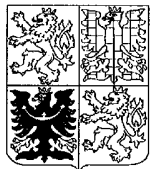


# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 30.03.1999  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 25.06.1998  
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/9800485  
(33) Země priority: BE  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 11.07.2001  
(Věstník č. 7/2001)  
(86) PCT číslo: PCT/EP99/02166  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/67416

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4790

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

C 12 Q 1/00

(71) Přihlašovatel:  
UCB, S. A., Bruxelles, BE;

(72) Původce:  
Degelaen Jacques, Genappes, BE;  
Granier Benoit, Esneux, BE;  
Frere Jean-Marie, Nantrin, BE;  
Joris Bernard, Spa, BE;

(74) Zástupce:  
Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Způsob určování antibiotik s beta-laktamovým  
jádreem v biologické tekutině**

(57) Anotace:  
Řešení se týká způsobu detekce antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině, který zahrnuje následující etapy:  
a) uvedení určeného objemu biologické tekutiny do kontaktu s určitým množstvím rozpoznávacího činidla a inkubace takto získané směsi za podmínek dovolujících tvorbu komplexů antibiotik, případně přítomných v biologické tekutině, s rozpoznávacím činidlem, b) uvedení směsi získané v etapě a) do kontaktu s alespoň jedním referenčním antibiotikem imobilizovaným na nosič, za podmínek dovolujících tvorbu komplexů referenčního antibiotika s množstvím rozpoznávacího činidla, které nereagovalo během etapy a), a c) určení množství rozpoznávacího činidla přichystaného k nosiči, ve kterém rozpoznávací činidlo obsahuje receptor citlivý na přítomnost antibiotik s beta-laktamovým jádrem, získaný z Bacillus licheniformis.

CZ 2000 - 4790 A3

**Způsob určování antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině.**

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových způsobů rychlého a přesného určování antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině použitím receptoru citlivého na antibiotika s beta-laktamovým jádrem, získaného z *Bacillus licheniformis*. Předložený vynález se také týká souprav umožňujících provedení těchto způsobů.

### Dosavadní stav techniky

Je známo, že antibiotika jsou velice široce používána nejenom jako terapeutický prostředek, určený pro léčbu infekčních chorob vyvolaných bakteriemi, ale také jako činidla umožňující konzervaci potravy a jako přídavek do stravy zvířat, umožňující stimulaci jejich růstu. Nutnost detekce přítomnosti antibiotik i ve velmi malých koncentracích v komplexních biologických tekutinách jako jsou mléko, moč, krev, sérum, slina, extrakty z masa, kvasící tekutiny nebo pufrované vodné prostředí proto nabývá na významu.

U mléčných produktů se nejčastěji popisované testy týkají detekce antibiotik. Je totiž dobře známo, že antibiotika pěstitelé používají pro léčbu jistých infekčních onemocnění dobytka.

Ze zřejmých lékařských důvodů mléko určené k lidské spotřebě musí v principu být prosté všech antibiotik. Mimo jiné koncentrace penicilinu 0,005 U/ml nebo méně může mít škodlivé důsledky v průběhu výroby produktů odvozených z mléka, jako je sýr, jogurt a podobně.

Může být předvídána řada situací. Například v prvním případě pro detekci přítomnosti antibiotik na farmě před převedením do kamionu, bude mít prioritu extrémně rychlý (méně než 5 minut) a jednoduchý test. Použití rychlého testu může být také vhodné, jestliže například antibiotikum, které bylo použito pro ošetření, je známé a jestliže dále uvedený test dovoluje detekci uvažovaného antibiotika podle zákonné normy. V opačném případě, pokud na rychlost není dáván důraz, je důležité detekovat většinu nebo všechna antibiotika v zákonných normách.

Zákonné úpravy některých zemí stanoví přesné kvalitativní normy. Například americké úřady vyžadují, aby koncentrace šesti dále uvedených antibiotik v mléku nepřekračovaly přesně určené hodnoty: penicilin, 5 ppb; ampicilin, 10 ppb; amoxicilin, 10 ppb; cloxacilin, 10 ppb; cefapirin, 20 ppb; ceftiofur, 50 ppb. Evropské společenství také stanoví normy kvality: penicilin 4 ppb; amoxicilin 4 ppb; ampicilin 4 ppb; cloxacilin 30 ppb; dicloxacilin 30 ppb; oxacilin 30 ppb; cefapirin 10 ppb; ceftiofur 100 ppb; cefchinon 20 ppb; nafcilin 30 ppb; cefazolin 50 ppb.

Může proto být užitečné mít k dispozici test, který dovoluje detekci většiny antibiotik. Kromě toho v

mlékárenském průmyslu může být užitečné mít k dispozici test, který má všechny vlastnosti rychlosti, citlivosti a jednoduchosti, test, který dovoluje vázat tyto tři parametry co nejlepším způsobem a to i pokud nejsou úplně pokryty.

Z literatury jsou známy různé druhy testů pro analýzu biologických tekutin. Tyto testy obecně používají způsoby detekce, které jsou založeny na rozpoznávacím činidlu (receptory nebo protilátky), které specificky rozpoznávají hledanou látku nebo její analog a na značkovacím činidlu (radioaktivní prvek, enzym, fluorescenční činidlo a podobně), které jsou dále označovány jako detekční činidla. V závislosti na zvoleném způsobu se mluví o radioimunologickém testu (RIA), radioreceptorovém testu (RRA), enzymovém imunologickém testu (EIA) a podobně. Ve svém obecném principu tyto testy využívají minimální kombinaci dvou výše uvedených prvků (detekčních činidel), která umožní získat výsledek, jehož hodnota indikuje množství zkoumané látky, které je přítomno.

Je vhodné poznamenat, že v závislosti na použitém způsobu detekce může být označující činidlo spojeno buď s rozpoznávacím činidlem nebo s testovanou látkou nebo s látkou, která je analogická testované látce z hlediska rozpoznávání použitým rozpoznávacím činidlem. Existují také testovací způsoby, ve kterých rozpoznávací činidlo nebo testovaná látka nebo látka analogická testované látce obsahují v sobě označovací činidlo (například radioaktivně označená testovaná látka).

Vynález US 4.239.852 popisuje mikrobiologický způsob detekce antibiotik s  $\beta$ -laktamovým jádrem v mléku. Podle tohoto způsobu se vzorek mléka inkubuje na jedné straně v přítomnosti částí buněk mikroorganismu, který je velmi citlivý na antibiotika, obzvláště *Bacillus stearothermophilus* a na druhé straně v přítomnosti antibiotika označeného radioaktivním prvkem nebo enzymem. Inkubace se provádí za podmínek dovolujících, aby antibiotika, popřípadě přítomná ve vzorku a označené antibiotikum se vázaly k částem buněk.

Po ukončení inkubace se části buněk oddělí ze směsi a potom promývají. Potom se množství označených antibiotik vázaných na části buněk určí a porovnává se standardem. Množství označených antibiotik, vázaných ke zbytkům buněk je nepřímo úměrné koncentraci antibiotik, přítomných ve vzorku analyzovaného mléka.

Tento způsob vyžaduje relativně jemné manipulace, zejména během separace částí buněk ze směsi. Mimoto ve své nejcitlivější verzi, kdy je možná detekce penicilinu G až do koncentrace 0.01 U.I./ml či dokonce 0.001 U.I./ml v mléce, tento způsob používá antibiotikum označené radioaktivním prvkem ( $^{14}\text{C}$  nebo  $^{125}\text{I}$ ). V tomto případě určení množství antibiotika, které je popřípadě přítomno v mléku, vyžaduje použití speciálního přístroje, jako je například scintilační počítač. Kromě toho manipulace s radioaktivními produkty, a to i v případě použití velmi malých množství, není zcela prostá nebezpečí pro osobu, která provádí analýzu.

Evropská přihláška vynálezu 593.112 popisuje jiný způsob, dovolující detekci antibiotik v mléku. Tento způsob používá protein izolovaný z mikroorganismu citlivého na antibiotika, jako je například *Bacillus stearothermophilus*. Tento protein se kromě jiného označí enzymem jako je peroxidáza.

