



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 09 575 T2 2004.12.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 272 658 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 09 575.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US00/22277

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 957 436.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 01/079528

(86) PCT-Anmeldetag: 14.08.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 25.10.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.01.2003

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 31.03.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 30.12.2004

(51) Int Cl.⁷: C12Q 1/04

C12Q 1/70, C12Q 1/34

(30) Unionspriorität:

548157 13.04.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

3M Innovative Properties Co., Saint Paul, Minn.,
US

(72) Erfinder:

ADAMS, A., Carl, Saint Paul, US; KREJCAREK, E.,
Gary, Saint Paul, US; WICKS, H., James, Saint
Paul, US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: NACHWEIS VON BAKTERIEN UND BAKTERIOPHAGEN MIT IMMOBILISIERTEN ENZYMSUBST-
RATEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Der Nachweis von Bakterien ist in verschiedenen Industrien, einschließlich der Lebensmittel- und Getränkeindustrie, von Bedeutung. So ist das Screening von Lebensmitteln und Wasser auf krankheitserregende Bakterien in entscheidendem Maße notwendig, um die Sicherheit des Verbrauchers zu gewährleisten. Die Bestimmung der Niveaus bestimmter Bakterienfamilien ist ein gemeinhin verwendeter Ansatz zur Abschätzung der Haltbarkeit und mikrobiellen Akzeptierbarkeit von Lebensmittelprodukten und des hygienischen Zustands des bei der Verarbeitung eingesetzten Geräts sowie der bei der Herstellung verwendeten Rohmaterialien. Die Diagnose mikrobieller Infektionen hängt ebenso vom Nachweis des bzw. der verursachenden Organismus bzw. Organismen ab.

[0002] Es gibt viele bekannte Verfahren zum Nachweis von Bakterien. So können beispielsweise Bakteriophagen, bei denen es sich um bakterieninfizierende Viren handelt, eingesetzt werden. Daher kann das Vorhandensein der Bakteriophagen, der infizierten Bakterien oder deren Fehlen nachgewiesen werden. Normalerweise wird ein Ziel-Bakterium nachgewiesen, indem die Bakterien mit einem für die Bakterien spezifischen Bakteriophagen (BP) infiziert werden, der überschüssige BP inaktiviert wird und danach die BP-infizierten Bakterien so manipuliert werden, dass das Vorhandensein oder das Fehlen des BP als indirektes Zeichen dafür, ob die Probe ursprünglich die Ziel-Bakterien enthielt oder nicht, nachgewiesen wird. Dabei können bakterielle "Helperzellen" verwendet werden, um die Anzahl BP-infizierter Bakterien zu erhöhen und dadurch das Testverfahren zu verbessern, z.B. schneller zu machen. Ein übliches Nachweisverfahren in den letzten Schritten eines solchen Tests besteht darin, die Helper-Bakterienzellen mit den BP-infizierten Bakterien zu inkubieren und entweder Änderungen in der Trübung der Lösung oder alternativ die Bildung von BP-Plaques auf einem geeigneten Wachstumsmedium zu beobachten.

[0003] So werden beispielsweise in der WO 0125395 (Wicks et al.) Vorrichtungen und Verfahren zum Nachweis von Bakterien in einer Probe beschrieben. Dabei wird kurz gesagt eine die vermuteten (Ziel-)Bakterien enthaltende Probe mit einem für die vermuteten Bakterien spezifischen BP infiziert, überschüssiger BP mit einem Antivirusmittel inaktiviert und die BP-infizierten Bakterien zu Helper-Bakterienzellen gegeben, um den BP zu amplifizieren und ein Signal zu produzieren, das visuell oder mit einem Instrument nachgewiesen werden kann. Beispielsweise lässt sich der BP nachweisen, indem die Helperzellen auf Agar inkubiert werden und die Anzahl der gebildeten BP-Plaques gezählt wird.

[0004] Dabei wäre es sehr sinnvoll, bei solchen Testverfahren Enzymsubstrate (ES) als Indikatoren zum Nachweis des Vorhandenseins von BP (und somit indirekt des Vorhandenseins oder des Fehlens von Ziel-Bakterien) einzusetzen. Die Nutzung von ES-Indikatoren könnte gegenüber dem Versuch, Änderungen der Trübung der Lösung zu beobachten oder dem Zählen der gebildeten Plaques zu signifikanten Vorteilen führen. Die Verwendung von ES-Indikatoren könnte zu zweckmäßigeren, schnelleren und weniger teueren Testverfahren führen. Die Verwendung traditioneller löslicher ES-Indikatoren ist jedoch im allgemeinen bei solchen Testverfahren nicht möglich. Die löslichen ES würden in unerwünschter Weise mit in den intakten Bakterienzellen sowohl der Nichtziel-Bakterien als auch der Helper-Bakterienzellen, falls diese verwendet werden, vorhandenem Enzym reagieren und dadurch nicht akzeptable Hintergrundsignalniveaus produzieren.

[0005] Die folgende Erfindung löst das Problem des Standes der Technik, indem Enzymsubstrate als Indikatoren verwendet werden, die an einen unlöslichen festen Träger gebunden (d.h. immobilisiert) sind. Die Verwendung eines immobilisierten Enzymsubstrats hindert das Enzymsubstrat daran, eine Bakterienzellwand zu durchqueren, um mit Enzymen in den intakten Bakterienzellen zu reagieren. Daher kann das Enzymsubstrat nur mit einem aus einer lysierten Bakterienzelle freigesetzten Enzym reagieren.

[0006] Somit stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis (Identifizierung und/oder Quantifizierung) eines Ziel-Bakteriophagen bereit. Bei dem Verfahren gibt man Bakterien und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammen; inkubiert das Reaktionsgemisch unter für einen eventuell in der interessierenden Probe vorhandenen Ziel-Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse der Bakterien und zur Freisetzung von Enzym; gibt ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch und überwacht das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals. Dabei kann die Zugabe des immobilisierten Enzymsubstrats zum Reaktionsgemisch vor oder nach Inkubation des Reaktionsgemischs erfolgen. Bei diesem Verfahren kann eine qualitative oder quantitative Bestimmung von Bakteriophagen in einer Probe erfolgen. Für eine quantitative Bestimmung wird das Reaktionsgemisch auf ein entsprechendes Wachstumsmedium ausplattiert und die das nachweisbare Signal abgebenden Zonen gezählt.

