



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8303506**

Nederland

⑲ NL

-
- ⑤4 **Toeslagstof voor voedingsbodems voor het kweken van Campylobacter jejuni.**
- ⑤1 Int.Cl³: C12N 1/20.
- ⑦1 Aanvrager: Institut Virion AG te Rüschlikon, Zwitserland.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8303506.
- ②2 Ingediend 12 oktober 1983.
- ③2 Voorrang vanaf 20 oktober 1982.
- ③3 Land van voorrang: Bondsrepubliek Duitsland (DE).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: P 3238819 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 16 mei 1984.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel: Toeslagstof voor voedingsbodems voor het kweken van Campylobacter jejuni.

De uitvinding betreft een toeslagstof voor voedingsbodems voor het selectief kweken van Campylobacter jejuni, welke toeslagstof tenminste één antimicrobe middel bevat.

Sedert enige jaren is bekend, dat het bacteriegeslacht Campylobacter bij het veroorzaken van gastroenteritis een belangrijke rol speelt. In het bijzonder de soort Campylobacter faetus subsp. jejuni; hieronder kortweg Campylobacter jejuni genoemd, werd als voor mensen en vele dieren bijzonder gevaarlijk gevonden. Er bestaat derhalve behoefte aan voor diagnoses en/of een medicamenten- respectievelijke resistentieonderzoek deze Campylobacter jejuni selectief te kweken.

Om zoveel mogelijk te vermijden, dat op een bacteriologische voedingsbodem naast Campylobacter jejuni nog andere microorganismen belangrijk vermeerderen, heeft men reeds aan de gebruikte voedingsbodems bepaalde antimicrobe-middelen toegevoegd, waartegen Campylobacter jejuni vergeleken met andere microorganismen een verhoogde resistentie bezit. Bekend zijn aan de voedingsbodem toe te voegen supplementen, die bijvoorbeeld één of meer van de volgende antimicrobe-middelen bevatten: polymycine, rifampicine, trimethoprim, actidion, colistine, bacitracine, novobiocine, cycloheximide, cefazoline, en amfotericine.

De uitvinding beoogt nu een supplement van de boven weergegeven soort, waarvan het selectieve effect ten gunste van Campylobacter jejuni aanmerkelijk beter is dan bij de tot dusver bekende toeslagstoffen van dit soort.

De onderhavige toeslagstof, waarmee de gestelde taak kon worden verricht, onderscheidt zich van bekende toeslagstoffen van de bovengenoemde soort door het feit, dat als antimicrobe-middel cefoperazon wordt gebruikt.

Tot dusver is cefoperazon als antimicrobe middel in toeslagstoffen voor voedingsbodems voor het selectief kweken van Campylobacter jejuni nog niet eerder gebruikt. Gebleken is, dat cefoperazon een bijzonder uitgesproken selectieve antimicrobe-activiteit in de gewenste zin kan uitoefenen.

8303506

Bij voorkeur bevat het onderhavige supplement als antimicrobe-actieve stoffen naast cefoperazon nog rifampicine en liefst ook nog amfotericine B en colistine.

De toeslagstof wordt volgens een verdere uitvoeringsvorm van de uitvinding gemengd met een bacteriologische voedingsbodem voor het selectief kweken van Campylobacter jejuni aldus toegepast, dat op telkens 1 cm³ totaal mengsel ca. 15 µg cefoperazon en ca. 10 µg rifampicine en eventueel bovendien nog ca. 2 µg amfotericine B en ca. 10 I.E. colistine worden gebruikt. Een dergelijke samenstelling maakt een zeer goede groei van Campylobacter jejuni mogelijk, terwijl de groei van de ongewenste begeleidende flora significant wordt geremd. Hierdoor wordt een isolatie van de pathogene verwekker Campylobacter jejuni aanmerkelijk vergemakkelijkt.

Een goede oplosbaarheid in water is een verder voordeel van de onderhavige toeslagstof.

De volgende voorbeelden lichten de uitvinding nader toe.

VOORBEELD I

Aan een gebruikelijke bacteriologische voedingsbodem, bestaande uit 1 liter columbia agar en 50 cm³ schapebloed werd een toeslagstof bijgemengd, die 3 gewichtsdelen cefoperazon en 2 gewichtsdelen rifampicine bevatte. De concentratie werd aldus gekozen, dat op telkens 1 cm³ totaalmengsel ca. 15 µg cefoperazon ca. 10 µg rifampicine werden gebruikt. Dit voedingsbodemmengsel wordt hieronder als "1-A" aangeduid.