Test postupuje následujícím způsobem: vzorek mléka se inkubuje ve zkumavce v přítomnosti označeného proteinu; po inkubaci se mléko přeneso do druhé zkumavky, na jejíchž stěnách bylo imobilizováno referenční antibiotikum; provede se druhá inkubace, potom se odstraní obsah zkumavky; stěny druhé zkumavky se třikrát promývají promývacím roztokem, který se také odstraní, Potom se rezidua, přítomná na stěnách druhé zkumavky přenesou na savý papír; dále se do druhé zkumavky přidá barevný substrát, který se znovu inkubuje, potom se přidá roztok, který zastaví vývin barvy; zabarvení zkumavky se porovná se zabarvením, kterého bylo dosaženo v paralelně prováděném identickém testu na standardním vzorku antibiotika. Množství označeného proteinu, imobilizovaném na nosiči, tedy také intenzita zabarvení, je nepřímo úměrné množství antibiotika, přítomného v analyzovaném vzorku mléka.

Podle příkladu 1 předložené přihlášky vynálezu tento test dovoluje detekovat penicilin G až do koncentrací řádu 5 ppb a dovoluje detekci amoxicilinu (5 ppb), ampicilinu (10 ppb), cefapirinu (5 ppb) a ceftiofuru (5 ppb). Tento test nedovoluje stanovení množství penicilinu, amoxicilinu a ampicilinu daných evropskými předpisy a mimo to je tento test nesmírně složitý; neodpovídá úplně kritériím přesnosti

a jednoduchosti hledaných v kontextu předložené přihlášky.

Jsou také známy další typy enzymatických způsobů, které umožňují určení slabých koncentrací antibiotik v mléku (J.M. FRERE a kol., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(4), 506-510 (1980), a také vynálezy EP 85.667 a EP 468.946), které jsou založeny na použití specifického enzymu, totiž exobuněčné rozpustné D-alanyl-D-alanin-karboxypeptidázy, kterou produkuje *Actinomadura R39* (dále označovaná jako „enzym R39“). Enzym R39 má specifickou aktivitu hydrolýzy skupin D-alanyl-D-alanin u různých peptidů a je také schopný hydrolyzovat konkrétní thioestery.

Kromě jiného enzym R39 reaguje s antibiotiky s  $\beta$ -laktamovým jádrem za velmi rychlého vytvoření equimolárního komplexu enzym-antibiotikum, který je neaktivní a v zásadě ireverzibilní.

V nejnovější verzi tohoto testu (EP 468.946) se určený objem vzorku kapaliny určený k testování inkubuje s určeným množstvím enzymu R39 za podmínek, které dovolují, aby  $\beta$ -laktamové antibiotikum, které je popřípadě přítomno ve vzorku, reagovalo s enzymem pro vytvoření ekvimolárního komplexu enzym-antibiotikum, který je neaktivní a v zásadě ireverzibilní.

Potom se určené množství substrátu typu thioesteru inkubuje s produktem získaným v první etapě za podmínek, dovolujících hydrolýzu substrátu reziduálním enzymem R39, který dosud nekomplexoval s antibiotikem během první

inkubace. Množství takto vytvořené kyseliny merkaptoalkanové se potom určí kolorimetrickou metodou pomocí reaktantu, který je schopný vytvářet zabarvení s volnou skupinou -SH kyseliny merkaptoalkanové. Intenzita zabarvení se porovnává s etalonem, který byl předem vytvořen ze vzorků obsahujících známá množství antibiotik. Kvantitativní určení může být provedeno měřením pomocí spektrofotometrie; v případě mléka může být nutné provést nejprve zprůhlednění vzorku.

Podle příkladů provedení přihlášky EP 468946, tento způsob dovoluje určit, v mléce, 10 ppb penicilinu G následně po celkové inkubační době délky 5 minut a řádově 2,5 ppb penicilinu G po celkové inkubační době délky 5 minut 15 minut.

Vzhledem ke požadovaným kritériím rychlosti, jednoduchosti a citlivosti metod detekce antibiotika v potravinářských produktech, si přihlašovatelé dali za cíl nalezení ještě účinnějších metod, které by umožňovaly detekci antibiotika v biologické tekutině. Přihlašovatelé si dali zvláště za cíl nalezení metody umožňující detekci většiny antibiotik, jejichž obsah je stanoven evropskými a americkými normami. Hledané metody musí dojít k výsledku po omezeném počtu etap, s výhodou i v ruce nekvalifikovaného personálu.

Přihlašovatelé hledali také metody, které by umožnily dosažení cíle následně po sníženém času inkubace vzhledem k již existujícím způsobům.

### Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká způsobu určování antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině. Přihlašovatelé našli nové způsoby detekce antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině, které umožňují pozoruhodným způsobem dosáhnout uvedených cílů.

Z uvedených důvodů se předložená přihláška vynálezu týká nového způsobu detekce antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině, který sestává z následujících kroků:

- a) uvedení určeného objemu biologické tekutiny do kontaktu s určitým množstvím rozpoznávacího činidla a inkubace takto získané směsi za podmínek dovolujících tvorbu komplexů antibiotik eventuelně přítomných v biologické tekutině s rozpoznávacím činidlem,
- b) uvedení do kontaktu směsi získané v etapě a) s alespoň jedním referenčním antibiotikem, které je imobilizované na nosič, za podmínek dovolujících tvorbu komplexů referenčního antibiotika s množstvím rozpoznávacího činidla, které nereagovalo během etapy a), a
- c) určení množství rozpoznávacího činidla přichyceného k nosiči, přitom rozpoznávací činidlo obsahuje receptor, citlivý, na přítomnost antibiotik s beta-laktamovým jádrem získaný z *Bacillus licheniformis*.

Obrázek 1 představuje použitelný typ nosiče podle předložené přihlášky vynálezu, který je představován ve formě testovacího zařízení, které sestává z pevného nosiče (1) na kterém jsou přichyceny membrány (2), (3) a (4). Obrázek představuje pohled zepředu a obrázek 1b představuje

pohled na podélný řez.

Ve výhodném provedení předloženého vynálezu se používá identifikační činidlo, které zahrnuje receptor citlivý na antibiotika s  $\beta$ -laktamovým jádrem získaný z *Bacillus licheniformis*, jako je například receptor BlaR nebo receptor BlaR-CTD. Izolace a peptidová sekvenace proteinu BlaR jsou popsány v Y. ZHU a kol., J. Bacteriol., 1137-1141 (1990); receptor BlaR-CTD je karboxy-terminální oblast BlaR, jehož izolace a peptidová sekvenace jsou popsány v B. JORIS a kol., FEMS Microbiology Letters, 107-114 (1990).

Použití receptorů BlaR nebo BlaR-CTD podle předloženého vynálezu pro detekci antibiotik s  $\beta$ -laktamovým jádrem přináší významné výhody ve srovnání s rozpoznávacími činidly používanými do současné doby. Receptory BlaR a BlaR-CTD jsou totiž schopny komplexovat velmi rychle s velkým množstvím antibiotik a to při teplotách inkubace nižších než jsou teploty nutné pro známá rozpoznávací činidla, jako jsou například receptory získané z *Bacillus stearothermophilus*.

Jako příklad detekovatelných antibiotik díky způsobům podle předložené přihlášky vynálezu, je možné citovat následující antibiotika: benzylpenicilin (nebo penicilin G), ampicilin, amoxicilin, carbenicilin, metylcilin, cloxacilin, 6-APA, monolaktam, aztreonam, mecillinam, cefalexin, cefaloglycin, cefaloridin, nitrocephin, cefatoxim, cefuroxim, ceftiofur, cefapyrin, 7-ACA. Způsoby podle předložené přihlášky vynálezu dovolují detekovat všechna antibiotika, která jsou kontrolována v Evropě a Americe, a to až k mezím

tolerovaných prahových množství.

Způsoby podle předložené přihlášky vynálezu dovolují detekovat antibiotika s beta-laktamovým jádrem v biologických tekutinách, takových jako jsou mléko, moč, krev, sérum, slina, extrakty z masa, kvasící tekutiny nebo pufrované vodní prostředí.

