

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 153333 B

(21) Patentansøgning nr.: 2307/79

(51) Int.Cl.⁴

C 12 Q 1/04
G 01 N 33/48

(22) Indleveringsdag: 01 jun 1979

(41) Alm. tilgængelig: 06 dec 1979

(44) Fremlagt: 04 jul 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 05 jun 1978 NL 7806086

(71) Ansøger: *GIST-BROCADES N.V.; Wateringseweg 1; P.O. Box 1; 2600 MA Delft, NL

(72) Opfinder: Robert *Beukers; NL, Jan Lambert Van *Os; NL

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en enhed til bestemmelse af antibiotika - og sulfonamidrester i biologiske væsker samt enheder fremstillet ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

GB pat. nr. 1467439
Andre publikationer. Acta. vet. Scand. 17, (1976), 458-464

(57) Sammendrag:

2307-79

Fremgangsmåde til fremstilling af en enhed til bestemmelse af antibiotika- og sulfonamidrester i biologiske væsker, den herved fremstillede enhed og en fremgangsmåde til at udføre bestemmelsen. Sporer fra en mikroorganisme, der har en bred følsomhed overfor de antibiotika og sulfonamider, der skal undersøges for, sættes til en agaropløsning, således at de ikke kan formere sig på grund af mangel på næringsstoffer og/eller lav temperatur, men forbliver i live, medens følsomheden overfor sulfonamider er forøget ved tilsætning af en lille mængde trimethoprim, hvorefter agaropløsningen størknes i rør af fortrinsvis gennemsigtigt materiale. Enheden er meget anvendelig til bestemmelse af antibiotika og sulfonamidrester i f.eks. mælk, og kan udføres af ikke-fagmænd. Undersøgelsen udføres ved at sætte næringsstoffer, (hvis de stadig mangler), samt en mængde prøve til enheden og inkubere analyseenheden i et valgt tidsrum ved en valgt temperatur.

DK 153333 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en enhed til bestemmelse af antibiotika- og sulfonamidrester i biologiske væsker såsom mælk, kødsoft, serum og urin. Opfindelsen angår endvidere selve enheden fremstillet ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

En tilsvarende fremgangsmåde er blevet beskrevet af Gudding, Acta. Vet. Scand. 17 (1976) side 458 til 464, hvori der anvendes modificerede agarmedium plader på samme måde som beskrevet af Galesloot et al, Netherlands Milk and Dairy Journal nr. 16 (1962) siderne 89 til 95, hvori agar mediet er blevet tilpasset således, at det ved tilsætning af trimethoprim, TMP, (Merck Index 9. udgave nr. 9377) er blevet muligt at bestemme sulfonamider. Sulfonamider er i almindelighed forbindelser med en substitueret eller usubstitueret SO_2NH_2 -gruppe i parastillingen på en substitueret eller usubstitueret anilinkerne såsom sulfamethoxazol[4-amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)benzensulfonamid]. Ved denne fremgangsmåde anvendes blandt andet den termophile mikroorganisme *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, som fortrinsvis inkuberes ved ca. 60°C for at undgå interferens fra mikroorganismer, der er til stede i den prøve. Ved denne fremgangsmåde skal der anvendes et meget specielt medium (Mueller-Hinton-medium), der er kendt for sit meget lave indhold af sulfonamidantagonister, med hvilket der skal fremstilles friske plader til hver bestemmelse, og hvori den nødvendige inkubationstid er mindst 6 timer. Denne fremgangsmåde kræver derfor kvalificeret laboratoriepersonale.

Disse betingelser er imidlertid uacceptable under industrielle forhold, f.eks. i mejerier, og i praksis har man brug for en hurtigere prøve, hvor der anvendes klar-til-brug udstyr, og som giver et resultat

indenfor få timer. Derudover har man i praksis brug for en prøve, som ikke nødvendigvis kræver kvalificeret laboratoriepersonale og som kan udføres af f.eks. chaufføren, der transporterer mælken fra landbrugeren til
5 mejeriet.

Engelsk patentbeskrivelse nr. 1.467.439 beskriver en prøve, hvori der anvendes klar-til-brug udstyr. Denne prøve giver et resultat indenfor 1 1/2 til 4 timer, i almindelighed indenfor 2 til 3 timer, og kan
10 udføres af ikke kvalificeret personale, men prøven er kun velegnet til bestemmelse af antibiotika i biologiske væsker såsom mælk, kødsaft, serum og urin og har for lille følsomhed til at bestemme sulfonamider.