Ter vergelijking met de stand van de techniek werd een tweede hieronder met "1-B" aangeduid voedingsbodemmengsel bereid, dat de volgende samenstelling had: 1 liter columbia-agar, 50 cm³ schapebloed en een tot dusver als bijzonder selectief beoordeelde toeslagstof, die per 1 cm³ totaalmengsel 25 I.E. bacitracine, 50 µg cycloheximide, 10 I.E. colistine, 15 µg cefazoline en 5 µg novobiocine bevatte.

759 steriele petrischalen werden met voedingsbodemmengsel 1-A en hetzelfde aantal steriele petrischalen met het tweede voedingsbodemmengsel 1-B bekleed. Vervolgens werden alle schalen op de bij bacteriologische onderzoeken gebruikelijke wijze met monsters van een en dezelfde menselijke ontlasting geïncubeerd, waarna men alle schalen bij

8503503

37°C in een atmosfeer van 85% stikstof, 10% kooldioxyde en 5% zuurstof liet rusten.

Na 20 uren kon in 55 schalen (7,24%) met voedingsbodemmengsel 1-A en in 56 schalen (7,737%) met voedingsbodemmengsel 1-B de aanwezigheid van Campylobacter jejuni worden vastgesteld. Zo werd met de in voedingsbodemmengsel 1-A aanwezige toeslagstof volgens de uitvinding praktisch dezelfde goede groei van Campylobacter jejuni bereikt als met het in het tweede voedingsbodemmengsel 1-B aanwezige bekende supplement. Verschillen bleken echter duidelijk wat betreft de groei van de begeleidendeflora. Slechts 11% in 65% van de schalen kon een ongeveer even sterke groei van de begeleidendeflora op voedingsbodemmengsel 1-A en 1-B worden vastgesteld. 15% van alle schalen vertoonden een vermeerderde groei van de begeleidendeflora op voedingsbodemmengsel 1-A, terwijl 20% van alle schalen een verhoogde groei van de begeleidendeflora op de tweede voedingsbodem 1-B liet zien.

De op een gebruikelijke wijze uitgevoerde isolaties leidden wat betreft de begeleidendeflora tot de volgende resultaten: op voedingsbodemmengsel 1-A vertoonden na de eerste isolatie 10%, na twee isolaties 3% en na drie isolaties 2% van alle schalen een vrij sterke groei van de begeleidendeflora, voornamelijk gisten en colibacteriën. Op het voedingsbodemmengsel 1-B daarentegen vertoonden na de eerste isolatie 13%, na twee isolaties 13% en na drie isolaties 4% van alle schalen een vrij sterke groei van de begeleidendeflora, voornamelijk coccen en Pseudomonas-organismen.

Hieruit blijkt, dat op het de onderhavige toeslagstof bevattende voedingsbodemmengsel 1-A de pathogene kiemen Campylobacter jejuni beter van de begeleidendeflora konden worden gescheiden dan op het de bekende toeslagstof houdende voedingsbodemmengsel 1-B, omdat kennelijk het onderhavige supplement een sterker antimicrobe-effect op de begeleidendeflora uitoefent dan de bekende toeslagstof, zonder dat de groei van Campylobacter wordt verminderd.

VOORBEELD II

Aan een bacteriologische voedingsbodem, bestaande uit 1 liter columbia agar en 50 cm³ schapebloed werd een toeslagstof toegemengd,

0.5 g 1.1.1.1.1

die volgens de uitvinding de antimicrobe stoffen cefoperazon, rifampicine, amfoterizine B en colistine bevatte. De concentratie was zodanig, dat op telkens 1 cm³ totaalmengsel ca. 15 µg cefoperazon, 10 µg rifampicine, 2 µg amfoterizine B en 10 I.E. colistine werden gebruikt. Dit voedingsbodemmengsel wordt hieronder als "2-A" aangeduid.

Ter vergelijking met de stand van de techniek werd wederom het in voorbeeld I weergegeven, bekende voedingsbodemmengsel 1-B gebruikt.

1570 steriele petrischalen werden met het voedingsbodemmengsel 2-A en hetzelfde aantal steriele petrischalen met het bekende voedingsbodemmengsel 1-B bekleed. Vervolgens werden alle schalen op de gebruikelijke wijze met monsters van een menselijke ontlasting geïncubeerd, waarna men alle schalen in een atmosfeer van 85% stikstof, 10% kooldioxyde en 5% zuurstof bij 37°C liet rusten.

Na 18 uren kon in 148 schalen (9,42%) met mengsel 2-A en in 146 schalen (9,29%) met het bekende voedingsbodemmengsel 1-B een vermeerdering van Campylobacter jejuni worden vastgesteld. Het voedingsbodemmengsel 2-A heeft dus geen remmende invloed op de groei van Campylobacter jejuni, vergeleken met het bekende mengsel 1-B.