Podle výhodného způsobu provedení vynálezu je rozpoznávací činidlo používáno ve spojení s označovacím činidlem. Toto označovací činidlo může být různého druhu. Označovací činidlo může být korpuskulárního typu, jako jsou koloidní kovové částice (platina, zlato, stříbro,...), koloidní částice selenu, uhlí, síry nebo teluru nebo ještě syntetické zbarvené latexové koloidní částice. Označovací činidlo může také být fluoreskující látka, jako aktivovaný fluorescein (dostupný od společnosti Boeringher-Mannheim Biochemica), izokyanid fluoresceinu, tetrametylizokianid rhodaminu nebo všechny ostatní fluoreskující látky známé odborníkům v oboru. Označovací činidlo může také být enzym, například beta-laktamáza, peroxydáza, fosfatáza,.... V tomto případě jsou receptory BlaR nebo BlaR-CTD spojeny chemickou nebo genetickou cestou na toto označovací enzymatické činidlo tak, aby vytvořily fúzovaný protein.

Vazba mezi označovacím činidlem a detekčním činidlem může být dosažena způsoby známými odborníkům v oboru. Rozpoznávací činidlo může být přichyceno na označovací činidlo buď přímo nebo po vytvoření meziproduktu. Spojení mezi rozpoznávacím činidlem a označovacím činidlem může proběhnout v různých momentech během provádění způsobů

vynálezu. Podle prvního způsobu provedení vznikne spojení mezi rozpoznávacím činidlem a označovacím činidlem před uvedením rozpoznávacího činidla do kontaktu se vzorkem biologické tekutiny, určeným k analýze. Podle jiných způsobů provedení vynálezu vznikne spojení mezi rozpoznávacím činidlem a označovacím činidlem během nebo po uvedení rozpoznávacího činidla do kontaktu se vzorkem biologické tekutiny, určeným k analýze. Označení rozpoznávacího činidla se provede výhodně před uvedením rozpoznávacího činidla do kontaktu se vzorkem biologické tekutiny určeným k analýze.

První etapa a) způsobu podle vynálezu spočívá ve smíchání daného objemu biologické tekutiny s určitým množstvím rozpoznávacího činidla a v inkubaci získané směsi za podmínek dovolujících tvorbu komplexů antibiotika případně přítomného v biologické tekutině s rozpoznávacím činidlem.

Inkubace biologické tekutiny s receptorem BlaR nebo BlaR-CTD může být provedena v teplotním intervalu nacházejícím se mezi hodnotami 4 až 60°C. Tato teplota nabývá s výhodou hodnoty 47°C. Zvýšení teploty inkubace bude mít za následek snížení času potřebného k inkubaci a naopak. Vždy je proto možné snížit dobu trvání inkubace tím, že se zvýší teplota.

V druhé etapě b) způsobu podle předložené přihlášky vynálezu se směs získaná po provedení etapy a) smíchá s alespoň jedním referenčním antibiotikem imobilizovaným na nosič.

Nosiče použitelné podle předložené přihlášky vynálezu mohou

být velmi různých typů. Může se jednat o pevné nosiče jako jsou zkumavky, desky nebo tyčky pokryté preparátem referenčního antibiotika. Může se jednat o testovací zařízení, které je představováno ve formě pevného nosiče, na kterém jsou přichyceny membrány, jedna nebo více látek, které jsou schopné zachycení a které jsou umístěny ve stanovené určovací zóně. Může se jednat o nosič, který je představován ve formě magnetických nebo nemagnetických kuliček (agarózy, polystyrénu,...), schopných vytvořit gel, na kterých je imobilizováno referenční antibiotikum.

Imobilizace referenčního antibiotika na nosiči se může provést způsoby známými odborníkům v oboru, jako jsou například kovalentní nebo nekovalentní absorpce na nosič, případně prostřednictvím oddělovače.

Podle zvláštního způsobu provedení vynálezu mohou být etapy a) a b) provedeny současně.

Etapa c) způsobu podle předložené přihlášky vynálezu spočívá v detekci receptorů, které se přichytily na nosič, na kterém je imobilizované referenční antibiotikum. Metoda používaná pro toto určení je vázaná přímo na typ použitého označovacího činidla. Pokud je označovacím činidlem enzym bude etapa určení sestávat ze specifické reakce tohoto asociovaného enzymu, například bude sestávat z produkce určitého zbarvení. Pokud je označovací činidlo fluorescenčním činidlem, bude se provádět určení pouze měřením fluorescence nosiče. V případě kovových částic nebo obarvených latexových částic se bude přítomnost receptoru přichyceného na nosič manifestovat zbarvením, jehož

intenzita je přímo úměrná počtu na nosič přichycených receptorů. Pro jakýkoli typ označovacího činidla, které bylo použito, je intenzita detekovaného signálu nepřímo úměrná množství antibiotika přítomného v analyzovaném vzorku.

Přihláška vynálezu se také týká zkušebních souprav pro detekci antibiotika v biologické tekutině, obsahujících alespoň jedno rozpoznávací činidlo, které obsahuje receptor citlivý na přítomnost antibiotik s beta-laktamovým jádrem, získaný z *Bacillus licheniformis*, a alespoň jedno referenční antibiotikum imobilizované na nosiči.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 představuje použitelný typ nosiče podle předložené přihlášky vynálezu, který je představován ve formě testovacího zařízení, které sestává z pevného nosiče (1) na kterém jsou přichyceny membrány (2), (3) a (4). Obrázek představuje pohled zepředu a obrázek 1b představuje pohled na podélný řez.

#### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují různé předměty a způsoby provedení předloženého vynálezu, aniž by jeho rozsah jakýmkoli způsobem omezovaly.

Příklad 1. Určení antibiotik s beta-laktamovým jádrem v

mléce.

Tento příklad ilustruje detekci antibiotik s beta-laktamovým jádrem, kontrolovaných hygienickou službou v mléce. Popsaný test v tomto příkladu používá receptory BlaR-CTD spojené s kuličkami zlata, které slouží jako označovací činidlo a používá nosič, který je představován ve formě testovacího zařízení, které sestává z pevného nosiče, na kterém jsou přichyceny membrány.

#### 1. 1. Napojení BlaR-CTD na zlaté kuličky.

##### 1.1.1. Biotinylace BlaR-CTD.

3,79 ml roztoku rozpoznávacího činidla BlaR-CTD o koncentraci 6,6 mg/ml se vloží do pufru fosforečnanu sodného o množství 20 mM, pH 7. K tomuto roztoku BlaR-CTD se přidá 41,71 ml hydrogenuhličitanového pufru (0,1 M hydrogenuhličitanu sodného, pH 9) a 2 ml roztoku esteru kyseliny 6-(biotinamido)kapronové a N-hydroxy-sukcinimidu o koncentraci 2,23 mg/ml, také v hydrogenuhličitanovém pufru. Tento roztok je šetrně míchán na zkumavkovém míchacím zařízení s rotační osou typu LABINCO (dodávaný společností VEL, Belgie) rychlostí 2 otáčky/minutu po dobu 2 hodin za teploty okolí, skryt před světlem. 2,5 ml roztoku pufru Tris 1 M pH 8 se inkubuje s reakční směsí za stejných podmínek po dobu 30 minut. Takto získaný roztok je dialyzován proti pufru HNM (Hepes 100mM, pH 8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) během doby 24 hodin. Tímto způsobem se získá roztok BlaR-CTD s navázaným biotinem, který se zředí v pufru HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml) do výsledné koncentrace 250 mg BlaR-CTD s navázaným biotinem na jeden ml pufru. Tento roztok je skladován při teplotě -20°C.

#### 1.1.2. Označovací činidlo.

Jako označovací činidlo se používají částice zlata, které mají průměr o velikosti 40 nm, na které byly nanесeny kozí protilátky proti biotinu ve formě suspenze ve vodném roztoku tetraborátu sodného v množství 2 mM o pH 7,2, stabilizovaného nitridem sodným o koncentraci 0,1 % (dodávaný společností BRITISH BIOCELL (Ref. GAB40)). Optická hustota těchto suspenzí je při vlnové délce 520 nm přibližně 10 a koncentrace proteinu je přibližně rovna 24 mg/ml.

