



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2832/85

(22) Indleveringsdag: 21 jun 1985

(41) Alm. tilgængelig: 07 jan 1986

(44) Fremlagt: 31 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 06 jul 1984 US 628310

(51) Int.Cl.5

G 01 N 33/569

G 01 N 33/68

// C 12 Q 1/64

(71) Ansøger: \*Becton Dickinson and Company; Mack Centre Drive; Paramus; New Jersey 07652. US

(72) Opfinder: Philip Stephen \*Rose; US

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

**(54) Fremgangsmåde til fremstilling af mikrobielle proteiner, som er opnået ud fra Chlamydia trachomatis, til immunbestemmelse**

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 59624

Andre publikationer: Analytical Biochemistry bind 100 (1979) side 64-69

(57) Sammendrag:

2832-85

Der beskrives en fremgangsmåde til prøvebehandling som forbedrelse til udførelse af en immunbestemmelse, ved hvilken et mikrobielt protein opløseliggøres med en detergent ved forhøjet temperatur og i nærværelse af en alkali- eller jordalkalimetallion. Ved forhøjede temperaturer er detergenten opløselig. Ved lavere temperaturer gør tilstedeværelsen af metallionen detergenten uopløselig, således at den forhindres i at genere immunbestemmelsesmetoden. En særlig anvendelse er til opløseliggørelse af det vigtigste ydre membranprotein på Chlamydia trachomatis.

Den foreliggende opfindelse angår en framgangsmåde til fremstilling af mikrobielle proteiner, som er opnået ud fra *Chlamydia trachomatis*, til immunbestemmelse. Mere specielt angår opfindelsen brugen af detergenter til solubilisering af protein for at udtrykke proteinets antigene egenskaber uden at ødelægge evnen til at påvise proteinantigenet i en immunbestemmelse.

Detergenter har længe været kendt som reagenser til solubilisering af mange biokemiske stoffer, især mikrobielle proteiner og proteinkomplekser. Denne evne er nyttig til frigørelse eller eksponering af antigener i proteinerne, som derefter kan påvises ved immunbestemmelsesteknik. Uheldigvis hæmmer detergent i en antigenopløsning immunbestemmelse ved at forhindre bindingen af antigenet til et immobiliseret antistof i fast fase. Hidtil har der ikke eksisteret nogen praktisk billig metode til at eliminere denne skadelige virkning af detergent på immunbestemmelse. Simpel fortynding af prøven er utilfredsstillende. For eksempel, hvis immunbestemmelsesprøven fortyndes efter opløseliggørelse, således at koncentrationen af detergent ikke længere påvirker bestemmelsesproceduren, resulterer den ledsagende reduktion i antigenkoncentration i et antigenniveau, som er under bestemmelsens tærskelværdi for følsomhed. Forøgelse af den oprindelige koncentration af antigen i immunbestemmelsesprøven, således at koncentrationen af antigen efter fortynding er over følsomhedstærskelværdien, er som regel ikke praktisk, da prøveeksemplerne ofte nødvendigvis er små. Der er således et behov for en metode til detergentsolubilisering af proteiner, der ikke samtidig hæmmer immunbestemmelsesprocedurerne.

En særlig anvendelse, hvor detergenter kan bruges med godt resultat, er til solubilisering af det vigtigste ydre membranprotein på *Chlamydia trachomatis*. Denne mikroorganisme er en af de to arter af slægten *Chlamydiaceae*, ordenen *Chlamydiales*.

Den anden art er *Chlamydia psittaci*. *Chlamydia trachomatis* i dens ca. 15 forskellige stammer er det ætiologiske middel

for en række humane okulære og genitale sygdomme, herunder trachoma, inklusions-conjunctivitis, lymphogranuloma venereum, "uspecifik" eller ikke-gonokokkal urethritis og proctitis.

5 C.trachomatis-infektion har en tendens til at sprede sig gennem hele befolkningen. Det er f.eks. blevet anslået, at C.trachomatis er ansvarlig for flere millioner tilfælde årligt af ikke-gonokokkal urethritis.