[0007] Als Alternative wird ein Verfahren zum Nachweis (Identifizierung und/oder Quantifizierung) von Ziel-Bakterien bereitgestellt. Bei dem Verfahren gibt man einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammen; inkubiert das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell in der interessierenden Probe vorhandenen Bakterien und zur Freisetzung von Enzymen; gibt ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch und überwacht das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals. Dabei kann die Zugabe des immobilisierten Enzymsubstrats zum Reaktionsgemisch vor oder nach Inkubation des Reaktionsgemischs erfolgen. Bei diesem Verfahren kann eine qualitative oder quantitative Bestimmung von Bakterien in einer Probe erfolgen.

[0008] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Ziel-Bakterien bereit, bei dem man: einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt; den Bakteriophagen eventuell in der interessierenden Probe vorhandene Bakterien infizieren lässt; ein Antivirusmittel zur Inaktivierung von eventuell vorhandenem extrazellulärem Bakteriophagen zugibt; Helfer-Bakterienzellen zu dem Reaktionsgemisch gibt; ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt; das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell vorhandener Bakterien und der Helfer-Bakterienzellen und zur Freisetzung von Enzym inkubiert und das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht. Dieses Verfahren wird vorzugsweise zur quantitativen Bestimmung von Bakterien in einer Probe verwendet, obwohl bei ihm auch eine qualitative Bestimmung erfolgen kann.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein immobilisiertes Enzymsubstrat bereit, das einen porösen festen Träger sowie ein kovalent daran gebundenes Enzymsubstrat enthält.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins oder Fehlens von Bakteriophagen oder Bakterien bereit, wobei ein immobilisiertes Enzymsubstrat (d.h. Enzymmedukt) verwendet wird. Somit stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren bereit, bei dem Enzymaktivität zum Nachweis von Bakteriophagen, wodurch ein indirektes Verfahren zum Nachweis von Bakterien bereitgestellt wird, oder zum direkten Nachweis von Bakterien verwendet wird.

[0011] Das Enzymsubstrat enthält vorzugsweise eine nachweisbare Markierung, die nach Kontakt mit in der zu testenden Probe vorhandenem Enzym eine Änderung beispielsweise der Spektraleigenschaften des Enzymsubstrats oder seiner Reaktionsprodukte, das durch die Enzymreaktion entsteht, produziert. Diese Änderung wird zur Bestimmung der Enzymaktivität und damit des Vorhandenseins oder Fehlens von Bakteriophagen und somit der Bakterien oder der Bakterien direkt verwendet. Vorzugsweise handelt es sich bei der Änderung um eine spektrale Änderung der Fluoreszenzstrahlung des Enzymsubstrats, obwohl andere Spektraländerungen, wie z.B. Änderungen der Absorption oder Exzitation, verwendet werden können.

[0012] Das Enzymsubstrat lässt sich auf verschiedenen festen Trägern immobilisieren. Vorzugsweise handelt es sich dabei um einen porösen Träger, obwohl andere Träger, wie z.B. eine optische Faser, wie aus dem US-Patent Nr. 5,238,809 (Wolfbeis) bekannt ist, verwendet werden können. In dieser letzteren Ausführungsform wird das Enzymsubstrat am Ende einer optischen Faser angebracht und ein Photodetektor für die nachfolgende Signalauswertung bereitgestellt, bei der das Signal, z.B. Fluoreszenzlicht, das vom Enzymsubstrat oder seinen Reaktionsprodukten emittiert wird, nach Reaktion mit einem Enzym gemessen wird. Als Photodetektoren sind Photomultiplier, Phototransistoren und Photodioden geeignet. Vorzugsweise handelt es sich bei der optischen Faser um eine Einzelfaser, doch kann sie auch in Form eines Multifaserbündels vorliegen.

Fester Träger

[0013] Akzeptable Träger zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können in einem weiten Bereich variieren. Ein Träger kann porös oder nichtporös sein, ist jedoch vorzugsweise porös. Er kann kontinuierlich oder nichtkontinuierlich, flexibel oder nichtflexibel sein. Ein Träger kann sich aus verschiedenen Materialien zusammensetzen, einschließlich Trägern aus keramischen, Glas-, metallischen, organopolymeren Materialien oder Kombinationen davon. Dabei können solche Träger magnetisch sein, was eine Konzentration und Intensivierung des Signals gestattet.

[0014] Zu den bevorzugten Trägern gehören organopolymere Träger, wie z.B. partikuläre oder aus Kugelchen bestehende Träger, Gewebe- und Vliesbahnen (wie z.B. Faserstoffbahnen), mikroporöse Fasern, mikroporöse

Membrane, Hohlfasern oder -rohre. Gewebe- und Vliesbahnen können entweder regelmäßige oder unregelmäßige physikalischen Oberflächenkonfigurationen aufweisen.

[0015] Poröse Materialien sind besonders wünschenswert, da sie große Oberflächen zur Verfügung stellen. Bei dem porösen Träger kann es sich um einen synthetischen oder natürlichen, organischen oder anorganischen Träger handeln. Geeignet sind Feststoffe mit einer porösen Struktur mit Porendurchmessern von wenigstens etwa 1,0 Nanometer (nm) und einem Porenvolumen von wenigstens etwa 0,1 Kubikzentimeter/Gramm (cm³/g). Vorzugsweise beträgt der Porendurchmesser mindestens etwa 30 nm, da größere Poren die Diffusion weniger stark einschränken. Vorzugsweise beträgt das Porenvolumen mindestens etwa 0,5 cm³/g für eine größere potentielle Kapazität, aufgrund der größeren, die Poren umgebenden Oberfläche. Zu den bevorzugten porösen Trägern gehören partikuläre oder aus Kugelchen bestehende Träger.