#### 1. 1. 3. Napojení BlaR-CTD s navázaným biotinem na zlaté kuličky.

Roztok BlaR-CTD, na který je navázaný biotin, připravený v příkladu 1.1.1 je zředěn 114,7 krát puforem HNM-BSA (Hepes 500 mM, pH 8, NaCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, BSA 10 mg/ml). Za teploty okolí se smíchá 22,5 objemových dílů tohoto zředěného roztoku BlaR-CTD, na který je navázaný biotin, 7,5 objemových dílů pufru HNM-BSA, 9,27 objemových dílů suspenze částic zlata sloužících k označení BlaR-CTD, na který je navázaný biotin a 6 objemových dílů suspenze referenčních částic zlata (viz níže příklad 1.1.4).

#### 1.1.4. Nezávislé referenční činidlo.

V tomto testu se také používá referenční látka, která vytváří pruh, jehož intenzita umožňuje rychle kvantifikovat množství antibiotika přítomného ve vzorku.

Jako referenční činidlo se použijí částice zlata o průměru 40 nm, na které byly nanесeny kozí protilátky proti

králičímu imunoglobulinu. Tyto částice jsou dodávány společností BRITISH BIOCELL (Ref. GAR40) ve formě suspenzí ve vodném roztoku tetraboritanu sodného 2 mM při pH 7,2, stabilizované nitridem sodným 0,1 %. Optická hustota této suspenze při vlnové délce 520 nm je zhruba 3 a koncentrace proteinu je zhruba rovna 6 mg/ml.

### 1.2. Testovací zařízení.

Testovací zařízení, které je používáno, sestává z pevného nosiče (1), který se skládá z prvního a druhého konce, na které jsou postupně navázány, počínaje prvním koncem, - membrána (2) umožňující purifikaci analyzované tekutiny, - membrána (3), na které jsou imobilizovány dvě záchytné látky (referenční antibiotikum a látka, která je schopná zachytit nezávislé referenční činidlo), a absorpční membrána (4).

#### 1.2. 1. Sestavení testovacího zařízení.

Sestavení membránových karet.

Karty o velikosti 300 x 76,2 mm se napřed sestaví použitím laminačního zařízení typu Chlamshell Laminator (dodávané společností Bio Dot, Inc.) následujícím způsobem:

Vyřízne se obdélník z plastového nosiče typu ArcCare 8565 (dodávaného společností Adhesive Research) o rozměrech 300 x 76,2 mm (pevný nosič (1)). Potom se vyřízne obdélník membrány Leukosorb LK4 (dodávané společností Pall Gelman Sciences) o rozměrech 300 x 20 mm (membrána (2)), obdélník membrány Hi-Flow SX (dodávané společností Millipore) o rozměrech 300 x 25 mm (membrána (3)), obdélník membrány z

celulózy 3 mm (dodávané společností Whatmann) o rozměrech 300 x 40 mm (membrána (4)).

Membrány (2) a (4), potom (3) se postupně uloží na specifické místo spodní formy laminačního zařízení. Pevný nosič (1) pokrytý lepidlem je sám o sobě uchováván v příklopu tohoto zařízení. Lepivá strana nosiče je vystavena na vzduchu. Membrány uložené ve spodní formě se uvedou do kontaktu s lepivým nosičem uzavřením laminačního zařízení; membrány se udržují přesně na svých místech pomocí podtlaku vytvářeného vývěvou. Po přerušení tvorby podtlaku se vyjme karta, tvořená pevným nosičem (1), na kterém jsou připevněny membrány (2), (3) a (4).

Potom se na membránu (3) nanesou následující roztoky: z proximální části: první záchytná látka; proužek číslo 1; z distální části: druhá záchytná látka; proužek číslo 2. Tyto záchytné látky jsou nanášeny za pomoci nanášecího zařízení typu X-Y Platform Biojet Quanti-3000 společností Bio Dot, Inc.

Nanesené roztoky se okamžitě odpaří umístěním souboru karty po dobu jedné minuty do proudu vzduchu o teplotě 60°C.

Karty získané výše popsaným sestavením se nastříhají na pásy pomocí zařízení typu guilotiny nebo pomocí rotačního zařízení (dodávaného společnostmi Bio Dot, Kinematic nebo Akzo). Pásy vzniklé z konců karet jsou vyhozeny, ostatní pásy jsou připraveny k použití.

Obrázek 1 představuje takové testovacího zařízení.

Testovací zařízení jsou konzervovány umístěním do neprůhledné, hermeticky uzavřené nádoby za přítomnosti dezinfekčního činidla (Air Sec, France).

1.2.2. První záchytná látka - Referenční antibiotikum.

8 ml roztoku obsahujícího množství 213 mg lidského gamaglobulinu (G4386, Sigma) a 8,6 mg hydrochloridu 2-iminothiolanu (Aldrich, 33056-6) v pufru uhličitanu sodného (100 mM, pH 9) se inkubují po jednu hodinu při teplotě 25°C.

Odděleně se inkubuje po jednu hodinu při teplotě 25°C objem 20 ml roztoku obsahujícího množství 119,8 mg cefalosporinu-C a 54 mg sulfosukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylátu (sSMCC, 22322 Pierce) v pufru uhličitanu sodného (100 mM, pH 9).

Dva roztoky, které byly předtím připraveny se potom smíchají. pH vzniklého roztoku se upraví na 7,1 přidáním 3 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  500 mM a inkubuje se po dvě hodiny při teplotě 25°C. Směs získaná po inkubaci se dialyzuje třikrát proti 1 litru pufru fosforečnanu sodného (10 mM, pH 7,5). Vzniklý roztok se filtruje na filtru o pórech velikosti 0,22  $\mu\text{m}$ , potom se alikvotuje a zmrazí při teplotě -20°C až do použití.

Při použití se alikvoty rozmrazí a přidá se potravinářské barvivo před uskutečněním nanesení na membránu, aby byla v každém okamžiku zaručena přesná poloha nanesení a kvalita

stopy.

První záchytná látka dovoluje fixaci BlaR-CTD navázaných na zlaté kuličky přítomných v přebytku, vzhledem k množství antibiotik přítomných ve vzorku.

1.2.3. Druhá záchytná látka - Látka schopná zachytit nezávislé referenční činidlo.

Jako druhé záchytné látky se používá roztok králičího imunoglobulinu (Sigma I 5006) o koncentraci 0,5 mg/ml imunoglobulinu v pufru fosforečnanu sodného v množství 10 mM, pH 7,5, lidský gammaglobulin o koncentraci 5 mg/ml. Tato druhá záchytná látka zachytává referenční činidlo během migrace kapaliny na testovacím zařízení.

1.3. Určení antibiotik v mléce.

1.3.1. Test během 3 minut - Rychlý test

Připraví se sedm vzorků čerstvého mléka, které obsahují postupně 0; 1; 2; 3; 4; 5 a 6 ppb penicilinu G. Každý z těchto roztoků je potom analyzován následujícím způsobem.

Odebere se alikvot 200 ml vzorku mléka a 45,27 ml roztoku připraveného v příkladu 1.1.3, které se umístí do skleněné baňky. Tato směs se inkubuje po 1 minutu při teplotě 47°C. Potom se testovací zařízení umístí vertikálně do skleněné baňky tak, aby byl první konec testovacího zařízení v kontaktu se směsí a tak, aby druhý konec testovacího zařízení byl na stěně skleněné baňky. Směs se ponechá migrovat testovacím zařízením a soubor se nechá inkubovat po 2 minuty při teplotě 47°C.

Níže uvedená Tabulka 1 udává výsledky získané pro 7 vzorků, které byly testovány. Detekovaným pruhům byla přiřazena intenzita v rozmezí od 0 do 10, přičemž hodnota 10 znamená, že pruh je nejintenzivnější a hodnota 0 znamená, že pruh je nejméně intenzivní. V této stupnici byla hodnota 6 přiřazena referenčnímu pruhu. Intenzita signálu pozorovaného v prvním detekčním pruhu je nepřímo úměrná množství penicilinu G, který je přítomen ve vzorku.