Nog duidelijker dan bij voorbeeld I was het verschil in groei van de begeleidente flora. Bij 71,6% van de schalen met voedingsbodemmengsel 2-A kon geen groei van de begeleidente flora worden vastgesteld, daarentegen slechts bij 45,7% van de schalen met het bekende voedingsbodemmengsel 1-B. Bij de overige 28,4% van de schalen met voedingsbodemmengsel 2-A zag men een begeleidente flora en wel in het eerste kwadrant bij 23,1%, in het tweede kwadrant bij 3,6%, in het derde kwadrant bij 1,0% en in het vierde kwadrant bij 0,7% van alle schalen met voedingsbodemmengsel 2-A. Daarentegen werd bij 45,3% van de schalen met het bekende voedingsbodemmengsel 1-B een groei van de begeleidente flora vastgesteld, en wel in het eerste kwadrant bij 37,6%, in het tweede kwadrant bij 10,0%, in het derde kwadrant bij 2,9% en in het vierde kwadrant bij 3,8% van alle schalen met voedingsbodemmengsel 1-B.

Hieruit blijkt, dat de beoogde selectieve groei van Campylobacter jejuni met een de onderhavige toeslagstof bevattend voedingsbodemmengsel 2-A aanmerkelijk efficiënter slaagt, dan met het bekende voedingsbodemmengsel 1-B, omdat het onderhavige supplement beter geschikt is de groei van de begeleidente flora te onderdrukken dan de bekende toeslagstof.

8503506

Het in voorbeeld II beschreven supplement met de antimicrobe-actieve stoffen cefoperazon, rifampicine, amfotericine B en colistine is ook in de gewenste zin actiever gebleken dan het in voorbeeld I beschreven supplement, dat slechts cefoperazon en rifampicine bevatte.

5 Daarom geniet de in voorbeeld II genoemde onderhavige toeslagstof de voorkeur.

De uitvinding omvat echter alle voor voedingsbodems voor het selectief kweken van Campylobacter jejuni bestemde toeslagstoffen, die cefoperazon met eventueel andere antimicrobe middelen bevatten.

C O N C L U S I E S

1. Toeslagstof voor voedingsbodems voor het selectief kweken van Campylobacter jejuni, welke toeslagstof tenminste één antimicrobe-actieve stof bevat, met het kenmerk, dat als antimicrobe-actieve stof cefoperazon aanwezig is.
- 5 2. Toeslagstof volgens conclusie 1 met het kenmerk, dat deze als antimicrobe-actieve stoffen naast cefoperazon nog rifampicine bevat.
3. Toeslagstof volgens conclusie 2 met het kenmerk, dat deze op 3 gewichtsdelen cefoperazon ca. 2 gewichtsdelen rifampicine bevat.
4. Toeslagstof volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat deze als
10 antibacteriëel-actieve stoffen naast cefoperazon nog rifampicine en amfotericine B bevat.
5. Toeslagstof volgens conclusie 4 met het kenmerk, dat deze op 15 gewichtsdelen cefoperazon ca. 10 gewichtsdelen rifampicine en ca. 2 gewichtsdelen amfotericine B bevat.
- 15 6. Toeslagstof volgens conclusie 1 met het kenmerk, dat deze als antibacteriëel-actieve stoffen naast cefoperazon nog rifampicine, amfotericine B en colistine bevat.
7. Toeslagstof volgens conclusie 6 met het kenmerk, dat de antimicrobe-actieve stoffen in de volgende verhoudingen aanwezig zijn:
20 cefoperazon 10 - 20 µg
 rifampicine 7 - 13 µg
 amfotericine B 1 - 3 µg
 colistine 5 - 15 I.E.
8. Toeslagstof volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat de anti-
25 microbe-actieve stof ongeveer in de volgende verhoudingen aanwezig zijn:
 cefoperazon 15 µg
 rifampicine 10 µg
 amfotericine B 2 µg
 colistine 10 I.E.
- 30 9. Toepassing van de toeslagstof volgens conclusie 1 gemengd met een bacteriologische voedingsbodem voor het selectief kweken van Campylobacter

8303506

met het kenmerk, dat op 1 cm³ totaalmengsel ca. 15 µg cefoperazon wordt gebruikt.

10. Toepassing van de toeslagstof volgens conclusie 2 gemengd met een bacteriologische voedingsbodem voor het selectief kweken van Campylobacter met het kenmerk, dat in telkens 1 cm³ totaalmengsel ca. 15 µg cefoperazon en ca. 10 µg rifampicine worden gebruikt.

11. Toepassing van de toeslagstof volgens conclusie 6 gemengd met een bacteriologische voedingsbodem voor het selectief kweken van Campylobacter met het kenmerk, dat per 1 cm³ totaalmengsel ca. 15 µg cefoperazon, ca. 10 µg rifampicine, ca. 2 µg amfotericine en ca. 10 I.E. colistine worden gebruikt.