[0016] Vorzugsweise weisen hydrophile Träger mit einem hohen Molekulargewicht (vorzugsweise mehr als etwa 5000, und besonders bevorzugt mehr als etwa 40 000) einen signifikanten Vorteil auf. Die hydrophilen Polymere sind vorzugsweise wasserquellbar und gestatten so eine größere Durchsetzung mit Enzym. Zu solchen Träger gehören beispielsweise Cellulose, modifizierte Cellulose, Agarose, Polyvinylalkohol (PVA), Dextrane, amino-modifizierte Dextrane, Polyacrylamid, modifizierte Guar gummen, Guar gummen, Xanthangummen und Johannisbrotgummen.

[0017] Für eine Eignung im Sinne der Erfindung enthält der Träger eine reaktive funktionelle Gruppe, die zur Kupplung des Enzymsubstrats, vorzugsweise über eine Spacer-Gruppe, eingesetzt werden kann. Vorzugsweise ist die reaktive funktionelle Gruppe in der Lage, schnell, direkt und kovalent an die gewünschte Spacer-Gruppe unter Bildung derivatisierter Träger zu koppeln. Vorzugsweise enthält der Träger wenigstens eine reaktive funktionelle Gruppe, wie z.B. eine Hydroxyl-, Carboxyl-, Sulfhydryl- oder Aminogruppe, die chemisch an das Enzymsubstrat, gegebenenfalls über eine Spacer-Gruppe, bindet. Zu weiteren geeigneten funktionellen Gruppen gehören N-Hydroxysuccinimidester, Sulfonylester, Iodacetylgruppen, Aldehyde, Imidazolylcarbamate sowie Cyanogenbromid-aktivierte Träger. Solche funktionellen Gruppen können einem Träger mit verschiedenen bekannten Techniken zugeführt werden. So kann beispielsweise eine Glasoberfläche mit Aminopropyltriethoxysilan in bekannter Weise derivatisiert werden.

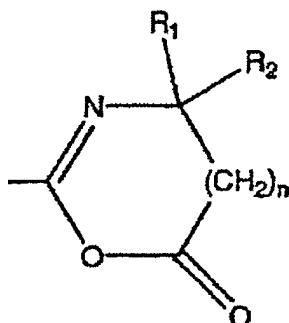
[0018] Vorzugsweise werden bei der Bindung des Enzymsubstrats an einen Träger Kupplungsmittel eingesetzt. So können beispielsweise die Kupplungsmittel EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid) und HOBr (1-Hydroxy-benzotriazolhydrat) die kovalente Bindung einer Carboxylgruppe des Enzymsubstrats an eine Aminogruppe eines aminomodifizierten Trägers unterstützen.

[0019] Die Verwendung solcher Kupplungsmittel ist in Advanced Organic Chemistry, Jerry March, Wiley InterScience, 4. Auflage, 1992, S. 420–421 beschrieben.

[0020] Ebenso lassen sich Spacer-Gruppen zur Bindung des Enzymsubstrats an einen Träger verwenden. Zu geeigneten Spacer-Gruppen gehören langkettige Diamine, wie z.B. Hexamethylenediamin.

[0021] Die Immobilisierung eines Enzymsubstrats an einen Träger kann auch elektrostatisch (d.h. ionisch) erfolgen, obwohl eine kovalente Bindung bevorzugt ist. So kann beispielsweise eine Immobilisierung durch Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Sulfonatgruppen eines Enzymsubstrats (z.B. einem mit 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonat derivatisierten Enzymsubstrat) und positiv geladenen Oberflächenammoniumgruppen eines als fester Träger verwendeten Anionenaustauschers erfolgen.

[0022] Besonders bevorzugt, in der vorliegenden Erfindung geeignete reaktive Träger sind Träger mit Azlacton-funktionellen Gruppen auf inneren und/oder äußeren Oberflächen solcher Träger. Solche reaktiven Gruppen besitzen eine Azlacton-funktionelle Gruppe der folgenden Formel:



worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander für eine (C1–C14)-Alkylgruppe, eine (C3–C14)-Cycloalkylgruppe, eine (C5–C12)-Arylgruppe, eine (C6–C26)-Arenylgruppe mit gegebenenfalls bis zu drei S-, N- und nichtperoxidischen O-Heteroatomen stehen, oder R₁ und R₂ zusammen mit dem Kohlenstoff, mit dem sie verknüpft sind, einen carbocyclischen Ring mit 4–12 Ringatomen bilden können, und n = 0 oder 1 ist.

[0023] Azlacton-funktionelle reaktive Träger sind besonders bevorzugt, da sie im allgemeinen stabil sind. Ebenso koppeln sie Enzymsubstrate, gegebenenfalls mit Spacer-Gruppen, schnell und direkt in kovalenter Weise besser und mit weniger Nebenreaktionen (z.B. Hydrolyse) als andere Träger mit reaktiven funktionellen Gruppen. Weiterhin besitzen sie hochkovalente Kupplungskapazitäten mit Nukleophilen. Azlacton-funktionelle reaktive Träger lassen sich mit einer Reihe von Verfahren, wie sie aus dem US-Patent Nr. 5,561,097 (Gleason et al.) bekannt sind, herstellen.

