



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 236 114 A1

4(51) C 12 Q 1/04  
C 12 Q 1/36

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

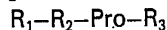
In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                       |      |          |      |          |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|
| (21) | WP C 12 Q / 274 982 2 | (22) | 09.04.85 | (44) | 28.05.86 |
|------|-----------------------|------|----------|------|----------|

|      |                                                                                                                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (71) | Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, 4020 Halle, Universitätsplatz 10, DD                                                                          |
| (72) | Fischer, Gunter, Dr. Dipl.-Chem.; Küllertz, Gerhard, Dr. Dipl.-Biochem.; Küllertz, Gabriele, Dr. Dipl.-Biochem.; Barth, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD |

## (54) Verfahren zur Bestimmung von Bakterieninfektion in Liquores

(57) Das erfindungsgemäße Verfahren wird in medizinischen und biologischen Laboratorien angewendet. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur Bestimmung von Bakterieninfektionen in Liquores. Aufgabe der Erfindung ist, solche Enzymsubstrate zur Verfügung zu stellen, die bei Inkubation mit Bakterien infiziertem Liquor oder daraus isolierten Bakterien unter geeigneten Bedingungen durch die Proteasewirkung dieser Bakterien einen chromophoren Rest freisetzen und dadurch den Nachweis der bakteriellen Infektion ermöglichen. Erfindungsgemäß werden chromophore Enzymsubstrate verwendet, die der allgemeinen Formel entsprechen.



In der Formel bedeutet  $R_2$  eine L-Aminosäuregruppe,  $R_1$  steht für H oder einen  $\alpha$ -Aminosäure- bzw. Peptidylrest oder für eine in der Peptidchemie übliche oder davon abgeleitete Stickstoffschutzgruppe.  $R_3$  ist angegeben für ein Amin, welches substituiert sein kann, aber so beschaffen ist, daß es durch die Wirkung der Enzyme Dipeptidyl-Peptidase IV (EC Nr.: 3.4.14.-) oder Prolin-Spezifische-Endopeptidase (EC Nr.: 3.4.21.-) auf das jeweils spezifische Substrat durch die Hydrolyse der Prolyl-Amid-Bindung freigesetzt werden kann.

**Erfindungsanspruch:**

Verfahren zur Bestimmung von Bakterieninfektionen in Liquores, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Liquorproben oder aus Liquorproben isolierte Bakterienkulturen mit spezifischen Enzymsubstraten der allgemeinen Formel



behandelt werden, wobei  $R_1$  für H, einen Aminosäurerest, für einen Peptidylrest oder für eine in der Peptidchemie übliche oder davon abgeleitete Aminoschutzgruppe,  $R_2$  für einen L-Aminosäurerest und  $R_3$  für ein Amin, das so beschaffen ist, daß es durch die Wirkung der Enzyme Dipeptidyl-peptidase IV (EC Nr.: 3.4.14.-) oder Prolin-Spezifische Endopeptidase (EC Nr.: 3.4.21.-) abgespalten wird, steht.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Bakterieninfektionen in Liquorproben, wie sie zum Beispiel in der Laboratoriumsdiagnostik anfallen. Der Nachweis einer Bakterieninfektion in Liquorproben kann diagnostische Bedeutung haben, wie beispielsweise zur Diagnostik einer bakteriellen Meningitis.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

Einfach zu handhabende und genügend empfindliche Methoden sind zur Bestimmung von Bakterieninfektionen in Liquorproben für diagnostische Zwecke sehr nützlich.

Bakterieninfektionen in Liquores werden durch mikroskopische Untersuchungen nach Anwendung verschiedener Färbeverfahren und durch die üblichen mikrobiologischen Anzuchtverfahren nachgewiesen (Lit.: Deutsches Arzneimittelbuch, 7. Ausgabe, Diagnostische Laboratoriumsmethoden, Berlin 1978).

Der mikroskopische Nachweis gelingt gewöhnlich gut bei hohen Bakterienkonzentrationen in Liquores. Der mikrobiologische Test gestattet den Nachweis von lebenden auf speziellen Kulturmedien wachsenden aus Liquorproben angezüchtete Bakterien innerhalb mehrerer Stunden. Bei einigen Liquorproben kann dieser mikrobiologische Nachweis 48 Stunden und länger dauern.

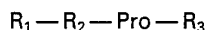
**Ziel der Erfindung**

Ziel der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur schnellen Bestimmung von Bakterieninfektionen in Liquores

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, solche Enzymsubstrate bereitzustellen, die es ermöglichen, durch Inkubation mit bakteriell infizierten Liquorproben oder durch Inkubation mit in Kulturmedien angezüchteten, aus Liquorproben isolierten Bakterienkulturen, durch die spezifische Proteasewirkung beziehungsweise Peptidasewirkung, durch Liquorproben von nicht mit Bakterien infizierten Liquorproben zu unterscheiden.

Erfindungsgemäß werden spezifische Enzymsubstrate der allgemeinen Formel



verwendet.

In der Formel bedeuten  $R_1$  ein Proton oder einen  $\alpha$  - Aminosäure- bzw. Peptidylrest, oder einen anderen Rest, der in der Peptidchemie eine übliche oder davon abgeleitete Stickstoffschutzgruppe darstellt.  $R_2$  steht für eine  $\alpha$  - Aminosäuregruppe,  $R_3$  wird angegeben, für ein solches Amin, welches durch die Enzyme Dipeptidyl-Peptidase IV (EC Nr.: 3.4.14.-) oder Prolin-Spezifische-Endopeptidase (EC Nr.: 3.4.21.-) durch eine enzymatische Hydrolyse des jeweils spezifischen Substrates durch Spaltung der Peptidbindung zwischen Prolin und dem Amin, welches auch substituiert sein kann, freigesetzt wird.

Bei der Einwirkung der Enzyme Dipeptidyl-Peptidase IV beziehungsweise Prolin-Spezifische-Endopeptidase auf das Substratgemisch unter solchen äußeren Bedingungen, wie sie zur Bestimmung beider Enzyme in einem Testansatz typisch sind, wird ein substituiertes aromatisches Amin freigesetzt, dessen spektrale Charakteristik im Vergleich zum Substrat verschoben ist. Der Verlauf der Substratspaltung läßt sich mit den üblichen spektralphotometrischen Methoden verfolgen. Bei Anwendung von fluorogenen Aminen, wie zum Beispiel  $\beta$ -Naphthylamin oder Cumarin läßt sich die Hydrolyse auch fluorimetrisch bestimmen. Durch den Einsatz geeigneter Amine, die besonders langwellige UV-VIS - Absorptionsbanden aufweisen, läßt sich die Hydrolyse auch visuell als Schwellenwert erfassen. Die Erfassung mittels Schwellenwert kann auch durch die Verwendung fluorogener Amine für  $R_3$  erfolgen, wenn zum Nachweis eine geeignete Lichtquelle, wie zum Beispiel eine UV-Lampe mit geeignetem Filter verwendet wird.

Die enzymatische Freisetzung des Amins  $R_3$  kann ebenfalls dadurch bestimmt werden, daß das Amin entsprechend den üblichen Proteasenachweisprinzipien mit einer zweiten chemischen Verbindung gekuppelt wird, wie dies zum Beispiel im Sinne einer Azokupplung mit p-Methoxynaphthylamin als  $R_3$  und Fast-Blue-B als Kupplungsreagenz möglich ist.

Die Enzymsubstrate der allgemeinen Formel können in einem saugfähigen Träger, einer Filmschicht, einer Pulvermischung, einem Lyophilisat, einer Lösung oder einer Reagenztablette enthalten sind.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Mittels werden z. B. saugfähige Träger, vorzugsweise Filterpapier, Cellulose oder Kunstfaservliese, mit Lösungen der erforderlichen, üblicherweise zur Herstellung von Teststreifen verwendeten Reagenzien (Substrat, Puffer, gegebenenfalls Netzmittel) in leichtflüchtigen Lösungsmitteln, wie z. B. Wasser, Methanol, Ethanol oder Aceton imprägniert. Dies geschieht zweckmäßigerweise in getrennten Schritten: Zunächst wird mit einer wäßrigen Lösung imprägniert, die den Puffer und andere wasserlösliche Zusatzstoffe enthält. Danach wird mit einer Lösung der Proteasesubstrate der allgemeinen Formel imprägniert. In einem weiteren Schritt kann mit eventuell benötigten Kupplungsreagenzien imprägniert werden. Die Imprägnierung kann jedoch auch in einer anderen Reihenfolge bzw. mit einer anderen Zusammensetzung der Imprägnierlösungen durchgeführt werden.