10 Da C.trachomatis-formidlede sygdomme er vidt udbredt, er en pålidelig, enkel og billig prøve for organismens tilstedeværelse meget ønskelig og af stor betydning, for at der kan foretages passende behandling. Den eneste serologiske test, der for tiden anvendes, er mikroimmunofluorescens-testen. Denne test  
15 kræver imidlertid, at stammerne af C.trachomatis anvendes som serologisk test-antigen. Faciliteterne til udførelse af denne test er endvidere kun til rådighed i et begrænset antal laboratorier i verden. Testen er meget besværlig, tidsrøvende og vanskelig at udføre.

20 Fra Analytical Biochemistry, bind 100 (1979), side 64 - 69, kendes solubilisering af uopløseligt protein i en natriumdodecylsulfatopløsning, hvorefter overskud af natriumdodecylsulfat udfældes ved hjælp af et kaliumsalt. Da natriumdodecylsulfat generer farvestofbindende proteinanalytiske prøver, såsom  
25 Bradford-proceduren, skal det overskydende natriumdodecylsulfat fjernes med henblik på opnåelse af maksimal følsomhed ved en proteinanalyse, som benytter farvestofbinding.

30 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse tager ikke specielt sigte på anvendelse af kaliumsalte til udfældning af natriumdodecylsulfat, men giver mulighed for at anvende flere andre metaller i forbindelse med flere andre anioniske detergenter end natriumdodecylsulfat. Herved kan der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstilles mikrobielle proteiner,  
35 der kan benyttes til immunbestemmelse eller immunoanalyse, hvilket kræver, at de fra mikroorganismer solubilerede antigener kommer til at foreligge i en immunokemisk bevaret form, hvori de kan genkendes af antistoffer, som er rettet mod dem.

Fra EP offentliggørelsesskrift nr. 59.624 kendes anvendelsen af natriumdodesylsulfat og natriumdodecylsulfatlignende detergenter til solubilisering af Chlamydia-proteinantigener efterfulgt af fraskillelse af de solubiliserede proteiner fra overskud fra natriumdodesylsulfat ved anvendelse af hydroxyapatitkromatografi.

I modsætning hertil benytter fremgangsmåden ifølge opfindelsen en anderledes fraskillelse af detergenten, ved hvilken overskud af detergent udfældes på simpel vis ved hjælp af kationer.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen behandles prøven forud for udførelse af en immunbestemmelse, og den er særlig nyttig til fremstilling af mikrobielle celleproteinprøver, såsom prøver af det vigtigste ydre membranprotein af Chlamydia trachomatis. Det har vist sig, at dette særlige protein er et arts-specifikt antigen, og at det derfor er nyttigt til en immunbestemmelse for tilstedeværelse af organismen i et inficeret individ.

Før celleproteiner af organismer, såsom C.trachomatis, kan anvendes til en immunbestemmelse, må cellevæggen indeholdende proteinet ændres, således at et passende antistof kan genkende proteinet. Behandling med en detergent har vist sig effektiv til dette formål. Af særlig værdi til celleprotein-opløseliggørelse er salte af den ikke-ioniske detergent laurylsulfat. For at forhindre, at detergenten generer den senere udførelse af immunbestemmelse, går fremgangsmåden ifølge opfindelsen ud på, at der er alkali- eller jordalkalimetallion i detergentopløsningen. Ved høje temperaturer er detergent opløselig i nærværelse af sådanne ioner. Ved lavere temperaturer, såsom stuetemperatur, udfælder detergenten og kan eventuelt fjernes før udførelse af immunbestemmelsen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man

blander en prøve af et mikrobielt protein, som er opnået ud fra *Chlamydia trachomatis*, med en vandig opløsning af en proteinopløsende mængde af en ionisk detergent, som har en alkali- eller jordalkalimetalion som kation, til dannelse af en prøve-  
5 opløsning,

inkuberer prøveopløsningen ved en forhøjet temperatur i tilstrækkelig tid til opløsning af proteinet, og

10 afkøler prøveopløsningen i nærværelse af en forbindelse, der har en alkali- eller jordalkalimetalion som kation, hvilken forbindelse fungerer som temperaturafhængig udfældende forbindelse og således bringer detergenten til udfældning af opløsningen ved stuetemperatur eller lidt derover, men ikke påvirker  
15 detergentens opløselighed ved forhøjede temperaturer, hvorhos forbindelsens kation er en anden end detergentens kation.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen indebærer anvendelse af et  
20 temperaturafhængigt udfældningsmiddel til fjernelse af en protein-opløseliggørende mængde detergent fra et prøveeksemplar til immunbestemmelse. Detergenter er meget effektive protein-opløseliggørende midler, især til mikrobielle celleproteiner, såsom det vigtigste ydre membranprotein på *Chlamydia trachomatis*. Fordi de generer ved en immunbestemmelse ved at hæmme  
25 bindingen af antigen, må detergenter imidlertid effektivt fjernes fra prøveopløsningen før udførelse af bestemmelsen.

Det har vist sig, at inkludering i prøveopløsningen af en  
30 forbindelse indeholdende en alkali- eller jordalkalimetalion meget nedsætter den vandige opløselighed af en detergent, såsom et dodecylsulfat, ved stuetemperatur eller lidt over (d.v.s. ved eller under ca. 30°C), men har ingen eller ringe virkning på opløseligheden ved forhøjede temperaturer. På  
35 grund af deres evne til at bevirke temperatur-afhængig udfældning af detergent vil disse forbindelser i det følgende sommetider blive omtalt som udfældende forbindelser. Det

skal forstås, at denne betegnelse ikke betyder, at forbindelserne selv udfælder, men kun at de bevirker udfældning af detergent. Ved alkali- eller jordalkalimetaller menes grundstofferne i gruppe I og II i det periodiske system, som indbefatter bl.a. lithium, natrium, kalium, magnium, calcium og barium. En vandig opløsning af et natrium- eller lithiumlaurylsulfat og kalium-ion kan således anvendes til at opløseliggøre mikrobielt protein ved forhøjet temperatur. Opløsningen afkøles så til ca. stuetemperatur eller lidt over, hvilket bevirker, at detergenten udfælder. Detergenten kan eventuelt fjernes ved centrifugering eller filtrering. Hvad enten den udfældede detergent fjernes eller ej, udføres immunobestemmelsen så på prøven af protein, uden at detergenten generer. Da den udfældende forbindelse ikke spiller nogen rolle i opfindelsen indtil afkølingstrinet, kan den sættes til opløsningen, efter at proteinet er opløseliggjort, i stedet for fra begyndelsen sammen med detergenten.

Egnede detergenter til anvendelse ifølge opfindelsen indbefatter dodecylsulfater, såsom natriumdodecylsulfat og lithiumdodecylsulfat. I almindelighed findes detergent i opløsningen i koncentrationer fra ca. 0,01 vægt% pr. rumfang til ca. 2,0 vægt% pr. rumfang. Hensigtsmæssigt er koncentrationen fra ca. 0,01 til ca. 1,0 vægt% pr. rumfang, idet fra ca. 0,05 til ca. 0,1 vægt% pr. rumfang foretrækkes.

Den udfældende forbindelse findes i opløsningen i koncentrationer fra ca. 0,01 M til ca. 2,0 M. Hensigtsmæssigt er koncentrationen fra ca. 0,01 M til ca. 1,0 M, idet fra ca. 0,05 M til ca. 1,0 M foretrækkes. Enhver vandopløselig forbindelse, der har en alkali- eller jordalkalimetal-ion som kation, kan anvendes. Forbindelsen kan være f.eks. et fosfat, chlorid eller carbonat. Udvalgelsen af en speciel udfældende forbindelse påvirkes af den særligt anvendte detergent. For eksempel udfældes natriumdodecylsulfat lettest ved stuetemperatur med tilstrækkelige koncentrationer af kalium-, calcium- eller barium-ion, medens lithiumdodecylsulfat,

foruden af de ovennævnte ioner, vil blive tilstrækkeligt udfældet af ioner af magnesium og natrium.

Den vandige opløsning af detergent og udfældende forbindelse  
5 sættes til et prøveeksemplar, såsom en udpensling fra halsen  
eller urinrøret. Prøven blandes grundigt med den vandige  
opløsning af detergent og udfældende forbindelse til dannelse  
af en prøveopløsning. Ved blanding af prøveopløsningen ved  
stuetemperatur forbliver detergent uopløst. Opløsningen med  
10 den uopløste detergent opvarmes fra stuetemperatur til en  
temperatur fra ca. 60°C til ca. 120°C og holdes ved denne tem-  
peratur i en periode fra ca. 5 minutter til ca. 30 minutter.  
Ved denne inkubationstemperatur opløses detergenten, opløse-  
liggør det mikrobielle protein og eksponerer antigenet til  
15 immunobestemmelsesformål.

Efter inkubation afkøles opløsningen hurtigt under anvendelse  
af et isbad eller andre egnede midler til en temperatur, der  
er tilstrækkeligt lav til at muliggøre udfældning af deter-  
20 genten. Alternativt kan opløsningen afkøles langsomt, indtil  
den når stuetemperatur. En egnet stødpude, såsom et phosphat  
(f.eks. 0,2 M natriumphosphat, 0,1 vægt% pr. rumfang okse-  
serumalbumin, pH 7,4), kan tilsættes før eller efter inkuba-  
tionen. Stødpuden vedligeholder opløsningens pH-værdi mellem  
25 ca. 6,5 og ca. 8,0. Efter afkøling kan den udfældede deter-  
gent fjernes eller blive i prøven. Hvis den bliver deri, har  
detergenten ingen eller ringe virkning på immunbestemmelsen,  
fordi den ikke er i opløsning.

30 Som nævnt ovenfor består en særlig anvendelse af fremgangsmå-  
den ifølge opfindelsen i solubilisering af Chlamydia tracho-  
matis. Det vigtigste ydre membranprotein på C.trachomatis  
omfatter ca. 60% af det samlede forbundne ydre membranprotein  
i mikroorganismen og har en størrelse eller en molekylvægt af  
35 underenheden mellem 38.000 og 44.000 dalton med en middel-  
molekylvægt på 39.500 dalton. Af forenklingsgrunde vil denne  
vigtigste ydre membranprotein-gruppe af C.trachomatis i det

følgende blive omtalt som MP 39,5, hvilket betyder: større ydre membranprotein med en gennemsnitsmolekylvægt af underenheden på 39.500 dalton. MP 39,5 er et artsspecifikt antigen, idet dette protein, når det afprøves over for C.trachomatis-antistoffer fra alle serotyperne, reagerer med artsspecificitet. Som et antigen giver MP 39,5 basis for identifikation af alle C.trachomatis-serotyperne.

Artsspecifikke antistoffer mod et antigen, såsom MP 39,5, kan udvikles ved passende podningsmetoder med laboratorie-dyr, såsom mus og/eller kaniner. De dyre-udviklede antistoffer kan anvendes til bestemmelser for infektion i andre pattedyr. Disse bestemmelser kan udføres under anvendelse af velkendte metoder til bestemmelse af tilstedeværelsen af bakterielt antigen i det inficerede individ. Når først man har sikret sig en forsyning af monospecifikke antistoffer fra antigenpodede laboratorie-dyr, kan enten direkte eller indirekte bestemmelsesmetoder foretages med prøver fra pattedyr, der mistænkes for at huse infektioner. Bestemmelsesteknik, såsom enzymbundet immunoabsorbentbestemmelse eller radioimmunbestemmelse, er egnet til disse formål.

Ved en direkte bestemmelsesmetode bliver monospecifikt antistof mod antigenet bundet covalent eller ikke-covalent til et bærersystem i fast fase. Som sædvanligt ved denne teknik kan bærersystemet være glas, plast eller lignende. Bæreren i fast fase med vedhængende monospecifikt antistof kan inkuberes med en prøve fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og tidligere opnået fra et individ, der mistænkes for at have en infektion.

