

P 94 029 21

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

59.218/BE 94

K I V O N A T

67913

Eljárás és eszköz antibakteriális vegyületek maradékainak ki-
mutatására folyadékokban

Gist-Brocades Delft
~~GIST-BROCADES~~ N.V., ~~DELFT~~, NL

A bejelentés napja: 1994.02.09.

Elsőbbsége: 1993.02.11. (93200387.4), ~~NL~~ EP

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/00359

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/18343

A találmány antibakteriális vegyületek, például antibio-
tikumok és szulfa-vegyületek maradékainak folyadékokban
— például tejben, vízben, húslében, szérumban vagy vizelet-
ben — való kimutatására szolgáló eljárásra és eszközre vonat-
kozik.

A vizsgálatokhoz használt eszköz megfelelő teszt mikro-
organizmussal beoltott agar táptalajt és két vagy több redox
indikátort tartalmaz. A vizsgálat alapja az a felismerés, hogy
az antibiotikum jelenléte meggátolja a redox indikátor(ok)
mikroorganizmusok hatására végbemenő színváltozását.

Bejelentés

P94 02921

09/94

G. & K.
Nemzetközi
Iroda
Dalszínház u. 10.
Fax: 153-3664

A

59.218/BE

NSZ06: C12 Q 1/18

GOIN33/02

/18
/48

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

67913

Eljárás és eszköz antibakteriális vegyületek maradékainak ki-
mutatására folyadékokban

Gist-Brocades Delft
~~GIST-BROCADES~~ N.V., ~~DELFT~~, NL

Feltalálók:
van Rijn, Delft
~~VAN RIJN~~ Ferdinand Theodorus Jozef, ~~DELFT~~, NL
Beukers, Nootdorp
~~BEUKERS~~ Robert, ~~NOOTDORP~~, NL
Kerkhof, Rozenburg
~~KERKHOF~~ Johannes H.P.M., ~~ROZENBURG~~, NL

A bejelentés napja: 1994.02.09.

Elsőbbsége: 1993.02.11. (93200387.4), ~~NL~~ EP

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/00359

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/18343



A találmány antibakteriális vegyületek maradékainak folyadékokban való kimutatására szolgáló eljárásra vonatkozik. A találmány antibakteriális vegyületek maradékainak folyadékokban való kimutatására szolgáló eszközre és ennek használatára is vonatkozik.

Hasonló vizsgálatokat ír le a GB-A-1467439 számú nyilvánosságra hozott nagybritanniai szabadalmi bejelentés, az EP-A-0005891 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés és a DE 3613794 számú német szövetségi köztársaságbeli szabadalmi leírás. Ezek a dokumentumok olyan "használatra kész" (ready for use") vizsgálati eszközöket (teszteket) ismertetnek, amelyek valamilyen teszt mikroorganizmust használnak, és az eredményt általában 2 1/2 - 3 1/2 órán belül tudják szolgáltatni a vizsgálati rendszerhez adott sav-bázis vagy redox indikátor színváltozása révén. Az alapelv az, hogy ha egy vizsgálandó folyadékban az antibakteriális vegyület koncentrációja elégséges ahhoz, hogy meggátolja a teszt mikroorganizmus növekedését, az indikátor színe változatlan marad, míg ha nem történik gátlás, a teszt mikroorganizmus növekedését savképződés vagy redukált anyagcseretermékek keletkezése kíséri, amelyek megváltoztatják az indikátor színét. Minden ilyen vizsgálatban egyetlen indikátort használnak a savképzés vagy a redukált metabolitok képződésének kimutatására.

A találmány szerint a vizsgálat időtartamának jelentős, egészen 1 órára való csökkentését lehet elérni, ha két vagy több indikátor kombinációját használjuk. A lerövidített vizsgálati idő a felhasználó számára fontos lehet, mivel a folya-



dék minta minőségét hamarabb megismeri, és ez korábbi lelet-kiadást vagy feldolgozást, stb. tesz lehetővé.

Tehát a találmány antibakteriális anyagoknak vizsgálati mintában történő kimutatására szolgáló olyan módszert bocsát rendelkezésre, amely a következőkből áll:

a) egy teszt mikroorganizmust és legalább két redox indikátort adunk agar táptalajhoz;

b) a vizsgálandó mintát úgy hozzuk érintkezésbe az agar táptalajjal, hogy a vizsgálandó mintában lévő antibakteriális vegyületek gátolhassák az agar táptalajban lévő mikroorganizmust.