Enzymsubstrate

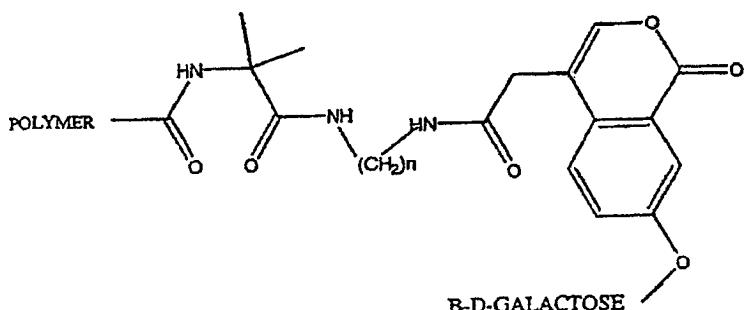
[0024] Eine große Vielfalt von Enzymsubstraten (ES) kann verwendet werden. Vorzugsweise enthalten die Enzymsubstrate eine Gruppe, die zu Wechselwirkung mit, oder besonders bevorzugt zur Reaktion mit, der Hydroxyl-, Amino- oder Sulfhydrylgruppierung beispielsweise eines festen Trägers in der Lage ist, so daß die Reaktion zur Bindung des ES an den Träger führt. Vorzugsweise stört der Mechanismus der Bindung an den Träger nicht die Fähigkeit des Enzyms, auf das ES zu wirken, oder zerstört nicht die Fähigkeit des ES, ein Signal zu produzieren, wenn es einer Wirkung durch das Enzym ausgesetzt ist.

[0025] Zu den Enzymsubstraten gehören diejenigen, die mit Enzymen unter Erhalt eines nachweisbaren Signals wechselwirken. Dazu gehören beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, Enzymsubstrate für beta-Galactosidase (beta-Gal), beta-Glucuronidase, Alkoholdehydrogenase oder andere NAD-Oxidoreduktasen, Transferasen, alkalische Phosphatasen oder andere Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Oxidasen, Gyrasen, Nucleasen (DNasen und RNasen) und Restriktionsenzyme. Solche Enzyme werden von Bakterien produziert. Bei den Enzymsubstraten handelt es sich typischerweise um Polypeptide, Kohlenhydrate (z.B. Polysaccharide) oder Fettsäurederivate.

[0026] Ein geeignetes Enzymsubstrat enthält vorzugsweise eine nachweisbare Markierung. Zu solchen Markierungen gehören beispielsweise Fluoreszenz-, Lumineszenz- und chromogene Markierungen. Fluoreszenzmarkierungen sind bevorzugt. Zu den Fluoreszenzmarkierungen gehören beispielsweise Coumarin, Fluorescein und Fluoresceinderivate. Zu den Lumineszenzmarkierungen gehören beispielsweise Adamantyloxiranderivate. Zu den chromogenen Markierungen gehören beispielsweise Sulfonphthaleine, Sulfonphthaleinderivate sowie Indoxylverbindungen und ihre Derivate.

[0027] Zu den spezifischen Beispielen für Enzymsubstrate gehören Coumarin-4-essigsäure-7-O-caprylat, Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-glucuronid und Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid.

[0028] Die Immobilisierung von Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid über einen mit Azlacton funktionalisierten festen Träger weist die folgende Struktur auf (wobei "B-D-" "beta-D" bedeutet):



[0029] Bei dem aus diesem Vorgang resultierenden immobilisierten Farbstoff handelt es sich um ein synthetisches Edukt für Dealkylasen (wie z.B. Galactosidase). Solche Enzyme spalten die Ethergruppen und produzieren dadurch ein Signal von dem immobilisierten Fluoreszenzfarbstoff 7-Hydroxy-coumarin-4-essigsäure (d.h. einem Derivat des Essigsäure-funktionellen Farbstoffs), das nachgewiesen werden kann.

[0030] Dabei lassen sich nicht nur synthetische Enzymsubstrate, sondern auch natürlich vorkommende, mit einem Farbstoff markierte Enzymsubstrate auf einem festen Träger immobilisieren. So kann beispielsweise Ei-albumin-Lysozym auf einem festen Träger immobilisiert und danach mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Flu-

oresceinisothiocyanat, markiert werden. Nach Kontakt mit dem Enzym Trypsin zerfällt dieses Enzymsubstrat, wobei Fluorescein und fluoresceinmarkierte Fragmente des Lysozys freigesetzt werden.

Bakterien und Bakteriophagen

[0031] Die Art von Bakterien, die sich unter Verwendung des Verfahrens und des immobilisierten Enzymsubstrats der vorliegenden Erfindung nachweisen lassen, ist unbegrenzt. Zu den Ziel-Bakterien, die sich als Wirte für Bakteriophagen eignen und erfindungsgemäß nachweisbar sind, gehören, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die Bakterien der folgenden Genera: Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Staphylococci, Shigella, Listeria, Aerobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Haemophilus und Bordetella. Solche Bakterien lassen sich auch als Reagenzien in Verfahren der vorliegenden Erfindung einsetzen.

[0032] Die Art von Bakteriophagen, die sich unter Verwendung des Verfahrens und des immobilisierten Enzymsubstrats der vorliegenden Erfindung nachweisen lassen, ist unbegrenzt. Zu den geeigneten Ziel-Bakteriophagen, die mit Wirsbakterien wechselwirken können und erfindungsgemäß nachweisbar sind, gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden: Escherichia-Phage, Enterobacter-Phage, Salmonella-Phage, Staphylococci-Phage, Shigella-Phage, Listeria-Phage, Aerobacter-Phage, Klebsiella-Phage, Proteus-Phage, Pseudomonas-Phage, Streptococcus-Phage, Chlamydia-Phage, Mycoplasma-Phage, Pneumococcus-Phage, Neisseria-Phage, Clostridium-Phage, Bacillus-Phage, Corynebacterium-Phage, Mycobacterium-Phage, Campylobacter-Phage, Vibrio-Phage, Serratia-Phage, Providencia-Phage, Chromobacterium-Phage, Brucella-Phage, Yersinia-Phage, Haemophilus-Phage und Bordetella-Phage. Solche Phagen lassen sich auch als Reagenzien in erfindungsgemäßem Verfahren einsetzen. Sie sind typischerweise von der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich oder lassen sich natürlicherweise isolieren und können beispielsweise in Form lyophilisierter Pellets verwendet werden.