Det er derfor overraskende, at man ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnår, at almindelige agarmedier
15 er tilstrækkelige og at lavere koncentrationer af TMP end dem der er beskrevet af Gudding (10-120 µg/l i sammenligning med 0,25 µg/ml svarende til 250 µg/l ifølge Gudding for bakterien *Bacillus stearothermophilus*, som
20 anvendes p.g.a. at den vokser ved temperaturer, der er letale for mange andre bakterier, hvorved behovet for sterilisation af mælken under testen elimineres). Det fremgår endvidere af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, at inkubationstiden ikke påvirkes af TMP-tilsætningen.
25 Fordommene indført af Gudding overvindes ved det ovennævnte, som viser den industrielle anvendelighed af fremgangsmåden ifølge ansøgningen. Testenhederne ifølge ansøgningen kan prefabrikeres og anvendes af lægfolk.

Derfor er der ved opfindelsen tilvejebragt en
30 fremgangsmåde til fremstilling af en enhed til bestemmelse af antibiotika- og sulfonamidrester i biologiske væsker såsom mælk, kødsaft, serum eller urin, hvilke enheder omfatter et agarmedium podet med sporer af *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* og indeholdende trimethoprim, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at sporer af *Bacillus stearother-*
35

mophilus var. calidolactis (LMD 74.1) og trimethoprim [2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,3-pyrimidin] indføres i en eventuelt puffret umodificeret agaropløsning i koncentrationer på 10^5 til 10^8 sporer pr. ml og 10-120 µg trimethoprim pr. liter agarmedium, og at der tilsættes eventuelle næringsstoffer og en indikator, egnet til påvisning af vækst af mikroorganismerne, til opløsningen, hvorefter agaropløsningen lades størkne i rør, idet fremgangsmåden udføres under sådanne betingelser, at sporerne forbliver levende men ikke kan formere sig på grund af mangel på næringsstoffer og/eller på grund af lav temperatur.

Enhederne, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og som er ejendommelige ved det i krav 2 angivne, gør det muligt at opnå et resultat indenfor 1 1/2 til 4 timer, i almindelighed indenfor 2 til 3 timer, hvadenten en prøve af en biologisk væske indeholder eller ikke indeholder et antibiotikum eller en sulfonamid udover en forud fastlagt koncentration. Det har overraskende vist sig, at prøven også lykkes uden at modificere mediet som beskrevet af Gudding, således at f.eks. mediet, der er beskrevet i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.467.439, kan bruges uden videre. Det har også overraskende vist sig, at aflæsningstidspunktet ikke nødvendigvis udskydes. Ved valg af en passende trimethoprimkoncentration og aflæsning ved syredannelse eller reduktion, f.eks. ifølge den vertikale diffusionsprøvemetode beskrevet i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.467.439, kan prøvetiden ifølge denne fremgangsmåde således opretholdes. Det må bemærkes, at Gudding anvendte en trimethoprimkoncentration på 0,25 µg/ml, hvorimod trimethoprimkoncentrationen anvendt ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er lavere.

Trimethoprim har øjendynlig ingen eller i det væsentlige ingen indflydelse på sporerens holdbarhed. Yderligere kan en sådan enhed lagres i mere end 1 år.

Eksempler på rør, der er anvendelige til opfindelsens formål, er gennemsigtige rør enkelte eller i sæt eller kombineret til en blok af gennemsigtigt materiale, der er forsynet med et antal huller, der er
5 udformet deri.

De næringsstoffer, der er nødvendige til mikroorganismernes vækst, er fortrinsvis inkluderet i en tablet eller en skive filtrerpapir eller lignende. Tabletten eller filtrerpapiret anbringes ovenpå agarmediet før prøven udføres. Næringsstoffer, f.eks. i en
10 tablet, kan også indføres i prøverøret på forhånd, hvorved der fortrinsvis træffes foranstaltninger til at undgå fugttransport fra agarmediet til tabletten.

Dette kan f.eks. gøres ved at beklæde tabletten med en
15 fugtighedsmodstandsdygtigt lag f.eks. en voks; denne beklædning må forsvinde i løbet af undersøgelsen. En voks med smeltetemperatur på 35 til 55°C, fortrinsvis 40 til 45°C, er velegnet til dette formål. Næringsstofferne må i det mindste indeholde en assimilerbar carbonkilde, f.eks. glucose, en assimilerbar nitrogenkilde,
20 f.eks. peptone, og en vækstfaktorkilde og mineraler f.eks. gærekstrakt. Såfremt næringsstofferne er inkluderet i agarmediet, bør enheden opbevares ved temperaturer under de, hvori sporerne formerer sig (2 til 10°C).

25 Indikatoren der anvendes er en syre-baseindikator til en pH på ca. 5,5, fortrinsvis bromcresolpurpur eller phenolrødt, eller en redoxindikator, fortrinsvis 2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid eller Brilliant sort. Der anvendes sporer fra stammen Bacillus stearothermophilus var. calidolactis, der er deponeret ved mikrobiologisk laboratorium, Delft's tekniske universitet under nr. IMD 74,1
30 - hvor stammen er tilgængelig for offentligheden. Denne mikroorganisme er yderst følsom overfor penicilliner. Den vokser hurtigt og har yderligere den fordel, at dens optimale væksttemperatur er så høj, at andre mikroorganismer i
35 almindelighed ikke vokser, hvilket resulterer i, at der kun er lille sandsynlighed for at disse mikroorganismer

5

interfererer. Fortrinsvis har mikroorganismen endvidere en høj følsomhed overfor andre antibiotika.