A találmány vonatkozik egy olyan eszközre is, amellyel a teszt mikroorganizmust tartalmazó táptalajban ki tudjuk mutatni az antibakteriális vegyületet. Az eszköz adott esetben külön tápanyagforrást és két vagy több redox indikátort tartalmaz, amelyeket vagy az agar táptalaj vagy a vizsgálandó minta vagy a külön tápanyagforrás tartalmazhat.

A találmány szerinti eszközt antibakteriális vegyületek, így például szulfa-vegyületek és antibiotikumok kimutatására használjuk.

Az eszköz antibakteriális vegyületek folyadékban, például tejben, vízben, húslében (meat juice), szérumban vagy vizeletben való kimutatására használható.

Előnyös, ha a teszt mikroorganizmus egy *Bacillus* vagy egy *Streptococcus* törzs. Előnyös *Streptococcus* faj a *Streptococcus haemophilus*, még előnyösebb a *Streptococcus thermophilus* T101 (DSM 4022; letétbe helyezve 1987. március 3.-án). Ezt a tör-



zset a táptalajba visszük be, előnyösen $10^5 - 10^9$ telepkepző egység/ml agar táptalaj koncentrációban. (Telepkepző egység = colony forming unit = CFU.)

Előnyös Bacillus faj a Bacillus stearothermophilus, még előnyösebb a B. stearothermophilus var. calidolactis C953. A Bacillus stearothermophilust előnyösen úgy vihetjük be az agar táptalajba, hogy koncentrációja $10^5 - 10^9$ CFU/ml agar táptalaj legyen.

A találmány céljára használható eszköz lehet például átlátszó cső, egyenként vagy készletben, olyan áttetsző anyagból készült blokkal kombinálva, amely több, megfelelően kialakított lyukkal van ellátva.

A redox indikátorok széles változatát használhatjuk a találmány szerinti eljárásban. A redox indikátorokat redox mediátoroknak, redox katalizátoroknak és elektron hordozóknak (electron carriers) is nevezik. Ilyen vegyületek például a következők: Brilliant Black, metilénkék, Toluidine Blue, Sfranine O, indigókarmin, tionin, gallocianin, Nile Blue A, Brilliant Crocein MOO, savsárga 38 (Acid Yellow 38), savoranzs 51 (Acid Orange 51), savkék 120 (Acid Blue 120), báziskék 3 (Basic Blue 3), Azure A, Azure B, kongóvörös, 1-10-fenantrolin, Janus Green B, Brilliant Cresyl Blue. Más redox indikátorokat (redox mediátorokat, redox katalizátorokat és elektron hordozókat) szintén használhatunk. Ezek a vegyületek a kereskedelemből beszerezhetők. Lásd például az Aldrich Chemie katalógusát: "Stains, Dyes and Indicators". Előnyös, ha az egyik indikátornak a spektrum látható tartományában változik a szí-



ne. Előnyös kombináció például:

- a) Brilliant Black és metilénkék;
- b) Brilliant Black és Toluidine Blue; valamint
- c) Brilliant Black és Nile Blue A.

Tápanyagokat abból a célból adunk az agarhoz, hogy elősegítsük a teszt mikroorganizmus szaporodását.

A találmány szerinti eszköz adott esetben a tápanyagok legalább egy részét tartalmazza, amelyek nincsenek az agar táptalajban, és ezért külön tápanyag forrás formájában adjuk hozzá, például tablettá vagy papír-korong alakjában, amelyeket ráhelyezhetünk az agar táptalajra a vizsgálat kivitelezése előtt. Tápanyagok lehetnek mind az agar táptalajban, mind külön forrásként is. A redox indikátorok közül legalább egyet a külön tápanyag-forrás tartalmazhat.

Az eszközökben már előre jelen lehetnek a tápanyagok és egy vagy mindkét redox indikátor, például tablettában, és így előnyösen el lehet kerülni, hogy a mérés előtt az agar táptalajból nedvesség kerüljön be a tablettába. Ezt például úgy lehet elérni, hogy a tablettát nedvességnek ellenálló réteggel vonjuk be, például viasszal, amely bevonat elbomlik vagy elolvad a vizsgálati eljárás folyamán. Egy olyan viasz felel meg, mely 35-55 °C hőmérsékleten, előnyösen 40-45 °C-on olvad meg.

