

(19) DANMARK

(10) DK 2003 01392 L



(12) PATENTANSØGNING

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: C 12 Q 1/04 C 12 N 1/00

(21) Patentansøgning nr: PA 2003 01392

(22) Indleveringsdag: 2003-09-25

(24) Løbedag: 2003-09-25

(41) Alm. tilgængelig: 2005-03-26

(71) Ansøger: Torben Jensen, Polarvej 60, 7100 Vejle, Danmark

(72) Opfinder: Torben Jensen, Polarvej 60, 7100 Vejle, Danmark

(54) Benævnelse: Generel metode til opformering og påvisning af patogene bakterier

(57) Sammendrag:

Opfindelsen angår en horisontal hurtig-metode til opformering og påvisning af patogene bakterier i en prøve, herunder fæces.

PATENTKRAV

1. Horisontal fremgangsmåde til opformering og påvisning af patogene bakterier i en prøve herunder Salmonella, Listeria, E. coli, Campylobacter, Yersinia mfl. fra fæces, 5
levnedsmidler, foder og øvrige produkter mennesker eller hus- og kæledyr kan indtage eller kan komme i kontakt med, hvor øvrige produkter indbefatter, men er ikke afgrænset til fjer, støv, dun, spildevand og HACCP- prøver.

hvilken fremgangsmåde som minimum indbefatter:

- 10 - en opformering af patogene target-bakterier i en præ-opformeringsbuffer og
- en overførsel af et transfervolume (et delvolume af præ-opformeringsbufferen) til en for target-bakterierne selektiv opformeringsbuffer, hvilken selektiv opformeringsbuffer som minimum indeholder en 'agent' der ikke tåles eller tåles dårligere af 'non-target' bakterierne (følge floraen) eller andre selektive pres på 'non-target' bakterierne fx pH og osmose, 15

KENDETEGNET VED

- at præ-opformeringsmedie er opvarmet til over stuetemperatur , fortrinsvis over 28°C,
- at transfervolumet fra præopformeringen til den selektive opformering foretages efter 20
mindre end 14 timer og
- at transfervolumet er på fortrinsvis mindst 1 ml resp. mindst 1/200 af det selektive vækstmedie.

2. Fremgangsmåde iflg. krav 1 KENDETEGNET VED at koncentrationen af vækstmediet i 25
den modtagne selektive opformeringsbuffer har en vækstmediekoncentration, der er lig med eller væsentlig højere end anbefalet af vækstmedieproducenten eller godkendte fremgangsmåder for den patogene target-bakterie efter at transfervolumet er blevet tilført det selektive vækstmedie.

- 30 3. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at præ-opformeringsmediet er forvarmet til en temperatur fortrinsvis over 30°C, mere fortrinsvis over 32°C, mest fortrinsvis over 34°C.

- 35 4. Fremgangsmåde iflg. krav 1 KENDETEGNET VED at præ-opformeringsmediet er forvarmet til 37°C +/- 3°C, fortrinsvis til 37°C .

5. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at overførslen af et transfervolume fra præopformeringen til den selektive opformering fortrinsvis foretages efter mindre end 12 timer, mere fortrinsvis efter 6 +/- 4, mere fortrinsvis efter 6 +/- 2 timer, mest fortrinsvis efter 6 timer.
6. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at overførslen af et transfervolume fra præopformeringen til den selektive opformering fortrinsvis foretages efter mindre end 2 timer.
7. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at transfervolume fra præopformeringen til den selektive opformering fortrinsvis er på mindst 2 ml, fortrinsvis er på mindst 5 ml, fortrinsvis er på mindst 10 ml, fortrinsvis er på mindst 20 ml, fortrinsvis er på mindst 50 ml, resp. fortrinsvis mindst 1/100, fortrinsvis mindst 1/40, fortrinsvis mindst 1/20, fortrinsvis mindst 1/10, fortrinsvis mindst 1/4 af det selektive vækstmedie.
8. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at fremgangsmåden anvendes til afklaring af tilstedeværelsen af en enkelt patogen bakterie i et undersøgt produkt.
9. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at den patogene bakterie er salmonella.
10. Fremgangsmåde iflg. krav KENDETEGNET VED at der anvendes SELECTA BIOLINE substrat ved den selektive opformering.
11. Fremgangsmåde til opformering og påvisning af patogene bakterier i en prøve iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at der anvendes en præ-opformeringsbuffer og mindst 2 selektive vækstmedier.
12. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at det initiale opformeringsmedie tilsættes vækstfremmere, resuscitationsfremmere eller selektive eller delvis selektive stoffer såsom selenit, tetrathionat, Novobiocin, antibiotika, Brilliantgrønt eller Malakitgrønt.

13. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at den selektive opformering forkortes til 1, 2, 4, 6, 8 eller 17 timer.
- 5 14. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at den anden buffer anvendt ved opformeringen af targetorganismer indeholder tetrathionat, Brilliantgrønt eller Malakitgrønt.
- 10 15. Fremgangsmåde til opformering og påvisning af (eventuelle) patogene bakterier i en prøve iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at der ved detektionstrinet anvendes en analysemetode, der er indbefattet af, men ikke afgrænset til: affinitets bindings teknikker såsom enzyme immunoassays (ELISA) baseret på antigen-antistof reaktioner, antigen-antistof reaktioner der involverer fluorescens, luminescens, evanescent waves, plasmon resonance, latex agglutination, elektrokemisk immune
- 15 detektion, teknikker med immunmagnetisk indfangning, teknikker med lateral flow, DNA hybridisering baseret på specifikke sekvenser af salmonella DNA molekylet, RNA-DNA, RNA-RNA, Polymerase Chain Reaction (PCR) baseret på multiplikation ved hjælp af specifikke DNA primere, ledningsevne målemetode baseret på ændring i elektrisk modstand
- 20 i særlige vækstmedier, mikroskopi, teknikker med micro arrays, CCD kamera teknik, enzym immuno teknik baseret på chromogen, fluorescens, luminescens, radioaktiv signal genererende respons, halvflydende agarer og faste agarer eller kombination med yderligere opformeringsprocedurer.
- 25 16. Fremgangsmåde til opformering og påvisning af (eventuelle) patogene bakterier i en prøve iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at der ved detektionstrinet anvendes ELISA test kit fra Bioline ApS.
- 30 17. Fremgangsmåde iflg. ethvert af de forgående krav KENDETEGNET VED at overførslen af transfervolumet fra præopformeringen til den selektive opformering foretages automatisk eller semiautomatisk.