Mediet der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen indeholder 10^5 til 10^8 , fortrinsvis 10^6 til 10^7 , sporer fra mikroorganismen pr. ml agarmedium. Fremstillingen af det sporeindeholdende agarmedium er beskrevet yderligere i engelsk patentbeskrivelse nr. 1.467.439.

Den mængde trimethoprim, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er velegnet til bestemmelse af 0,05 til 2 $\mu\text{g/ml}$ af de fleste af de almindeligt anvendte sulfonamider i prøven. Der anvendes gerne 10 til 120 μg , fortrinsvis 20 til 60 μg trimethoprim pr. liter medium.

Ved bestemmelse af antibiotika- og sulfonamidrester i biologiske væsker såsom mælk, kødsaft, serum og urin, anbringes den prøve, der skal undersøges, i det ifølge opfindelsen fremstillede rør og efterlades der eller fjernes efter tilstrækkelig lang tid, f.eks. 15 til 30 minutter, til at antibiotika- og sulfonamidresterne kan diffundere, hvorefter næringsstofferne om nødvendigt anbringes på agarmediet, og testrørets indhold inkuberes ved eller nær ved mikroorganismernes optimale væksttemperatur i en forudbestemt periode, hvorefter indikatorfarven bestemmes, hvilken farve angiver tilstedeværelse eller fravær af et antibiotikum og/eller sulfonamid udover en bestemt minimumskoncentration. Prøven er meget simpel at udføre, således at det ikke er nødvendigt at anvende kvalificeret personale til prøven. Bestemmelsen kan udføres på 1 1/2 til 4 timer, fortrinsvis 2 til 3 timer, efter prøvens start, hvilket er udpræget kortere end ved den af Gudding beskrevne metode.

Eksempel 1

Fremstilling af enheder uden næringsstoffer.

En kultur af *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* L.M.D. 74.1 blev inokuleret på et medium

5 bestående af:

	Bacto næringsagar, Difco kode 0001	15	g
	Bacto agar, Difco kode 0140	5	g
	Dextrose	0,5	g
	MnSO ₄ ·xH ₂ O	30	mg
10	Destilleret vand til	1000	ml
	Steriliseret i 20 minutter ved 120°C		

Efter inokuleringen blev mediet inkuberet ved 60°C i
mindst 48 timer indtil der observeredes en god spore-
15 dannelses. Sporerne blev dernæst opsamlet, vasket med de-
stilleret vand og opbevaret ved 4°C. Mængden af levende
sporer blev registreret ved testning på et medium bestå-
ende af:

	Bacto agar, Difco kode 0140	20	g
20	Bacto Tryptone, Difco kode 0123	8,5	g
	Phytone Pepton, BBL kode 11905	1,5	g
	Dextrose	5	g
	Destilleret vand til	1000	ml
	Steriliseret i 20 minutter ved 120°C		

25 Efter inokuleringen blev mediet inkuberet i 48 timer
ved 60°C, hvorefter kolonierne blev talt. Destilleret
vand blev sat til eller vand blev fjernet fra sporesus-
pensionen indtil suspensionen indeholdt ca. 10⁸ levende
30 kim pr. ml.

Af den ovennævnte sporesuspension indeholdende
10⁸ kim pr. ml sættes 10 ml til den følgende opløsning:

7

	Bacto agar, Difco kode 0140	9	g
	Natriumchlorid	9	g
	Trimethoprim	40	µg
	Triethanolamin-puffer pH 9	100	ml
5	Destilleret vand til	1000	ml
	Steriliseret i 20 minutter ved 120°C		

Triethanolaminpufferen fremstilles ved opløsning af 0,5 g triethanolamin x HCl i 90 ml destilleret vand, justering af pH til 9 ved tilsætning af 4N NaOH (der behøves ca. 0,5 ml) og tilsætning af destilleret vand til et slut-

10 volumen på 100 ml.

Mediet blev gjort flydende ved opvarmning og dernæst afkølet til 60°C. Sterile testrør med en diameter på ca. 9 mm blev hver fyldt med 0,5 ml af det såle-

15 des opnåede medium, og man lod indholdet af testrørene størkne idet rørene blev holdt i opretstående stilling. De fremstillede enheder blev opbevaret ved en temperatur på 4°C.

20

Eksempel 2

Fremstilling af enheder med næringsstoffer.