Tabulka 1

Penicilin G (ppb)	Intenzita	
	první pruh	druhý pruh
0	10	6
1	9	6
2	9	6
3	4	6
4	0	6
5	0	6
6	0	6

V tomto příkladu pokud byl první pruh méně intenzivní než referenční pruh, byl test považován za pozitivní. Výsledky uvedené v Tabulce 1 ukazují, že test dovoluje detekovat do 3 minut až do 4 ppb penicilinu G ve vzorku mléka.

Pokusy byly za stejných podmínek také provedeny u jiných antibiotik s beta-laktamovým jádrem. Tento test, který je proveden během 3 minut, dovoluje detekci amoxicilinu do množství 5 ppb, ampicilinu do množství 5 ppb, cloxacilin v méně než 10 ppb, dicloxacilin v méně než 20 ppb, oxacilin v méně než 20 ppb a cefapirin do množství 20 ppb ve vzorku

mléka.

### 1.3.2. Test během 5 minut

Připraví se šest vzorků čerstvého mléka, které obsahují postupně 0; 2; 4; 6; 8 a 10 ppb cloxacilinu. Každý z těchto roztoků je potom analyzován následujícím způsobem.

Odebere se alikvot 200 ml vzorku mléka a 45,27 ml roztoku připraveného v příkladu 1.1.3, které se umístí do skleněné baňky. Tato směs se inkubuje po 3 minut při teplotě 47°C. Potom se testovací zařízení umístí vertikálně do skleněné baňky tak, aby byl první konec testovacího zařízení v kontaktu se směsí a tak, aby druhý konec testovacího zařízení byl na stěně skleněné baňky. Směs se ponechá migrovat testovacím zařízením a soubor se nechá inkubovat po 2 minuty při teplotě 47°C.

Níže uvedená Tabulka 1 udává výsledky získané pro 6 vzorků, které byly testovány. Detekovaným pruhům byla přiřazena intenzita v rozmezí od 0 do 10, přičemž hodnota 10 znamená, že pruh je nejintenzivnější a hodnota 0 znamená, že pruh je nejméně intenzivní. V této stupnici byla hodnota 6 přiřazena referenčnímu pruhu. Intenzita signálu pozorovaného v prvním detekčním pruhu je nepřímo úměrná množství Cloxacilinu, který je přítomen ve vzorku.

Tabulka 2

Cloxacilin (ppb)	Intenzita	
	první pruh	druhý pruh
0	10	6
2	6	6
3	5	6
4	3	6
5	3	6
10	3	6

V tomto příkladu pokud byl první pruh méně intenzivní než referenční pruh, byl test považován za pozitivní. Výsledky uvedené v Tabulce 2 ukazují, že test dovoluže detekovat do 5 minut až 4 ppb cloxacilinu ve vzorku mléka.

Pokusy byly za stejných podmínek také provedeny u jiných antibiotik s beta-laktamovým jádrem. Tento test, který je proveden během 5 minut dovoluže detekci penicilinu G do 3 ppb, amoxicilinu do 4 ppb, ampicilinu do množství 4 ppb, dicloxacilinu do množství 8 ppb, oxacilinu do množství 20 ppb, cefapirinu do množství 16 ppb, ceftiofuru do množství 100 ppb, cefchinonu v množství menším než než 20 ppb, nafcilinu do množství 20 ppb a cefazolinu do množství 60 ppb ve vzorku mléka.

Tento test se obzvláště hodí jako výběrový test před plněním nádrží kamionů, které transportují mléko.

### 1.3.3. Test během 9 minut

Připraví se šest vzorků čerstvého mléka, které obsahují



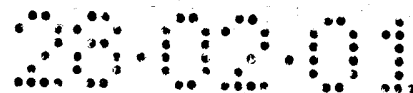
postupně 0; 4; 6; 8; 10 a 12 ppb cefapirinu. Každý z těchto roztoků je potom analyzován následujícím způsobem.

Odebere se alikvot 200 ml vzorku mléka a 45,27 ml roztoku připraveného v příkladu 1.1.3, které se umístí do skleněné baňky. Tato směs se inkubuje po 7 minut při teplotě 47°C. Potom se testovací zařízení umístí vertikálně do skleněné baňky tak, aby byl první konec testovacího zařízení v kontaktu se směsí a tak, aby druhý konec testovacího zařízení byl na stěně skleněné baňky. Směs se ponechá migrovat testovacím zařízením a soubor se nechá inkubovat po 2 minuty při teplotě 47°C.

Níže uvedená Tabulka 3 udává výsledky získané pro 6 vzorků, které byly testovány. Detekovaným pruhům byla přiřazena intenzita v rozmezí od 0 do 10, přičemž hodnota 10 znamená, že pruh je nejintenzivnější a hodnota 0 znamená, že pruh je nejméně intenzivní. V této stupnici byla hodnota 6 přiřazena referenčnímu pruhu. Intenzita signálu pozorovaného v prvním detekčním pruhu je nepřímo úměrná množství Cefapirinu, který je přítomen ve vzorku.

Tabulka 3

Cefapirine (ppb)	Intenzita	
	první pruh	druhý pruh
0	10	6
4	6	6
6	5	6
8	4	6
10	3	6
12	3	6



V tomto příkladu pokud byl první pruh méně intenzivní než referenční pruh, byl test považován za pozitivní. Výsledky uvedené v Tabulce 3 ukazují, že test dovoluje detekovat do 9 minut až 6 ppb cefapirinu ve vzorku mléka.

Pokusy byly za stejných podmínek také provedeny u jiných antibiotik s beta-laktamovým jádrem. Tento test, který je proveden během 9 minut dovoluje detekci penicilinu G do množství 3 ppb, amoxicilinu do 4 ppb, ampicilinu do 4 ppb, cloxacilinu do množství 4 ppb, dicloxacilinu do množství 8 ppb, oxacilinu do množství 8 ppb, cefapirinu do 16 ppb, ceftiofuru do množství 100 ppb, cefchinonu v množství menšího než než 20 ppb, nafcilinu do množství 20 ppb a cefazolinu do množství 60 ppb ve vzorku mléka.

Tento test, který je proveden během 9 minut, umožňuje detekci všech antibiotik právě kontrolovaných v Evropském společenství a to až do legálních prahových množství daných v Evropském společenství.

#### 1.3.4. Test během 20 minut

Připraví se šest vzorků čerstvého mléka, které obsahují postupně 0; 20; 30; 40; 50 a 60 ppb ceftiofuru. Každý z těchto roztoků je potom analyzován následujícím způsobem. Odebere se alikvot 200 ml vzorku mléka a 45,27 ml roztoku připraveného v příkladu 1.1.3, které se umístí do skleněné baňky. Tato směs se inkubuje po dobu 20 minut při teplotě 47°C. Potom se testovací zařízení umístí vertikálně do skleněné baňky tak, aby byl první konec testovacího zařízení v kontaktu se směsí a tak, aby druhý konec testovacího zařízení byl na stěně skleněné baňky. Směs se

ponechá migrovat testovacím zařízením a soubor se nechá inkubovat po 2 minuty při teplotě 47°C.

Níže uvedená Tabulka 4 udává výsledky získané pro 6 vzorků, které byly testovány. Detekovaným pruhům byla přiřazena intenzita v rozmezí od 0 do 10, přičemž hodnota 10 znamená, že pruh je nejintenzivnější a hodnota 0 znamená, že pruh je nejméně intenzivní. V této stupnici byla hodnota 6 přiřazena referenčnímu pruhu. Intenzita signálu pozorovaného v prvním detekčním pruhu je nepřímo úměrná množství Ceftiofuru, který je přítomen ve vzorku.

Tabulka 4

Ceftiofur (ppb)	Intenzita	
	první pruh	druhý pruh
0	10	6
20	6	6
30	5	6
40	4	6
50	3	6
60	3	6

V tomto příkladu pokud byl první pruh méně intenzivní než referenční pruh, byl test považován za pozitivní. Výsledky uvedené v Tabulce 4 ukazují, že test dovoluje detekovat do doby 20 minut až 30 ppb ceftiofuru ve vzorku mléka.

Tento test, který je proveden během 20 minut umožňuje jedním testem detekci všech antibiotik právě kontrolovaných v Evropském společenství a Americe, a to až do legálních

prahových množství daných v Evropském společenství a Americe.

Příklad 2. Určení 6 antibiotik v mléce.

Tento příklad ilustruje detekci 6 antibiotik s  $\beta$ -laktamovým jádrem, které jsou kontrolovány hygienickými úřady v Americe, v mléku. Test popsáný v tomto příkladu používá receptor BlaR-CTD vázaný ve formě fúzovaného proteinu spolu s beta-laktamázu, v testu se používá nosiče, který je představován magnetickými kuličkami.

#### 2. 1. Fúzovaný protein BlaR-CTD-beta-laktamáza.

Fúzovaný protein BlaR-CTD-beta-laktamáza je získán genetickou kopulací mezi receptorem BlaR-CTD (B. JORIS a al., PEMS Microbiology Letters, 107-114, 1990) a beta-laktamázu na Zn z *Bacillus cereus* (M. Hussain a al., 1985, J. Bact., 164:1, 223-229, 1985).

Spojení je realizováno následujícím způsobem:

2.1.1. Konstrukce plazmidu: byla provedena kopulace 1/1 mezi geny polypeptidu BlaR-CTD a beta-laktamázy: gen kódující beta-laktamázu byl vnesen ve fázi za gen BlaR-CTD. Plazmid, který nese genetickou fúzi dále obsahuje gen rezistence na kanamycin. Fúzovaný protein je dále nazýván Fus 1.

#### 2.1.2. Výroba:

- Kmen: plazmid nesoucí fúzované geny byl vnesen do *E. Coli*. Klony nesoucí rekombinantní plazmid jsou selektovány

na základě LB + Km (50 mg/ml).

- Selekce: označení buněčného extraktu radioaktivním antibiotikem, následované elektroforézou na denaturujícím polyakrylamidovém gelu, ukazuje, že většina produkovaného proteinu je vytvořena ve formě fúzovaného produktu, jehož molekulová hmotnost je asi 50000. Přesto se ale zdá, že post-translační proteolytické štěpení disociuje pouze velmi malé procento (2 %) těchto molekul na dvě molekuly s různou aktivitou.

- Kultura: 500 ml LB + Km (50 mg/ml) média s rekombinantními buňkami (konzervovaného při  $-70^{\circ}\text{C}$ ) je naočkováno. Prekultura je inkubovaná při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  a protřepávaná přes noc rychlostí 225 otáček za minutu. 18 litrů média LB + Km (50 mg/ml) je naočkováno do 500 ml této prekultury, jejíž optická hustota při vlnové délce 600 nm nabývá hodnotu 4. Kultura 18 litrů je zastavena v okamžiku, kdy optická hustota bude mít hodnotu 6.

2.1.3. Extrakce: Ihned po zastavení kultury se buňky filtrují a potom centrifugují. Supernatant, který obsahuje buněčnou sraženinu, je lyzován dezintegrátorem a uchován. Obsahuje fúzovaný protein FUS1.

2.1.4. Purifikace:

Použité pufry:

Pufr A: Tris 20 mM pH 8,0, etylenglykol 10 %, DTT 50 mM;

Pufr B: pufr A + NaCl 1M.

Fúzovaný protein se částečně purifikuje iontovou chromatografií a na iontovém sítu. Po nanesení extraktu a

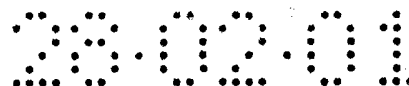
promytí na koloně QSPP (Pharmacia, Upsala) pufrem A se FUS1 vymývá lineárním gradientem pufru B. Aktivní frakce ( $\pm 0,25$  M v NaCl) se potom seberou a nanesou na molekulární síto G-100 (Pharmacia, Upsala); vymývají se pufrem A. Specifická střední aktivita získaného vzorku je odhadovaná na 30 %.

2.1.5. Inhibice beta-laktamázy: Fúzovaný protein (9/10 volume) se inkubuje v EDTA 50 mM (1/10 objemově) během 45 minut při teplotě 37°C. Inhibice se kontroluje pomocí nitrocefínu v kacodylátovém pufru 10 mM pH 6,0. V přítomnosti Zn musí být signál pozitivní, v jeho nepřítomnosti musí signál být negativní. Po inhibici bude efektivní koncentrace měřená na základě aktivity beta-laktamázy mít hodnotu 7,74 mmol/ml.

2.2. Pevný nosič: magnetické kuličky - cefalosporin C (referenční antibiotikum).

Používají se částice BioMag 4100 (dostupné u výrobce DRG Instrument GmbH, Marburg, Německo pod referenčním kódem AM 4100 B.), jejichž koncové NH<sub>2</sub> skupiny jsou aktivované glutaraldehydem následujícím způsobem:

jeden objemový díl původního roztoku částic BioMag 4100 se čtyřikrát propláchne pomocí 5 objemových dílů pufru pyridinu v množství 0,01 M pH 6,0. Částice se dále přidají do 2,5 objemových dílů 5 % glutaraldehydu v pyridinovém pufru a protřepávají se rotačně během tří hodin za teploty okolí. Potom se částice desetkrát propláchnou pomocí dvou objemových dílů pufru Kpi 0,01 M pH 7,0. Částice se potom uvedou znovu do suspenze do jednoho objemového dílu cefalosporinu C 0,1 M v pufru Kpi a protřepávají se



rotačně během po jednu noc při teplotě +4°C. Poslední propláchnutí se provádí až do úplného odstranění cefalosporinu C v pufru Kpi 0,1 M pH 7,0.

2.3. Určení 6 antibiotik penicilinu G, ampicilinu, amoxicilinu, cloxacilin, cefapirinu a ceftiofuru v mléce.

2.3. 1. Použité roztoky:

- roztok 1: 700 pikomolů fúzovaného proteinu lyofilizovaného v Tris v množství 100 mM, pH 8, BSA 1 mg/ml, EDTA 50 mM, DTT 50 mM se rehydratuje objemem 5 ml vody Milli-Q; objem 50 ml tohoto roztoku je nutný pro provedení měření.

- roztok 2: objem 2 ml částic BioMag-cefalosporin C připravených v příkladu vynálezu 1.2 v isopropanolu 100 %; objem 20 ml tohoto roztoku je nutný pro provedení měření.

- roztok 3: lyofilizovaný pufr kacodylátu v množství 10 mM, pH 6, NaCl 1M se rehydratuje pomocí objemu 500 ml vody Milli-Q.

- roztok 4: objem 400 ml nitrocefínu 10 mM v DMP se rozpustí na objem 40 ml v roztoku 3; pro detekci je potřeba objemu 400 ml.

2.3.2. Způsob detekce:

50 µl roztoku 1 se umístí za přítomnosti objemu 500 ml vzorku dopovaného mléka a inkubuje se při teplotě 47°C během doby 2 minut. Objem 20 ml roztoku 2 se suspenduje v mléce, které se znovu inkubuje během 2 minut při teplotě 47°C. Částice se přitahnou na stěnu nádoby pomocí paramagnetického magnetu, zatímco supernatant se odstraní. Částice se dvakrát propláchnou roztokem 3 postupem podobným



způsobu s magnetem. Konečně se objem 400 ml roztoku 4 inkubuje za přítomnosti částic během 3 minut při teplotě 47°C. Měří se zbytková absorbance roztoku roztoku při vlnové délce 482 nm vzhledem k roztoku nitrocefínu.

Tento způsob umožňuje detekci 6 antibiotik převzatých z amerických norem, a to jejich koncentraci, která je menší než koncentrace daná normou, to je penicilin při 5 ppb, ampicilin při 10 ppb, amoxicilin při 10 ppb, cloxacilin při 10 ppb, cefapirin při 20 ppb a ceftiofur při 50 ppb.

