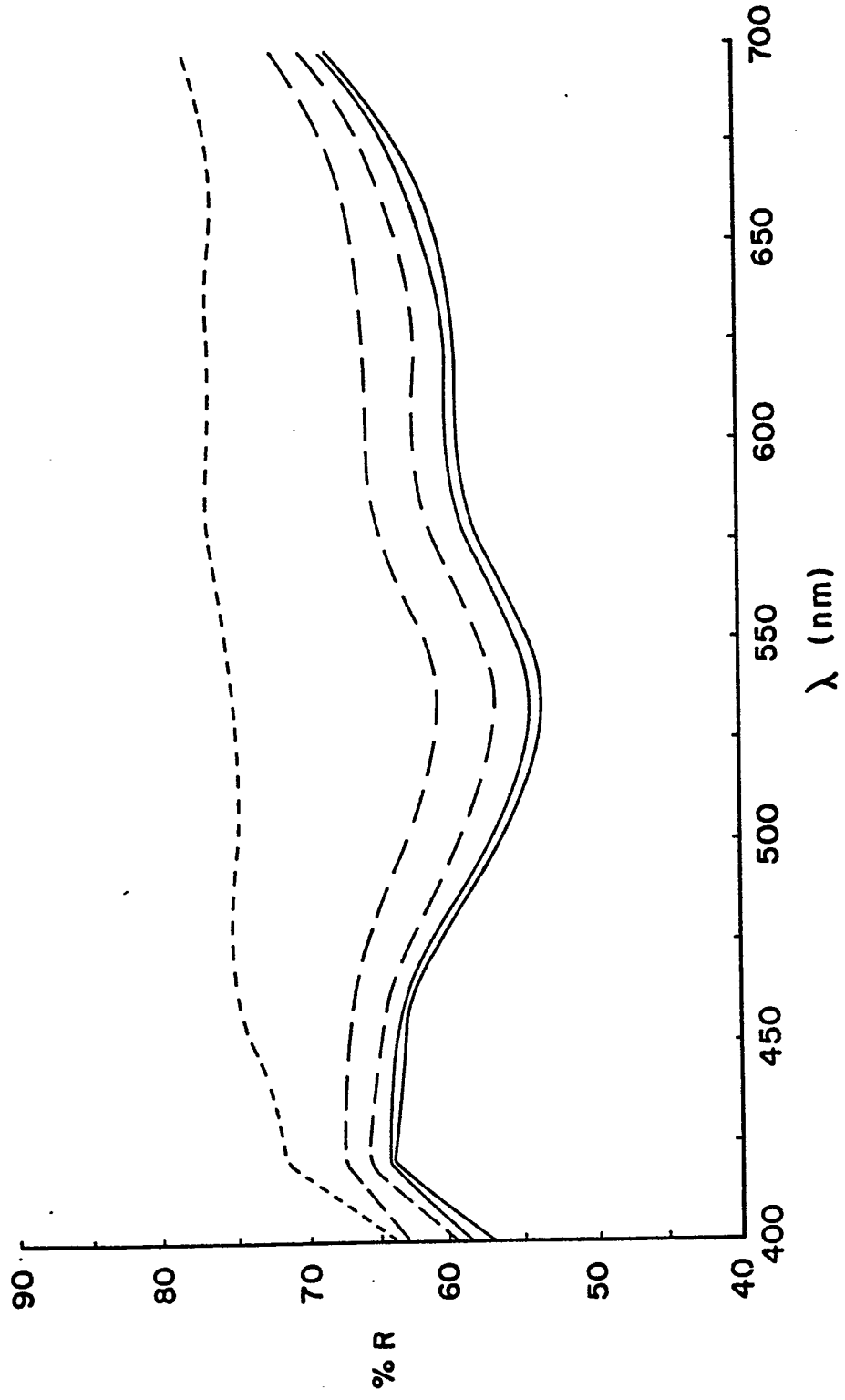


FIG. 2 ENHEDSPRØVEANORDNING I FAST FORM, REFLEKTIONSGRAD