10 ml af sporesuspensionen beskrevet i Eksempel 1 sættes til den følgende opløsning:

25	Bacto agar, Difco kode 0140	9	g
	Natriumchlorid	9	g
	Trimethoprim	50	µg
	Triethanolamin-puffer pH 9	100	ml
	Stivelse 1500	20	g
30	Destilleret vand til	1000	ml

Efter sterilisation i 20 minutter ved 120°C opløses 4 g Bacto gærekstrakt Difco 0127 i den stadig flydende opløsning (ca. 60°C).

Den videre fremgangsmåde til fyldning af testrørene er som i Eksempel 1.

Eksempel 3

Fremstilling af næringstabletter.

En blanding af 1462 g stivelse 1500, 270 g Bacto
gærekstrakt, Difco 0127, og 833 g dextrose-monohydrat
5 fyldes efter at være ledet gennem en sigte med en
maskevidde på 710 μm , i en Molteni mixer. Langsomt tilsæt-
tes 375 ml ethylalkohol i løbet af ca. 5 minutter, og
massen blandes i yderligere 5 minutter, sigtes gennem en
sigte med en maskevidde på 1,4 mm, spredes ud på plader-
10 ne i en tørreovn i tynde lag og tørres i 3 timer ved
37°C.

Den tørrede masse sigtes gennem en sigte med en
maskevidde på 300 μm og blandes i en Molteni blander med
en mængde Precirol (handelsnavn for glycerinpalmitostear-
15 rat) lig med 1/19 af dens vægt. Tabletterne presses
i et Hoko apparat. Vægten af 10 tabletter skal være
mellem 90 og 110 mg. Tabletterne skal opbevares i fla-
sker forsynet med et silicagelindsats.

20

Eksempel 4

Udførelse af en test med mælkeprøver.

Sulfadiazin sættes til frisk komælk i mængder
til opnåelse af koncentrationer på 1,5; 1,0; 0,75; 0,5;
0,35; 0,2 og 0,1 μg pr. ml, mens en prøve af komælken
25 uden sulfadiazin anvendtes som kontrol. 8 Enheder frem-
stillet ved fremgangsmåden ifølge Eksempel 1 blev hver
forsynet med en næringstablet fremstillet ved fremgangs-
måden ifølge Eksempel 3, og 0,1 ml af hver af prøverne
blev sat til enhederne. Enhederne blev placeret i et
30 vandbad med en temperatur på 65°C, og man observerede
enhederne efter 2 1/2, 2 3/4, 3 og 3 1/2 timer. Resulta-
terne var som følger: Med kontrolprøven blev agaren gul
efter 2 1/2 time. For prøverne indeholdende 0,5 μg sul-
fadiazin pr. ml eller mere var agaren farvet violet,
35 også ved det sidste aflæsningstidspunkt. Prøven indehol-
dende 0,35 μg blev gul efter 3 1/2 time, prøven indehol-
dende 0,2 μg efter 3 timer og den der indeholdt 0,1 μg
efter 2 3/4 timer.

Det fremgår således af Eksempel 4, at man med enhederne fremstillet ved fremgangsmåden kan påvise tilstedeværelsen af sulfadiazin (der er et substitueret sulfanilamid, og hvis virkning er sammenlignelig med sulfanilamids) indenfor et tidsrum på mindre end 3 1/2 time med koncentrationer på 0,1 - 1,5 µg/ml i mælk. Testen er så enkel, at den kan udføres af en ikke fagmand. Det ses heraf, at testen udført med enhederne fremstillet ifølge opfindelsen frembyder væsentlige fordele i forhold til fremgangsmåden ifølge Gudding der for sulfanilamid kan udføres af en fagmand på 6-7 timer med koncentrationer ned til 0,25 µg.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en enhed til bestemmelse af antibiotika- og sulfonamidrester i biologiske væsker, hvilken enhed omfatter et agar-medium podet med sporer af *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* og indeholdende trimethoprim, k e n - d e t e g n e t ved, at sporer af *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (LMD 74.1) og trimethoprim [2,4-diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,3-pyrimidin] indføres i en eventuelt puffret, umodificeret agaropløsning i koncentrationer på 10^5 til 10^8 sporer pr. ml og 10-120 µg trimethoprim pr. liter agarmedium, og at der tilsættes eventuelt næringsstoffer og en indikator, egnet til påvisning af vækst af mikroorganismerne, til opløsningen, hvorefter agaropløsningen lades størkne i rør, idet fremgangsmåden udføres under sådanne betingelser, at sporerne forbliver levende men ikke kan formere sig på grund af mangel på næringsstoffer og/eller på grund af lav temperatur.

2. Enhed fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at enheden er uden indhold af næringsstoffer og i kombination med næringsstoffer i en tablet eller en filterpapirskive tilpasset til placering på agarmediet inden udførelse af bestemmelsen.