[0033] Eine große Vielzahl von Enzymen wird nach der Lyse von Bakterienzellen mit Bakteriophagen produziert. Das freigesetzte Enzym reagiert mit einem immobilisierten Enzymsubstrat unter Erhalt eines nachweisbaren Signals. Zu den Beispielen gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, beta-Galactosidase (beta-Gal), beta-Glucuronidase, Alkoholdehydrogenase oder andere NAD-Oxidoreduktasen, Transferasen, alkalische Phosphatasen oder andere Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Oxidasen, Gyrasen, Nucleasen (DNasen und RNAsen) sowie Restriktionsenzymen.

[0034] Wirksame Bedingungen, unter denen eine solche Lyse stattfinden kann, sind dem Fachmann allgemein bekannt. Solche Bedingungen sind in E.L. Ellis et al., "The growth of bacteriophage", J. Gen. Physiol., 22, 365 (1939) offenbart, wobei dazu typischerweise ausreichend Zeit bei einer Temperatur von etwa 37°C unter für das Bakterienwachstum geeigneten Bedingungen gehört.

Testarten

[0035] Das Verfahren und das immobilisierte Enzymsubstrat der vorliegenden Erfindung können in verschiedenen Tests eingesetzt werden. Dabei kann das immobilisierte Enzymsubstrat zusammen mit Bakteriophagen zu einer interessierenden Probe zum Nachweis eines Ziel-Bakteriums gegeben werden. Bei dem gewählten Bakteriophagen handelt es sich um einen Bakteriophagen, der die interessierenden Bakterien infiziert und anschließend lysiert. Als Alternative kann das immobilisierte Enzymsubstrat zusammen mit Bakterien zu einer interessierenden Probe zum Nachweis eines Ziel-Bakteriophagen gegeben werden. Bei dem gewählten Bakterium handelt es sich um ein Bakterium, das eine Suszeptibilität für den interessierenden Bakteriophagen aufweist (d.h. das von ihm infiziert und lysiert werden kann).

[0036] In einer Ausführungsform gehört zu einem Verfahren zum Nachweis eines Ziel-Bakteriophagen, daß man: Bakterien und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt; das Reaktionsgemisch unter für einen eventuell in der interessierenden Probe vorhandenen Ziel-Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse der Bakterien und zur Freisetzung von Enzym inkubiert; ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt und das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht. Dabei kann die Zugabe des immobilisierten Enzymsubstrats zu dem Reaktionsgemisch vor oder nach Inkubation des Reaktionsgemischs erfolgen.

[0037] In einer weiteren Ausführungsform gehört zu einem Verfahren zum Nachweis von Ziel-Bakterien, daß

man: einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt; das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell in der interessierenden Probe vorhandener Bakterien und zur Freisetzung von Enzym inkubiert; ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt und das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht. Die Zugabe des immobilisierten Enzymsubstrats zu dem Reaktionsgemisch kann dabei vor oder nach Inkubation des Reaktionsgemischs erfolgen.

[0038] Bei diesen Verfahren kann eine qualitative oder quantitative Bestimmung erfolgen. Beispielsweise kann zur quantitativen Bestimmung von Bakteriophagen das Reaktionsgemisch auf ein entsprechendes Wachstumsmedium ausplattiert werden, wobei dann die das nachweisbare Signal abgebenden Zonen gezählt werden. Solche Zonen werden typischerweise zu Plaques (d.h. klare Zonen oder durch Bakteriophagen hervorgerufene Unterbrechungen auf einem Rasen von bakteriellen "Helperzellen") nach einer genügend langen Zeitdauer. Ein Standard-Testverfahren zum Nachweis von Plaques ist in Standard Test Method for Coliphages in Water, ASTM Designation; D4201-82 (Reapproved 1989) beschrieben.

[0039] Vorzugsweise erfolgt in einem quantitativen Test für Bakterien eine Phagenamplifikation, so daß Bakterien durch Beobachtung der Bildung von Plaques nachgewiesen werden. Im allgemeinen gehört zu diesem Verfahren, daß man: einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt; den Bakteriophagen eventuell in der interessierenden Probe vorhandene Bakterien infizieren läßt; ein Antivirusmittel zur Inaktivierung von eventuell vorhandenem extrazellulärem Bakteriophagen zugibt; Helper-Bakterienzellen zu dem Reaktionsgemisch gibt; ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt; das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell vorhandener Ziel-Bakterien und der Helper-Bakterienzellen und zur Freisetzung von Enzym inkubiert und das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht. Falls keine Ziel-Bakterien vorhanden sind, wird der Bakteriophage durch das Antivirusmittel vollkommen inaktiviert, und es findet keine Lyse der Helper-Bakterienzellen statt. Dieses Verfahren wird vorzugsweise für die quantitative Bestimmung von Bakterien in einer Probe verwendet, obwohl dabei auch eine qualitative Bestimmung erfolgen kann.

[0040] Das immobilisierte ES würde mit dem durch die Bakteriophageninfektion der Ziel-Bakterien und anschließendes Aufbrechen (Lyse) der Zellwand freigesetzten bakteriellen Enzymen reagieren, doch würde das immobilisierte ES nicht eine Bakterienzellwand durchqueren, um mit noch in den intakten Bakterienzellen vorhandenem Enzym zu reagieren. Daher könnte ein immobilisiertes ES in den letzten Schritten eines Tests eingesetzt werden, um ein Signal zu produzieren, das das Vorhandensein von Ziel-Bakterien in der ursprünglichen Probe anzeigt, wobei keine oder nur eine geringe Störung von bakteriellen "Helperzellen" oder nicht-Ziel-Bakterien auftritt.

[0041] Bei den geeigneten Helper-Bakterienzellen kann es sich um die gleichen oder um andere Bakterien als die Ziel-Bakterien handeln. Sie sind vorzugsweise mit den Ziel-Bakterien eng verwandt, so daß sie mit dem gewählten Bakteriophagen infiziert werden können. Zu den Helper-Bakterienzellen gehören beispielsweise die oben aufgeführten Beispiele für die Ziel- und Reagenz-Bakterien.