A *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 törzset a következő intézményekben helyeztük letétbe: 1974-ben a Delfti Műszaki Egyetem Mikrobiológiai Laboratóriumában (Technical University of Delft), LMD 71.4 letéti számon és



1983-ban a Penésztenyészetek Központi Hivatalában (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn) CBS 760.83 letéti számon. Ezekről az intézményektől a törzs beszerezhető. Ez a mikroorganizmus nagyon érzékeny penicillinekre és más antibiotikumokra, és gyorsan növekedő mikroorganizmus. További előnye, hogy a növekedéséhez szükséges optimális hőmérséklet magas (50-70 °C között). Csak néhány mikrófafajta képes ilyen hőmérsékleten növekedni. Ezért kicsi a valószínűsége annak, hogy a vizsgálandó folyadékban jelenlévő mikroorganizmusok vagy amelyeket egyébként tartalmaz a teszt rendszer, zavarnák a vizsgálat eredményét.

Ha a teszt mikroorganizmus egy Bacillus törzs, akkor előnyös, ha az agar táptalaj spóraszuszpenzió formában tartalmazza. A spóraszuszpenziót ismert módszerek szerint (GB-A-1467439) készíthetjük el és ismert módszerek szerint (GB-A-1467439) vihetjük be az agar táptalajba.

A találmány egy előnyös kiviteli alakja szerint a mikroorganizmus érzékenysége beállítható. Az érzékenységet különbözőképpen változtathatjuk, például bizonyos anyagok hozzáadásával megváltoztathatjuk a vizsgálat feltételeit, például a pH-t vagy a pufferek koncentrációját. Változtathatjuk az agar vagy a spórák koncentrációját vagy a térfogatarányokat, így az agar és a vizsgálandó folyadék térfogatarányát. Adagolhatunk például nukleozidokat, ilyen az adenzin vagy antifolátokat, mint a trimetoprim, ormetoprim és tetroxoprim, amelyek fokozzák a tesztmikroorganizmus szulfa-vegyületekre való érzékenységét. Az oxálsav vagy a hidrogén-fluorid sói a tetraciklinekkel



szembeni érzékenységet növelik, míg a ciszteín a penicillinekkel szembeni érzékenységet csökkenti.

A találmány szerinti eljárás kivitelezését olyan módon oldhatjuk meg előnyösen, ha a teszt mikroorganizmus élő marad, de nem szaporodik az agar táptalajban. Ezt általában úgy érjük el, hogy a mikroorganizmust megfosztjuk a tápanyagoktól amíg a vizsgálatot elvégezzük, vagy/és úgy, hogy a tenyészetet eléggé alacsony hőmérsékleten tartjuk, például 30 °C alatt.

Az antibakteriális vegyületek maradékainak a kimutatását folyadékokban, főként biológiai folyadékokban, mint a tej, víz, húslé, szérum és vizelet, az itt meghatározott eszközök segítségével a következőképpen végezzük: a vizsgálandó minta meghatározott mennyiségét — például 0,05 - 0,5 ml-t — az agar táptalajra (például 0,2 - 3 ml) visszük, és az eszközt a tesztmikroorganizmus számára optimális hőmérsékleten vagy ehhez közel, például 63 - 66 °C-on inkubáljuk meghatározott ideig, például 60 - 120 percig, majd megfigyeljük az indikátor színét, amely az antibakteriális vegyületnek bizonyos koncentráció feletti jelenlétét vagy hiányát jelzi. A vizsgálat kivitele olyan egyszerű, hogy elvégzése nem igényel speciálisan képzett személyt. A vizsgálat a kezdéstől számítva 1-2 órán belül befejeződik, és ez jelentősen rövidebb időtartam, mint amit a többi olyan mikrobiális vizsgálati rendszer tesz lehetővé, amelyekben csak egy indikátort használnak.

Minden említett szabadalmi bejelentést és szabadalmi leírást olyan módon tartalmaz ez a bejelentés referenciaként, mintha minden egyes szabadalmi bejelentést vagy szabadalmi le-



írást speciálisan és egyedileg tekintenénk referenciának ebben a leírásban.

Ezen bejelentés kiviteli alakjait az alábbi példákkal szemléltetjük, anélkül azonban, hogy ezekkel korlátoznánk a találmány oltalmi körét.

1. példa:

Antibiotikumok kimutatására szolgáló teszt csövek készítése.