Příklad 3. Určení 3 antibiotik (penicilin G, cloxacilin, ceftiofur) v mléce.

Tento příklad ilustruje detekci 3 antibiotik s beta-laktamovým jádrem kontrolovaných hygienickou službou v mléce. Popsaný test v tomto příkladu používá receptory BlaR-CTD ve formě dvou fúzovaných proteinů a to spolu s alkalickou fosfatázou a peroxydázou a používá nosič, který je představován ve formě mikroskopy.

3. 1. Fúzovaný protein BlaR-CTD-alkalická fosfatáza.

Fúzovaný protein BlaR-CTD-alkalická fosfatáza se získá chemickou kopulací receptoru BlaR-CTD (B. JORIS a al., FEMS Microbiology Letters, 107-114, (1990)) s aktivovanou alkalickou fosfatázou dostupnou od výrobce Boehringer Mannheim Biochemica pod referenčním kódem 1464752.

Kopulace se provádí následujícím způsobem:

3.1.1. Konjugace: BlaR-CTD a alkalická fosfatáza se dialyzují v pufru uhličitan/hydrogenuhličitan sodný v množství 100 mM při pH 9,8. 15 nanomolů BlaR-CTD se

inkubuje za přítomnosti objemu 100 ml aktivované alkalické fosfatázy (20 mg/ml) během dvou hodin při teplotě 25°C.

3.1.2. Zastavení reakce: Přidá se objem 40 ml roztoku trietanolaminu 2 mM, pH 8, potom objem 50 ml roztoku hydroborátu sodného v množství 200 mM. Směs se inkubuje během 30 minut při teplotě +4°C. Pak se přidá objem 25 ml roztoku trietanolaminu 2 mM, pH 8, potom se směs znovu inkubuje během hodin při teplotě +4°C.

3.1.3. Stabilizace spojení: Přidá se objem 10 ml roztoku glycinu v množství 1M, pH 7,0.

3.1.4. Přenos ve skladovacím pufru: Reakční směs (přibližně 300 ml) se třikrát dialyzuje po dobu 8 hodin objemem 0,5 litrů trietanolaminového pufru v množství 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mM, glycin 10 mM při teplotě +4°C.

3.1.5. Konečný titr: konečný titr spojení nabývá hodnot 50 mmol BlaR-CTD aktivního na ml roztoku.

### 3.2. Fúzaný protein BlaR-CTD-peroxydáza

Fúzaný protein BlaR-CTD-peroxydáza se získá chemickou kopulací mezi receptorem BlaR-CTD (B. JORIS a al., FEMS Microbiology Letters, 107-114, (1990)) a aktivovanou peroxydázou dostupnou od výrobce Boehringer Mannheim Biochemica pod referenčním kódem 1428861.

Spojení se realizuje následujícím způsobem:



3.2.1. Konjugace: BlaR-CTD a peroxydáza se dialyzují v pufru uhličitan/hydrogenuhlíčan sodný v množství 100 mM při pH 9,8. 40 nanomolů BlaR-CTD se inkubuje za přítomnosti objemu 100 ml aktivované peroxydázy (16 mg/ml) během dvou hodin při teplotě 25°C.

3.2.2. Zastavení reakce: Přidá se objem 40 ml roztoku trietanolaminu v množství 2 mM, pH 8, potom objem 50 ml roztoku hydroborátu sodného v množství 200 mM. Směs se inkubuje během 30 minut při teplotě +4°C. Přidá se objem 25 ml roztoku trietanolaminu v množství 2 mM, pH 8, potom směs znovu inkubuje během hodin při teplotě + 4°C.

3.2.3. Stabilizace spojení: Přidá se objem 10 ml roztoku glycinu v množství 1M, pH 7,0.

3.2.4. Přenos ve skladovacím pufru: Reakční směs (přibližně objem 400 ml) se třikrát dialyzuje po dobu 8 hodin objemem 0,5 litrů pufru fosforečnanu draselného v množství 10 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, glycin 10 mM při teplotě +4°C.

3.2.5. Konečný titr: konečný titr spojení nabývá hodnot 100 mmol BlaR-CTD aktivního na ml roztoku.

3.3. Pevný nosič: mikrodeska-cefalosporin C.

3.3.1. Příprava roztoku referenčního antibiotika.

Objem 8 ml roztoku obsahujícího 213 mg lidského gamaglobulinu (G4386, Sigma) a 8,6 mg hydrochloridu 2-iminiothiolanu (Aldrich, 33056-6) v pufru uhličitanu sodného (100 mM, pH 9) se inkubují po jednu hodinu při teplotě 25°C.

Odděleně se inkubuje po dobu jedné hodiny při teplotě 25°C objem 20 ml roztoku obsahujícího 119,8 mg cefalosporinu-C a 54 mg sulfosukcinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylátu (sSMCC, 22322 Pierce) v pufru uhličitanu sodného (100 mM, pH 9).

Oba dva roztoky, které byly připraveny předtím, se potom smíchají. pH vzniklého roztoku se upraví na 7,1 přidáním objemu 3 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v množství 500 mM a inkubuje se po dobu dvou hodin při teplotě 25°C. Směs získaná po inkubaci se dialyzuje třikrát proti objemu 1 litru pufru fosforečnanu sodného (10 mM, pH 7,5). Vzniklý roztok se filtruje na filtru o pórech velikosti 0,22 µm.

3.5.2. Pokrytí mikrodesek referenčním antibiotikem. Používají se polystyrenové mikrodесky s vysokou schopností adsorbce proteinu, dodávané společností NUNK (Immuno Plate: typ Maxisorp) nebo dodávané společností GREINER (microlon 600, reference 705071). Jamky mikrodesek jsou myté puftrem PBS v množství 150 mM, pH 7,2. Alikvot roztoku připravený v příkladu 3.3.1. se potom inkubuje během 24 hodin při teplotě 4°C v jamkách. Po inkubaci se jamky promývají třikrát puftrem PBS 150 mM, pH 7,2, Tween-20 0,1 %. Zkumavka se během dvou hodin při teplotě 20°C saturuje saturačním puftrem PBS 150 mM, pH 7,2, BSA 5 %. Po třech promytích mycím puftrem se zkumavky suší a skladují při teplotě 4°C, chráněné před vlhkem.

Pro jamky určené pro rozpoznávací činidlo BlaR-CTD-alkalická fosfatáza je použitým mycím puftrem dietanolamin 1

M, pH 9,8,  $MgCl_2$  0,5 mM; Pro jamky určené pro rozpoznávací činidlo BlaR-CTD-peroxydáza, je použitým mycím pufrem fosforečnan draselný v množství 50 mM, pH 5.

#### 3.4. Určení tří antibiotik v mléce.

Množství 1,4 pikomolů značeného rozpoznávacího činidla se inkubuje za přítomnosti objemu 100 ml dopovaného mléka během 5 minut při teplotě 47°C. Mléko se za pomoci pipety přelije do jamky předem upravené podle příkladu 2.3.5. Mléko se inkubuje během 2 minut při teplotě 47°C. Po odstranění mléka následovaném dvěma mytími mycím pufrem (viz příklad 2.3.2.), se inkubuje během 2 minut v jamce 300 ml pufru obsahujícího vývojový substrát (vývojový substrát pro rozpoznávací činidlo BlaR-CTD-peroxydáza: fosforečnan draselný v množství 50 mM, pH 5, ABTS 9,1 mM,  $H_2O_2$  0,002 %; vývojový substrát pro rozpoznávací činidlo BlaR-CTD-alkalickou fosfatázou: dietanolamin 1 M, pH 9,8,  $MgCl_2$  0,5 mM, 4-NPP 10 mM). Deska se potom umístí do automatického spektrofotometru pro desky používané při ELISA, vlnová délka se nastaví na hodnotu 405 nm.

Tento test umožňuje detekci tří antibiotik penicilinu G, cloxacilinu a ceftiofuru až do prahových hodnot vymezených americkými předpisy (penicilin G 5 ppb, cloxacilin 10 ppb a ceftiofur 50 ppb).

Příklad 4. Určení 6 antibiotik penicilinu G, ampicilinu, amoxicilinu, cloxacilinu, cefapirinu a ceftiofuru v mléce. Tento příklad ilustruje detekci 6 antibiotik s beta-laktamovým jádrem v mléce až do prahových hodnot vymezených americkými předpisy. Popsaný test v tomto příkladu používá

receptory BlaR-CTD ve formě fúzovaného proteinu s alkalickou fosfatázou nebo peroxydázou a používá nosič, který je představován ve formě potažené zkumavky.

#### 4. 1. Fúzovaný protein BlaR-CTD-alkalická fosfatáza.

Viz příklad 3. 1.

#### 4.2. Pevný nosič: zkumavka potažená referenčním antibiotikem.

V tomto příkladu se používá se polystyrenových zkumavek s vysokou schopností adsorbce proteinu, dodávané firmou NUNK (typ Maxisoo), na které se působí roztokem referenčního antibiotika, jak je uvedeno v příkladu 3.3.2.

#### 4.3. Určení 6 antibiotik v mléce.

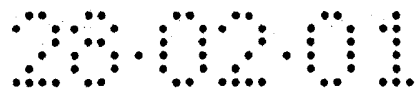
Množství 7 pikomolů rozpoznávacího činidla se inkubuje za přítomnosti objemu 500 ml mléka během 5 minut při teplotě 47°C v Eppendorfově zkumavce. Mléko se za pomoci pipety přelije do předem upravené zkumavky podle příkladu 3.2. Mléko se inkubuje během 2 minut při teplotě 47°C. Po odstranění mléka se zkumavka následovně promývá dvakrát objemem 1 ml pufru dietanolaminu v množství 1 M, pH 9,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Potom se přidá objem 500 ml pufru obsahujícího vývojový substrát dietanolamin v množství 1 M, pH 9,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, 4-NPP 10 mM a substrát se inkubuje během 2 minut při teplotě 47°C. Potom se měří absorbance supernatantu za pomoci spektrofotometru, jehož vlnová délka je nastavena na hodnotu 405 nm.

Tato metoda dovoluje určit 6 antibiotika až do prahových hodnot vymezených americkými předpisy: penicilin G v

množství menším než 5 ppb; ampicilin v množství menším než 10 ppb; amoxicilin v množství menším než 10 ppb; cloxacilin v množství menším než 10 ppb; cefapirin v množství menším než 20 ppb; ceftiofur v množství menším než 50 ppb.

Zastupuje:

dr. O. Švorčík



TV 2000 - 4790

16179

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Způsob detekce antibiotik s beta-laktamovým jádrem v biologické tekutině, který zahrnuje následující etapy
  - a) uvedení určeného objemu biologické tekutiny do kontaktu s určitým množstvím rozpoznávacího činidla a inkubace takto získané směsi za podmínek dovolujících tvorbu komplexů antibiotik, případně přítomných v biologické tekutině, s rozpoznávacím činidlem,
  - b) uvedení směsi získané v etapě a) do kontaktu s alespoň jedním referenčním antibiotikem imobilizovaným na nosič, za podmínek dovolujících tvorbu komplexů referenčního antibiotika s množstvím rozpoznávacího činidla, které nereagovalo během etapy a), a
  - c) určení množství rozpoznávacího činidla přichycného k nosiči,vyznačující se tím, že rozpoznávací činidlo obsahuje receptor citlivý na přítomnost antibiotik s beta-laktamovým jádrem, získaný z *Bacillus licheniformis*.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že receptor citlivý na antibiotika s beta-laktamovým jádrem je receptor BlaR nebo receptor BlaR-CTD.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že receptor citlivý na antibiotika s beta-laktamovým jádrem je kopulován s označovacím činidlem vybraným ze souboru, zahrnujícího kovové koloidními částice, koloidní částice selenu, uhlíku, síry nebo teluru, koloidní částice syntetického barveného latexu.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že receptor citlivý na antibiotika s beta-laktamovým jádrem je kopulován s označovacím činidlem vybraným ze souboru, zahrnujícího fluorescenční látky.
5. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že receptor citlivý na antibiotika s beta-laktamovým jádrem je kopulován s označovacím činidlem vybraným ze souboru, zahrnujícího enzymy jako jsou alkalická fosfatáza, peroxydáza, beta-laktamázy.
6. Způsob podle nároku 5, vyznačující se tím, že receptor citlivý na antibiotika je kopulován s enzymatickým označovacím činidlem chemickou nebo genetickou cestou.
7. Způsob podle jednoho z nároků 3 až 6, vyznačující se tím, že kopulace receptoru citlivého na antibiotika s beta-laktamovým jádrem s označovacím činidlem se provede před etapou a).
8. Způsob podle jednoho z nároků 3 až 6, vyznačující se tím, že kopulace receptoru citlivého na antibiotika s beta-laktamovým jádrem s označovacím činidlem se provede během etapy a) nebo po etapě a).
9. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 8, vyznačující se tím, že etapy a) nebo b) se provedou najednou.
10. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že nosič používaný během etapy b) je vybrán ze souboru, zahrnujícího zkumavky, desky nebo tyčky pokryté

referenčním antibiotikem.

11. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že nosič používaný během etapy b) je testovací zařízení obsahující pevný nosič (1), který sestává z prvního a druhého konce, na který jsou postupně přichyceny, počínaje od prvního konce,

- membrána (2) umožňující purifikaci analyzované tekutiny,
- membrána (3), na kterou je imobilizována jedna nebo více zachytných látek
- absorpční membrána (4).

12. Způsob podle jednoho z nároků 1 až 9, vyznačující se tím, že nosič používaný během etapy b) je tvořen souborem kuliček, které jsou nebo nejsou magnetické.

13. Testovací souprava pro detekci antibiotika v biologické tekutině způsobem podle jednoho z nároků 1 až 12, obsahující alespoň jedno rozpoznávací činidlo citlivé na přítomnost antibiotik s beta-laktamovým jádrem, získané z *Bacillus licheniformis*, a alespoň jedno referenční antibiotikum imobilizované na nosiči.

Zastupuje:

dr. O. Švorčík

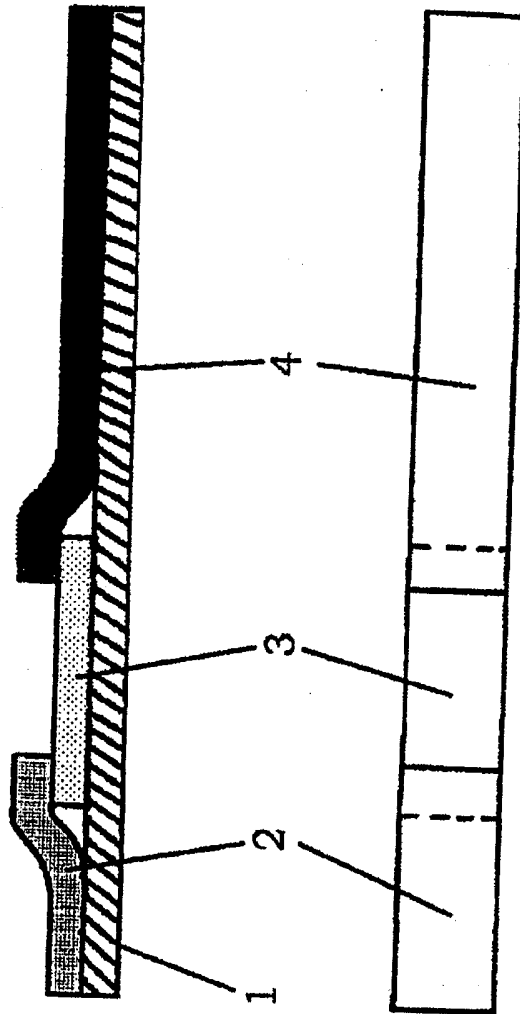
200201

PV 2000-4790

~~16179~~

1/1

Obr. 1



Obr. 1a

Obr. 1b