[0042] Die Phagenamplifikation kann auf einer Vielzahl von dem Fachmann bekannten Kulturmedien stattfinden. Ein Kulturmedium enthält normalerweise verschiedene Nährstoffe, einschließlich einer Kohlenstoffquelle, wie z.B. einem Kohlenhydrat, und einer Stickstoffquelle, wie z.B. einer Aminosäure oder Proteinhydrolysat. Als Alternative kann die Amplifikation auf einer festen oder halbfesten Kulturvorrichtung, wie z.B. einer "PETRI-FILM"-Vorrichtung, wie sie im US-Patent Nr. 5,958,675 (Wicks et al.) offenbart ist, erfolgen.

[0043] Ebenso kann man das Verfahren und das immobilisierte Enzymsubstrat in die in der WO 01 25395 (Wicks et al.), eingereicht am 5. November 1999, offenbarte Vorrichtung einbauen, die mindestens zwei durch einen aktivierbaren Verschluß (d.h. eine Komponente, wie z.B. ein Ventil, die die zwei Kompartimente voneinander trennt, so daß ein Lecken verhindert wird) voneinander getrennte Kammern enthält, wobei nach Aktivierung des Verschlusses die beiden Kammern in Verbindung stehen. Vorzugsweise liegt diese Vorrichtung in Form einer Röhre vor, die verschiedene Querschnittsformen aufweisen kann, obwohl andere Konstruktionen (z.B. rechteckige oder kreisförmige Röhren, Kanäle auf einem flachen Substrat oder mikroreplizierte Strukturen) in Betracht kommen.

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Vorrichtung zum Nachweis von Bakterien (Ziel-Bakte-

rien) verwendet, indem ein Bakteriophage zu einer Testprobe gegeben wird, um die Ziel-Bakterien in der Testprobe zu infizieren, die extrazellulären Bakteriophagen mit einem Antivirusmittel (oder einem Gemisch aus Antivirusmitteln, wie z.B. Eisensalzen, Kupfersalzen, Blattextrakten, Granatapfelschalenextrakten sowie organischen Säuren, die zur Abtötung extrazellulärer Bakteriophagen geeignet sind) abgetötet werden, das Antivirusmittel (beispielsweise mit einem Puffer) neutralisiert, ein immobilisiertes ES zugegeben wird und die Bakteriophagen durch Inkubation des erhaltenen Gemischs in Gegenwart eines Rasens von Helfer-Bakterienzellen amplifiziert werden. Solche Phagenamplifikationstests, bei denen die Plaquebildung als Endbildung (und kein ES) verwendet wird, sind dem Fachmann bekannt und im US-Patent Nr. 5,498,525 (Rees et al.) offenbart. In Gegenwart eines immobilisierten ES wie in Beispiel 4 der vorliegenden Erfindung beschrieben, ist das Auftreten eines Fluoreszenzsignals ein Zeichen dafür, daß die Testprobe die Ziel-Bakterien enthielt. Die Testergebnisse in Form eines Fluoreszenzsignals können schnell abgelesen werden, typischerweise innerhalb von etwa vier Stunden bis etwa sechs Stunden, wobei, falls notwendig, eine Bestätigung nach 24 Stunden erfolgen kann. Herkömmliche Verfahren zur Bakterienzählung erfordern normalerweise etwa 24stündiges bis etwa 48stündiges Wachstum.

BEISPIEL 1

An einen unlöslichen Träger gebundenes Enzymsubstrat

[0045] Das Ziel dieses Experiments bestand darin, ein an eine unlösliche Trägersubstanz (Azlacton-Kügelchen) kovalent gebundenes Enzymsubstrat (Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid) herzustellen.

[0046] Eine Probe (10 g) aus Azlacton-Kügelchen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) wurde mit 1,6-Hexandiamin (wie in Beispiel 11 des US-Patents Nr. 5,561,097 beschrieben) unter Erhalt einer freien Aminogruppe an jeder Azlacton-Stelle derivatisiert. Dabei wurden ungefähr 41 mmol Aminäquivalente pro ml Azlacton-Kügelchensuspension eingesetzt. Eine Probe (200 g) der derivatisierten Azlacton-Kügelchen wurde zu einer Lösung des fluorogenen Substrats Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid (10 mg, Sigma, St. Louis, MO), von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (5,4 mg, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBr) (7 mg, Aldrich Chemical), jeweils in DM F, gegeben, so daß ein Gesamtvolumen von 3 ml erhalten wurden. Das erhaltene Gemisch wurde kontinuierlich 5 Tage bei Raumtemperatur auf einem Labor-Röhrchenschüttler geschüttelt. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen und die Kügelchen mit reichlichen Wassermengen gewaschen und in Wasser resuspendiert (1 ml). Die erhaltene Suspension zeigte eine sehr geringe Fluoreszenz, wobei nach Zentrifugation der Suspension die gesamte Fluoreszenz im Kügelchenpellet vorlag. Der flüssige Überstand aus der Zentrifugation gab kein über dem Hintergrund liegendes Fluoreszenzsignal nach Zugabe des gereinigten Enzyms beta-Galactosidase (beta-Gal). Nach Zugabe von beta-Gal zu dem in frischem Puffer (Butterfields Puffer, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) resuspendierten Kügelchenpellet wurde jedoch ein sehr starkes Fluoreszenzsignal beobachtet.

BEISPIEL 2

An einen unlöslichen Träger gebundenes Enzymsubstrat in Gegenwart von E. Coli-Zellen und Bakteriophagen

[0047] Das Ziel dieses Experiments bestand darin, das von einem an einen unlöslichen Träger in Gegenwart von E. Coli-Zellen, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Bakteriophagen, gebundenen Enzymsubstrat produzierte Fluoreszenzsignal zu beobachten.