Monospecifikt antistof, der tidligere er blevet radiomærket eller konjugeret med enzym ved kendt teknik, bringes så i ligevægt med bærersystemet. Eventuelt antigen, der findes i prøven, og som er blevet bundet til antistoffet på bærersystemet, vil på sin side binde til det radiomærkede eller enzymkonjugerede antistof. Hvis der anvendes radiomærket antistof, kan den relative rest-radioaktivitet i prøven derefter bestem-

- mes. Denne værdi sammenlignes med eksemplarer, som er blevet påvist at være fri for antigenet. Hvis der anvendes enzymkonjugeret antistof, bliver et substrat, specifikt for enzymet, sat til reaktionsblandingen med den faste bærer, og den fremkomne farveændring registreres spektrofotometrisk. Denne farveændring sammenlignes med prøver, der vides at være fri for antigenet. Tilstedeværelsen af et antigen, såsom MP 39,5, i pattedyr-arter kan således bestemmes direkte.
- 10 Alternativt kan der anvendes indirekte bestemmelsesmetoder. Specielt kan antigenet blive covalent eller ikke-covalent bundet til et egnet bærersystem i fast fase. Et eksemplar fra det individ, der mistænkes for at have en infektion, fremstilles som ovenfor beskrevet. Eksemplaret blandes så med
- 15 en kendt mængde radiomærket eller enzymkonjugeret antistof mod antigenet, der forud er blevet fremstillet af et laboratoriedyr. Blandingen af eksemplar og antistof kan så inkuberes med et fast bærersystem og dets bundne antigen.
- 20 Radioaktiviteten af det faste bærersystem måles, eller farveudvikling i det enzymkonjugerede system måles og sammenlignes med eksemplarer, der er behandlet på lignende måde som standarder, og som ikke indeholder antigen.
- 25 Evnen hos den kliniske prøve, der mistænkes for at indeholde en given mikroorganisme, til at hæmme bindingen af de radio-mærkede eller enzymkonjugerede antistoffer til den faste bærer, afslører tilstedeværelse eller fravær af antigenet i det kliniske eksemplar. En eventuelt påvist hæmning viser tilstedeværelse af infektion.
- 30
- Andre egnede bestemmelsesmetoder og variationer vil være indlysende for fagfolk.
- 35 Eksempel 1 illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen under anvendelse af C.trachomatis MP 39,5. Tabel I sammenligner en kontrol-immunobestemmelse med én, hvori eksemplaret er fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

## EKSEMPEL 1

-----

Til en 450 prøve af Chlamydia trachomatis-stamopløsning i  
 5 phosphat-stødpude (0,2 M natriumphosphat, 0,1 vægt% pr. rum-  
 fang okseserumalbumin, pH 7,4) blev sat kaliumchlorid i  
 tilstrækkelig mængde til at bringe kalium-ionkoncentrationen  
 i prøven på 0,1 M. Ca. 50 af en 1 vægt% pr. rumfang opløs-  
 10 ning af SDS (natriumdodecylsulfat) i vand blev derefter til-  
 sat, efterfulgt af opvarmning af prøven til 100°C i en op-  
 varmningsblok. Prøven blev inkuberet ved denne temperatur i  
 10 minutter og derpå afkølet til stuetemperatur i et isbad  
 for at udfælde SDS. Immunobestemmelser på stamfortyndinger  
 15 på 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 og 1:16 blev så udført uden fjernelse  
 af den udfældede detergent. En kontrol blev også fremstillet  
 ved samme fremgangsmåde, med undtagelse af at tilsætningen af  
 kaliumchlorid blev udeladt. Resultaterne i nedenstående tabel  
 viser, at der kan fås en positiv indikation af Chlamydia ved  
 meget højere fortyndinger under anvendelse af fremgangsmåden  
 20 ifølge opfindelsen, når man sammenligner med en kontrol, der  
 ikke anvender det udfældende middel. Dette viser en betydelig  
 gevinst i følsomhed.

Den bedste metode og de foretrukne udførelsesformer er blevet  
 25 beskrevet i det foregående.

TABEL  
-----

Chlamydia stamopløsning <sup>1)</sup>	EIA-resultater <sup>2)</sup>	
	Behandlet som ifølge eksempel	Ubehandlet (kontrol)
1:16	0,53	0
1:8	0,94	0
1:4	1,31	0,11
1:2	1,65	0,27
35 Ufortyndet	1,81	0,45

-----

1) Ren,  $5 \times 10^7$  elementarlegemer/ml i 0,02 M natriumphosphat-stødpude.