Die fertigen Testpapiere können als solche verwendet werden oder in an sich bekannter Weise an Griffen angeklebt oder vorzugsweise zwischen Kunststoffen und feinmaschigen Netzwerken eingesiegelt werden.

Zur Herstellung filmbeschichteter Teststreifen werden sämtliche Reagenzien in die Lösung oder Dispersion einer filmbildenden Substanz, wie zum Beispiel Polyvinylester oder Polyamid, eingetragen und homogen vermischt. Das Gemisch wird in dünner Schicht auf einen Kunststoffträger gestrichen und getrocknet. Die erfindungsgemäßen filmbeschichteten Teststreifen werden nach dem Trocknen geschnitten und können als solche verwendet werden oder in an sich bekannter Weise an Griffen angeklebt werden oder z. B. zwischen Kunststoffen und feinmaschigen Netzwerken eingesiegelt werden.

Das erfindungsgemäße diagnostische Mittel zum Nachweis bakterieller Infektionen des Liquors in Form von Pulvermischungen oder Reagenztabletten läßt sich herstellen, indem die oben angeführten Bestandteile des Testes mit den üblichen galenischen Zusatzstoffen versetzt und granuliert werden. Zusatzstoffe dieser Art sind z. B. Kohlenhydrate, wie z. B. Mono-, Oligo- oder Polysaccharide, oder Zuckeralkohole, wie z. B. Mannit, Sorbit und Xylit, oder andere lösliche inerte Verbindungen, wie Polyethylenglykole oder Polyvinylpyrrolidon. Die Pulvermischungen oder Reagenztabletten weisen im allgemeinen ein Endgewicht von ungefähr 50–200 mg, vorzugsweise 50–80 mg auf.

Zur Herstellung von Lyophilisaten im Gesamtgewicht von jeweils etwa 5–20 mg, vorzugsweise etwa 10 mg, wird eine Lösung gefriergetrocknet, die neben sämtlichen für den Test benötigten Reagenzien üblichen Gerüstbildner, wie z. B. Polyvinylpyrrolidon, und evtl. weitere Füllstoffe, wie z. B. Mannit, Sorbit oder Xylit enthält.

Das erfindungsgemäße diagnostische Mittel in Form einer Lösung enthält vorzugsweise sämtliche für den Test benötigte Reagenzien. Als Lösungsmittel kommen Wasser oder Gemische von Wasser mit einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel, wie z. B. Methanol, Ethanol, Aceton oder Dimethylformamid, in Frage. Aus Haltbarkeitsgründen kann es vorteilhaft sein, die für den Test benötigten Reagenzien auf zwei oder mehrere Lösungen zu verteilen, die erst bei der eigentlichen Untersuchung zusammengegeben werden.

Die so hergestellten diagnostischen Mittel ermöglichen es, nach Eintauchen in die zu untersuchende oder nach Zugabe zur betreffenden bzw. nach Zugabe der betreffenden Körperflüssigkeit bakterielle Infektionen des Liquors mittels der erhöhten proteolytischen Aktivität dieser infektiösen Körperflüssigkeit gegenüber den Substraten der allgemeinen Formel im Vergleich zu Liquorproben, die keine bakterielle Infektion aufweisen, nachzuweisen, die visuell oder photometrisch, z. B. remissionsphotometrisch oder in der Küvette, beurteilt werden können.

**Die Erfindung soll nachstehend an drei Ausführungsbeispielen erläutert werden.**

#### Beispiel 1:

Der Test kann unter Verwendung des Substratgemisches von Gly-Pro-2-nitro-4-dimethylaminoanilid und Gly-Pro-Pro-2-nitro-4-dimethylaminoanilid ausgeführt werden.

Die Reagenzlösung enthielt je 2 mM Substrat, 100 mM TRICIN-Puffer, pH 7,4. Zu je 500 µl dieser Reagenzlösung wurden 100 µl Liquor pipettiert. Dieses Gemisch wurde über 4 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die enzymatische Reaktion mittels gesättigter Natriumazetat-Lösung abgestoppt und die Extinktion bei 492 nm gegenüber einem Leerwert bestimmt.

Als Leerwert verwendeten wir wasserklare Liquores von Patienten, die keine bakteriellen Infektionen aufwiesen. Aus diesen Liquores wurde ein Pool als Standard hergestellt.

| Testansatz:                                                                                                                       | Probenmenge | Leerwert I | Leerwert II |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|-------------|
| Reagenzien                                                                                                                        |             |            |             |
| Substrat-Puffergemisch                                                                                                            | 500 µl      | 500 µl     | 500 µl      |
| Patientenliquor                                                                                                                   | 100 µl      | —          | —           |
| Kontrolliquor                                                                                                                     | —           | —          | 100 µl      |
| Bei 20°C über 4 Stunden in verschlossenen Gefäßen inkubieren, danach die Reaktionen mit gesättigter Natriumazetatlösung abstoppen |             |            |             |
| Azetatpuffer                                                                                                                      | 100 µl      | 100 µl     | 100 µl      |
| Patientenliquor                                                                                                                   | —           | 100 µl     | —           |

Danach wurden die Proben sowie die Leerwerte I und II so zentrifugiert, daß ein trübungsfreier Überstand erhalten wurde. Durch die Bestimmung der Extinktionsdifferenzen von Probe und Leerwert I bzw. Leerwert II gegen Wasser bei 492 nm wurden die Extinktionsdifferenzen  $E_{\text{Probe}}$ ,  $E_{\text{Leerwert I}}$  und  $E_{\text{Leerwert II}}$  erhalten.

Die Aktivität des Patientenliquors ergab sich als Vielfaches des Standardliquores entsprechend

$$\frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert I}}}{E_{\text{Leerwert II}}}$$

### Beispiel 2:

Bestimmung der Bakterieninfektion durch direkte kinetische Messung. Die Substrate Lys-Pro-p-nitroanilid und Boc-Lys-Pro-p-nitroanilid werden in HEPES-Puffer gelöst. Die zu untersuchende Liquorprobe wird zur gepufferten Substratlösung hinzugegeben und die Absorptionsänderung wird bei einer Inkubationstemperatur von 25°C bei einer Wellenlänge von 405 nm direkt photometrisch verfolgt.

Substratlösung: 1 mM an beiden Substraten in 0,1 M HEPES-Puffer, pH 7,4

Zur Korrektur der nichtenzymatischen Hydrolyse wird ein Leerwert mitgeführt.

| Lösungen             | Meßansatz | Leeransatz |
|----------------------|-----------|------------|
| Substratlösung       | 500 µl    | 500 µl     |
| Liquor               | 100 µl    | —          |
| Wasser (destilliert) | —         | 100 µl     |

Die enzymatische Aktivität berechnet sich aus der gemessenen Extinktionsänderung bei 405 nm gemäß folgendem Ansatz:

$$\text{Enzymaktivität in nM/s} = 10\,070 \times \frac{E_{\text{Meßansatz}} - E_{\text{Leerwert}}}{\text{min.}}$$

Diese direkte kinetische Bestimmung wurde vorzugsweise bei wasserklaren Liquorproben angewendet.

### Beispiel 3:

Bestimmung durch eine Schwellenwertmethode. Die Substrate Gly-Pro-β-naphthylamid und Gly-Pro-Pro-β-naphthylamid wurden in 0,1 M HEPES-Puffer, pH 7,4 in einer Konzentration von jeweils 1 mM gelöst. Mit dieser Substrat-Puffer-Lösung wurde Filterpapier FN 11 getränkt und mittels Gefriertrocknung aufgetrocknet. Aus diesem so präparierten Filterpapier wurden kreisrunde Papierblättchen mit einem Durchmesser von etwa 4 mm ausgestanzt. Diese so vorbereiteten Filterpapiere sind bei kühler und trockener Lagerung längere Zeit zur Durchführung des verwendeten Tests benutzbar.

Der eigentliche Test wurde wie folgt ausgeführt:

Auf einer Glasplatte, zum Beispiel einen Objektträger, werden zwei der oben angegebenen kreisrunden Substrat-Puffer-Filterpapiere gegeben. Ein Blättchen wird mit einem Tropfen des zu untersuchenden Liquores getränkt, das andere mit der Kontrollösung. Die Kontrollösung besteht aus einem Liquorpool, mit Liquorproben, die nicht bakteriell kontaminiert waren. Nach dem Tränken der Blättchen wird mit einem zweiten Objektträger abgedeckt und anschließend in einer wasserdampfgesättigten Kammer bei etwa 20°C inkubiert.

Bei einer Anregungswellenlänge von etwa 366 nm (Quarzlampe mit Filter) können Enzymaktivitätsunterschiede visuell entsprechend den üblichen Kriterien einer Schwellenwertmethode beurteilt werden.