[0048] Eine Probe (50 mg Kügelchen) des Enzymsubstrats Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid, das kovalent an den unlöslichen Azlacton-Kügelchenträger gebunden war (wie in Beispiel 1 beschrieben), wurde zu Butterfields Puffer (1 ml, pH 7, Fisher Scientific), der E. Coli 625 Zellen (Silliker Laboratories, Chicago Heights, IL) mit einer Anfangskonzentration von ungefähr 10^8 Zellen/ml enthielt, gegeben. Das erhaltene Gemisch wurde 6–10 Stunden bei 37°C sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit des Bakteriophagen RB33s (10^6 Phagen, T4 Laboratory, Evergreen State College, Olympia, WA), der zur Lyse der E. Coli-Zellen fähig war, inkubiert. Eine Probe der Substratkügelchen lediglich in Butterfields Puffermedium wurde ebenfalls auf die gleiche Weise inkubiert und zeigte kein oder nur ein schwaches Fluoreszenzsignal. Das die E. Coli-Zellen, aber keinen Bakteriophagen, enthaltende inkubierte Medium zeigte nur ein niedriges Hintergrundfluoreszenzniveau. Das die E. Coli-Zellen und die Bakteriophagen enthaltende inkubierte Medium zeigte ein höheres Fluoreszenzniveau. Dieses höhere Fluoreszenzniveau wurde der Lyse der E. Coli-Zellen durch die Bakteriophagen und der nachfolgenden Freisetzung des restlichen beta-Gal-Enzyms zugeschrieben. Das Enzym war dann in der Lage, die Hydrolyse des Kügelchen-geträgerten Enzymsubstrats zu katalysieren, so daß ein Hy-

drolyseprodukt produziert wurde, das ein hochfluoreszierendes Signal emittierte.

BEISPIEL 3

Vergleich des gebundenen Substrats mit nichtgebundenem (freiem) Substrat in Gegenwart von E. Coli-Zellen

[0049] Das Ziel dieses Experiments bestand darin, zu zeigen, daß ein kovalent an eine unlösliche Trägersubstanz (Azlacton-Kügelchen) gebundenes Enzymsubstrat (Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid) nur ein schwaches Fluoreszenzsignal oder niedrige Fluoreszenzsignalniveaus relativ zum freien Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid in Lösung produziert.

[0050] Eine Probe (etwa 200 mg Kügelchen) des Enzymsubstrats Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid, das kovalent an den unlöslichen Azlacton-Kügelchenträger gebunden war (wie in Beispiel 1 beschrieben), wurde in 500 µl sterilem Wasser suspendiert, wonach jeweils 100 µl dieser Suspension in 5 Löcher einer 96-Loch-Platte (Co-Star, V.W.R., Chicago, IL) gegeben wurden. Die Menge an Kügelchen wurde so gewählt, daß die Hydrolyse des Enzymsubstrats ein Fluoreszenzsignal von etwa 4000 relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescent units, RFU) ergeben sollte. Weitere Löcher wurden mit freiem Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid (50 µg/ml) gefüllt und enthielten keine Kügelchen. Danach wurde ein 100-µl-Aliquot entweder von E. Coli 650-Zellen oder E. Coli 651-Zellen (hergestellt durch Zentrifugieren von jeweils 1 ml einer Übernachtkultur von jedem Bakterium, zweimaligem Waschen mit Butterfields Puffer und Resuspendieren in 500 µl frischer Luria-Bertani-(LB)-Brühe) in die Probenlöcher gegeben. Die Lochplatten wurden danach bei 37°C bis zu 6 Stunden inkubiert. Änderungen in der Fluoreszenz der Löcher wurden jeweils unter Verwendung eines Cambridge Instruments Model 7620 Fluorescent Microplate Reader (Cambridge Instruments, Boston, MA) bestimmt. Diejenigen Löcher, die Kügelchen mit kovalent gebundenem Enzymsubstrat enthielten, zeigten keine oder nur geringe Fluoreszenz, während diejenigen, die das freie Enzymsubstrat in Lösung enthielten, einen deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals zeigten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1					
Probe	E. Coli	Fluoreszenz (in RFU) ¹ zu angegebenen Zeiten (in Stunden)			
		0	1,5	2,5	4
Freies Enzym-substrat	560	161	226	337	717
	561	156	300	436	592
Gebundenes Enzym-substrat	560	155	153	157	166
	561	148	170	160	175

¹ Jeder Datenpunkt repräsentiert den Durchschnitt von 5 Replikaten.

BEISPIEL 4

Nachweis von Bakterien unter Verwendung eines immobilisierten Enzymsubstrats

[0051] Eine Phagenamplifikationsvorrichtung (phage amplification device PAD) mit getrennten Kammern A, B, C und D wird wie in Beispiel 3 der WO 01 25395 (Wicks et al.) konstruiert. Die mittleren Kammern B und C enthalten Antiviruskomponenten. Nach der Konstruktion wird ein Pellet lyophilisierter E. Coli-Bakterien ATCC 13706 (ungefähr 1×10^8 cfu/ml) in die Kammer D gegeben, um als bakterielle "Helferzellen" zu dienen. Zusätzlich wird eine Probe (50 mg Kügelchen) des Enzymsubstrats Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid, das kovalent an den unlöslichen Azlacton-Kügelchenträger gebunden ist (wie in Beispiel 1 beschrieben), in die Kammer D gegeben. Die Kammer A wird freigelassen, um die Testprobe aufzunehmen, und alle Ventile werden anfänglich auf eine "geschlossene Position" gestellt.

[0052] Eine Übernachtkultur von E. Coli ATCC 13706 mit 1×10^8 cfu/ml wird stufenweise in Lambda-Puffer (wie in Beispiel 4 des US-Patents Nr. 5,498,525 (Rees et al.) beschrieben) zehnfach verdünnt, so daß die Kammer A des PAD ungefähr 0,1 ml Kulturlösung enthält. Zu dieser Probe werden 10 µl Nutrient Broth (Produkt-Nr.