2) Udtrykt som S/N-forhold af optisk tæthed af absorbans ved 450 nm.

P a t e n t k r a v .

-----

1. Fremgangsmåde til fremstilling af mikrobielle proteiner,  
5 som er opnået ud fra Chamydia trachomatis, til immunbestem-  
melse, k e n d e t e g n e t ved, at man

blander en prøve af et mikrobielt protein, som er opnået ud  
fra Chamydia trachomatis, med en vandig opløsning af en prote-  
10 inopløsende mængde af en ionisk detergent, som har en alkali-  
eller jordalkalimetalion som kation, til dannelse af en prøve-  
opløsning,

inkuberer prøveopløsningen ved en forhøjet temperatur i til-  
15 strækkelig tid til opløsning af proteinet, og

afkøler prøveopløsningen i nærværelse af en forbindelse, der  
har en alkali- eller jordalkalimetalion som kation, hvilken  
forbindelse fungerer som temperaturafhængig udfældende forbin-  
20 delse og således bringer detergenten til udfældning af opløs-  
ningen ved stuetemperatur eller lidt derover, men ikke påvir-  
ker detergentens opløselighed ved forhøjede temperaturer,  
hvorhos forbindelsens kation er en anden end detergentens kat-  
ion.

25

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,  
at detergenten findes i prøveopløsningen i en koncentration på  
ca. 0,01 - 2,0% (vægt/vol).

30 3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved,  
at den udfældende forbindelse findes i opløsningen i en kon-  
centration på ca. 0,01 - 0,2 mol/l.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved,  
35 at den udfældende forbindelse indeholder en kation, som er en  
natrium-, kalium-, calcium-, barium- eller magnesiumion.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at prøveopløsningen inkuberes ved en temperatur på ca. 60°C - 120°C i ca. 5 - 30 minutter.
- 5 6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten findes i prøveopløsningen i en koncentration på ca. 0,01 - 1,0% (vægt/vol).
- 10 7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsen findes i en opløsning i en koncentration på ca. 0,01 - 1,0 mol/l.
- 15 8. Fremgangsmåde ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at opløsningen indeholder en puffer til at holde opløsningens pH-værdi på ca. 6,5 - 8,0.
- 20 9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten er et dodecylsulfat.
- 20 10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse er et vandopløseligt salt.
- 25 11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten er natriumdodecylsulfat, og at den udfældende forbindelse indeholder en kation, som er en kalium-, calcium- eller bariumion.
- 30 12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at opløsningen inkuberes ved en temperatur på ca. 100°C i ca. 10 minutter.
- 35 13. Fremgangsmåde ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse er kaliumchlorid og findes i opløsningen i en koncentration på ca. 0,05 - 1,0 mol/l.
14. Fremgangsmåde ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten findes i en koncentration på ca. 0,05 - 0,1% (vægt/vol).

15. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten er lithiumdodecylsulfat.'
- 5 16. Fremgangsmåde ifølge krav 15, k e n d e t e g n e t ved, at opløsningen inkuberes ved en temperatur på ca. 100°C i ca. 10 minutter.
- 10 17. Fremgangsmåde ifølge krav 15, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse er kaliumchlorid og findes i prøveopløsningen i en koncentration på ca. 0,05 - 1 mol/l.
- 15 18. Fremgangsmåde ifølge krav 17, k e n d e t e g n e t ved, at detergenten findes i en koncentration på ca. 0,05 - 0,1% (vægt/vol).
- 20 19. Fremgangsmåde ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t ved, at prøveopløsningen undersøges ved hjælp af radioimmunbestemmelse.
- 25 20. Fremgangsmåde ifølge krav 18, k e n d e t e g n e t ved, at opløsningen undersøges ved hjælp af radioimmunbestemmelse.
- 30 21. Fremgangsmåde ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse sættes til prøveopløsningen før opvarmningen.
- 35 22. Fremgangsmåde ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse sættes til prøveopløsningen efter inkubationen.
23. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse sættes til prøveopløsningen før opvarmningen.
24. Fremgangsmåde ifølge krav 20, k e n d e t e g n e t ved, at den udfældende forbindelse sættes til prøveopløsningen efter inkubationen.