1000 ml desztillált vízben feloldunk 12 g agart és 9 g nátrium-kloridot. Az oldathoz hozzáadunk 2,5 ml 0,09 M trietanolamin puffert (pH = 8,0). Az elkészített oldatot 20 percig 121 °C-on sterilizáljuk, majd körülbelül 60 °C-ra hűtjük. A steril oldathoz hozzáadjuk a *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* desztillált vízzel készített spóraszuszpenzióját. A szuszpenzióból annyit mérünk be, hogy végső koncentráció 10^9 - 10^{10} spóra/liter legyen, és Brilliant Black steril oldatából olyan mennyiséget adunk hozzá, hogy a végső koncentráció 80 mg/liter legyen. Steril, körülbelül 9 mm átmérőjű csövekbe 0,3 ml agar oldatot töltünk aszeptikus körülmények mellett, majd a csöveket azonnal lezárjuk, például alumínium fóliával. Hagyjuk a teszt csövek tartalmát megdermedni, miközben a csöveket álló helyzetben tartjuk. Az így elkészített csöveket 5 - 15 °C hőmérsékleten tároljuk.



2. példa:

Antibiotikumok és szulfa-vegyületek kimutatására szolgáló
teszt csövek készítése.

Az 1. példa szerinti eljárást követjük, azzal az eltérésszel,
hogy a puffer oldattal együtt annyi trimetoprim oldatot
mérünk be, hogy a végső koncentráció 60 µg/liter legyen.

3. példa:

Táp-tabletták készítése.

Elkészítjük a következő keveréket: 100 g glükóz, 160 g
Avicel PH101, 50 g Tryptose, 10 g Phytone pepton, 15 g
Precirol és 50 ml etanolban feloldott 500 mg Toluidine Blue. A
keverékből 30.000 darab 3 mm átmérőjű, 1,2 mm vastagságú tab-
letta készíthető.

4. példa:

A vizsgálat menete.

Az 1. vagy a 2. példa szerint készített teszt csövet fel-
nyitjuk úgy, hogy átszűrjük a zárást, és egy a 3. példa sze-
rint készített táp-tablettát viszünk be. A vizsgálandó mintá-
ból, például egy tejmintából 0,1 ml-t mérünk a teszt csőbe, és
a teszt csövet inkubátorba [vízfürdő vagy fűtőblokk (block
heater)] helyezzük, ahol 64 °C-on tartjuk. A leolvasást 1 óra
20 perc - 1 óra 40 perc múlva végezzük.

Ha ebben az időpontban az agar táptalaj színe sárga, a
minta nem tartalmaz kimutatható mennyiségben antibakteriális
vegyületet (például penicillin G-ből ml-enként 0,003 NE-t vagy



kevesebbet, szulfametazinból ml-enként 0,1 μ g-ot, vagy kevesebbet).

Ha azonban az agar táptalaj színe kék, a minta egy antibakteriális vegyületből legalább kimutatható mennyiséget tartalmaz (például penicillin G-ből ml-enként 0,006 NE-t vagy többet vagy szulfametazinból ml-enként 0,2 μ g-ot vagy többet).

Egy köztes koncentráció esetén, mely az éppen kimutatható mennyiséget képviseli, az agar táptalaj színe a sárga és kék között lesz.

5. példa:

Két-indikátoros teszt eszköz összehasonlítása egy egy-indikátoros teszt csővel.

Teszt csöveket készítünk az 1. vagy a 2. példa szerint. Táp-tablettákat a 3. példa szerint készítünk. Hasonló táp-tablettákat is készítünk, de Toluidine Blue nélkül.

Mindkét típusú táp-tablettával és egy antibiotikum mentes tejmintával elvégezzük a vizsgálatokat a 4. példa szerint. A Toluidine Blue-t nem tartalmazó táp-tablettával kombinált teszt csövek esetén a színváltozás egy órával többet vesz igénybe, azaz 2 óra 20 percet - 2 óra 40 percet, ha összehasonlítjuk a toluidinkéket tartalmazó táp-tablettával ellátott teszt csővel.

6. példa:

Változatok készítése és az ezekkel végzett vizsgálatok.

Teszt csöveket készítünk az 1. példa szerint azzal az



eltéréssel, hogy a Brilliant Black oldat helyett a következő redox indikátorok hasonló koncentrációjú oldatait használjuk: Brilliant Crocein MOO, savsárga 38, savsárga 51, savkék 120 vagy kongóvörös. Táp-tablettákat készítünk a 2. példa szerint, azzal az eltéréssel, hogy Toluidine Blue helyett a következő redox indikátorok hasonló mennyiségeit használjuk: Safranine O, indigókarmin, tionin, Nile Blue A, Azure A, Azure B, Janus Green B, Brilliant Cresyl Blue ALD vagy metilénkék. A vizsgálatot a 4. példa szerint végezzük, a fentiek szerint készített teszt csövekkel és táp-tablettákkal.

A fellépő színváltozás arra utal, hogy a vizsgált tejmintha nem tartalmaz kimutatható mennyiségű antibiotikumot és/vagy szulfavegyületeket. Ha a teszt cső színe nem változik, a tejmintha tartalmaz ezen vegyületekből maradékot. A vizsgálat időtartama a választott redox indikátor szerint változik, de lényegesen rövidebb időt vesz igénybe, mint egy egy-indikátoros vizsgálat, hasonlóan az 5. példában leírtakhoz.



S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Eljárás antibakteriális vegyületek kimutatására vizsgálati mintából, azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépésekből áll:

- a) egy teszt mikroorganizmust és legalább két redox indikátort viszünk be agar táptalajba;
- b) a vizsgálandó mintát olyan módon hozzuk érintkezésbe az agar táptalajjal, hogy a vizsgálandó mintában jelenlévő antibakteriális vegyületek gátolhassák az agar táptalajban lévő teszt mikroorganizmust.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a teszt mikroorganizmus *Bacillus* vagy *Streptococcus* törzs.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a teszt mikroorganizmus a *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* törzs vagy a *Streptococcus thermophilus* törzs.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az agar táptalajt pufferoljuk.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tápanyag forrást adunk az agar táptalajhoz.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tápanyag forrást vagy ennek egy részét külön tápanyag forrás formájában — például tablettá vagy papírkorong formájában — adagoljuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,



hogy a külön tápanyag forrás még legalább egy redox indikátort, előnyösen legalább két redox indikátort is tartalmaz.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redox indikátorok közül legalább egynek a spektrum látható tartományában változik a színe.

9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a teszt mikroorganizmus antibakteriális vegyületekkel szembeni érzékenysége beállítható.

10. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az agar táptalajhoz még legalább egy olyan anyagot adunk, amely a teszt mikroorganizmus antibakteriális vegyületekkel szembeni érzékenységét megváltoztatja.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a vegyület, amely megváltoztatja az érzékenységet, egy antifolát.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az érzékenységet megváltoztató anyag a trimetoprim, ormetoprim vagy a tetroxoprim.

13. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy 1 ml agar táptalaj a teszt mikroorganizmusból 10^5 - 10^9 telep képző egységet (CFU) tartalmaz.

14. Eszköz antibakteriális vegyületek kimutatására, azzal jellemezve, hogy a következőket tartalmazza: teszt mikroorganizmus, adott esetben külön tápanyag forrás és két vagy több redox indikátor, amelyeket vagy az agar táptalaj vagy a külön tápanyag forrás tartalmazhatja.

15. A 14. igénypont szerinti eszköz, azzal jellemezve,



hogy a teszt mikroorganizmus vagy Bacillus vagy Streptococcus törzs.

16. A 15. igénypont szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy a teszt mikroorganizmus a Bacillus stearothermophilus vagy a Streptococcus thermophilus.

17. A 14-16. igénypontok bármelyike szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy az agar táptalajt pufferoljuk.

18. A 14-17. igénypontok bármelyike szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy az agar táptalaj legalább egy tápanyagot tartalmaz.

19. A 14. igénypont szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy a külön tápanyag forrás legalább egy redox indikátor, előnyösen legalább két redox indikátort tartalmaz.

20. A 14-19. igénypontok bármelyike szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy a redox indikátorok közül legalább egy a spektrum látható tartományában változtatja a színét.

21. A 14., 19. vagy a 20. igénypontok szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy a külön tápanyag forrást tablettá vagy papírkorong formájában tartalmazza.

22. A 14-21. igénypontok bármelyike szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy a teszt mikroorganizmus érzékenységét beállíthatjuk.

23. A 14-21. igénypontok bármelyike szerinti eszköz, azzal jellemezve, hogy még legalább egy olyan anyagot tartalmaz, mely a teszt mikroorganizmus antibakteriális vegyületekkel szembeni érzékenységét megváltoztatja.

24. A 23. igénypont szerinti eszköz, azzal jellemezve,