4311479, BBL, Cockysville, MD)-Suspension des Bakteriophagen [Phi X 174 (ATCC 13706-B1)] mit 1×10^{11} pfu/ml gegeben. Man lässt den Bakteriophagen an die Bakterienzellen 10 Minuten bei 37°C in einem Inkubator absorbieren. Danach wird das Ventil 1 (zwischen Kammern B und C) geöffnet, und man lässt die Antiviruskomponenten der Kammern B und C 2 Minuten bei 23°C miteinander mischen. Nichtabsorbierter Bakteriophage wird dann durch Öffnung des Ventils 2 (zwischen den Kammern A und B) inaktiviert, wobei man die Antiviruslösung mit dem Inhalt der Kammer A 5 Minuten bei 23°C mischen lässt. Die erhaltene Lösung wird dann durch Öffnung des Ventils 3 (zwischen den Kammern C und D) neutralisiert, wobei die Lösung mit dem bakteriellen "Helferzellen"-Pellet und dem immobilisierten Enzymsubstrat in Kammer D 5 Minuten bei 23°C kombiniert wird. Die PAD wird dann bis zu 6 Stunden bei 23°C inkubiert und die Fluoreszenzänderungen werden bestimmt. Das Fluoreszenzsignal ist ein Anzeichen für E. Coli-Bakterien in der ursprünglichen Kultur.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Ziel-Bakteriophagen, wobei man:

- (a) Bakterien und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt;
- (b) das Reaktionsgemisch unter für einen eventuell in der interessierenden Probe vorhandenen Ziel-Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse der Bakterien und zur Freisetzung von Enzym inkubiert;
- (c) ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt; und
- (d) das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht.

2. Verfahren zum Nachweis von Ziel-Bakterien, wobei man:

- (a) einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt;
- (b) das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell in der interessierenden Probe vorhandener Bakterien und zur Freisetzung von Enzym inkubiert;
- (c) ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt; und
- (d) das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht.

3. Verfahren zum Nachweis von Ziel-Bakterien, wobei man:

- (a) einen Bakteriophagen und eine interessierende Probe unter Bildung eines Reaktionsgemischs zusammengibt;
- (b) den Bakteriophagen eventuell in der interessierenden Probe vorhandene Bakterien infizieren lässt;
- (c) ein Antivirusmittel zur Inaktivierung von eventuell vorhandenem extrazellulärem Bakteriophagen zugibt;
- (d) Helfer-Bakterienzellen zu dem Reaktionsgemisch gibt;
- (e) ein immobilisiertes Enzymsubstrat zu dem Reaktionsgemisch gibt;
- (f) das Reaktionsgemisch unter für den Bakteriophagen wirksamen Bedingungen zur Lyse eventuell vorhandener Ziel-Bakterien und der Helfer-Bakterienzellen und zur Freisetzung von Enzym inkubiert; und
- (g) das Reaktionsgemisch hinsichtlich eines von einer Wechselwirkung zwischen dem immobilisierten Enzymsubstrat und eventuell vorhandenem freigesetztem Enzym herrührenden nachweisbaren Signals überwacht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zugabe eines immobilisierten Enzymsubstrats zu dem Reaktionsgemisch vor der Inkubation des Reaktionsgemischs erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Enzymsubstrat ausgewählt ist aus der Gruppe Coumarin-4-essigsäure-7-O-caprylat, Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-glucuronid und Coumarin-4-essigsäure-7-O-beta-D-galactopyranosid.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das immobilisierte Enzymsubstrat aus einem festen Träger und einem kovalent daran gebundenen Enzymsubstrat besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem festen Träger um einen festen Träger mit Azlactonfunktion handelt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei dem nachweisbaren Signal um ein Fluoreszenzsignal, ein Lumineszenzsignal or ein chromogenes Signal handelt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei dem nachweisbaren Signal um ein Fluoreszenzsignal handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Überwachung des Reaktionsgemischs die quantitative Bestimmung der in der Probe vorhandenen Ziel-Bakteriophagenmenge umfaßt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei man bei der quantitativen Bestimmung der in der Probe vorhandenen Ziel-Bakteriophagenmenge das Reaktionsgemisch aus den Bakterien, dem immobilisierten Enzymsubstrat und der interessierenden Probe auf einem Wachstumsmedium ausplattiert und das nachweisbare Signal emittierende Bereiche zählt.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bakterien ausgewählt sind aus der Gruppe Escherichia, Enterobacter, Salmonella, Staphylococci, Shigella, Listeria, Aerobacter, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus, Chlamydia, Mycoplasma, Pneumococcus, Neisseria, Clostridium, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Campylobacter, Vibrio, Serratia, Providencia, Chromobacterium, Brucella, Yersinia, Haemophilus und Bordetella.

13. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Überwachung des Reaktionsgemischs die quantitative Bestimmung der in der Probe vorhandenen Ziel-Bakterienmenge umfaßt.

14. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Bakteriophage ausgewählt ist aus der Gruppe Escherichia-Phage, Enterobacter-Phage, Salmonella-Phage, Staphylococci-Phage, Shigella-Phage, Listeria-Phage, Aerobacter-Phage, Klebsiella-Phage, Proteus-Phage, Pseudomonas-Phage, Streptococcus-Phage, Chlamydia-Phage, Mycoplasma-Phage, Pneumococcus-Phage, Neisseria-Phage, Clostridium-Phage, Bacillus-Phage, Corynebacterium-Phage, Mycobacterium-Phage, Campylobacter-Phage, Vibrio-Phage, Serratia-Phage, Providencia-Phage, Chromobacterium-Phage, Brucella-Phage, Yersinia-Phage, Haemophilus-Phage und Bordetella-Phage.

15. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Überwachung des Reaktionsgemischs das Ausplattieren des Reaktionsgemischs aus den Helfer-Bakterienzellen, den immobilisierten Enzymsubstraten und der interessierenden Probe auf einem Wachstumsmedium und das Zählen von das nachweisbare Signal emittierenden Bereichen umfaßt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen