

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 770502 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 770502

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
C12K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 16.02.1977

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 16.02.1977

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 04.11.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

03.05.1976 US 682651

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Mc Donnell Douglas Corporation, 3855 Lakewood Boulevard Long Beach, California, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Lanham, James Wayne, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Rodgers, Gregory Douglas, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Meyer, Michael Charles, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Elatusliemi E. coli'n havaitsemiseksi kliinistä käyttöä varten automatisoidun mikrobianalysaattorin kanssa

Medel för detektion av E. coli för kliniskt bruk vid automatiserad mikrobanalysator

McDonnell Douglas Corporation; 3855 Lakewood Boulevard, Long Beach, Kalifornia
Yhdysvallat

Elatusliemi E.coli'n havaitsemiseksi kliinistä käyttöä varten automatisoidun mikrobianalysaattorin kanssa - Medium för detektion av E.coli för kliniskt bruk vid automatiserad mikrobanalysator

Esiteltävä keksintö kohdistuu koostumukseen mikrobianalyysiä varten ja erikoisesti väliaineeseen Escherichia coli'n (E.Coli) havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi virtsanäytteistä.

Tämän keksinnön mukainen väliaine on parannettu väliaine, joka on suunniteltu käytettäväksi optisten ilmaisinsysteemien kanssa. Näissä syteemeissä käytetään edullisesti mekanismia ja laitetta, joka soveltuu määrättyjen mikro-organismien analysoimiseksi näytteistä käyttäen muovilautasta tai -korttia, joka sisältää sarjan kuivattuja viljelyväliaineita erillisissä mutta yhdistetyissä koloissa, jokaisen väliaineen ollessa spesifisen kullekin yksittäiselle organismille. Kun näyte sijoitetaan korttiin, sekoitetaan kolossa olevan väliaineen kanssa ja inkuboidaan koneessa, näytteessä oleva organismi (tai organismit) vaikuttaa tälle organismille ominaiseen viljelyväliaineeseen ja aiheuttaa muutoksen väliaineessa, minkä muutoksen kone lukee osoittaen tämän organismin läsnäolon. Muutos väliaineessa aiheuttaa muutoksen väliaineen valonläpäisyominaisuuksissa, so. värimuutoksen tai sameusmuutoksen. Muutos voi aiheutua organismin metabolisesta aktiivisuudesta, joka esimerkiksi voi aiheuttaa hapon muo-

dostumista ja muutoksen pH-arvossa, joka aiheuttaa värimuutoksen väliaineessa olevassa pH-arvolle herkässä indikaattorissa. Muutos väliaineen valonläpäisyominaisuuksissa voi aiheutua väliaineeseen muodostuneesta saostumasta organismi metabolisen aktiviteetin vaikutuksesta tai voi se aiheutua organismin kasvusta.

Edellämainituissa korteissa käytettäviksi suunnitellut spesifiset väliaineet on kaikki suunniteltu edistämään yhden mikro-organismien kasvua ja estämään muiden organismien kasvu, ne voidaan pakastekuivata ja voivat ne toimia kortin koloissa vallitsevassa pienen O_2 -pitoisuuden omaavassa ympäristössä.

Tämän keksinnön mukainen väliaine on suunniteltu edistämään gram-negatiivisen bakteerin *Escherichia coli*'n (*E.coli*) kasvua. Se sisältää sokerilähteitä, joita *E.coli* käyttää selektiivisesti muodostaen happoja ja sisältää se lisäksi pH-arvolle herkkää indikaattoria, pelkistettyä aniliinisinistä, joka muuttuu värittömästä siniseksi tällaisen haponmuodostuksen aiheuttamasta pH-arvon muutoksen vaikutuksesta. Väliaine sisältää lisäksi yhdistelmän estoaineita muita gram-negatiivisia organismeja, pääasiassa *Klebsiella*'aa vastaan. Estoaineiden yhdistelmään kuuluvat kumariinihappo, 3,4-dihydroksibentsoehappo ja saponiini. Tämä yhdistelmä estää *Klebsiella*'n kasvun ja sallii *E.coli*'n kasvun. Väliaine sisältää edelleen pinta-aktiivisia aineita gram-positiivisten organismien estoaineina.

Esiteltävän keksinnön mukaisessa väliaineessa käytetään *E.coli*'n muodostumista edistäviä ravintolähteitä, *E.coli*'n muodostamalle hapolle herkkää biologista pH-indikaattoria ja para-kumariinihapon, saponiinin ja 3,4-dihydroksibentsoehapon muodostamaa yhdistelmää estämään *Klebsiella*'n kasvu sekä muita inhibiittoreita estämään gram-positiivisten mikro-organismien kasvu.

Esiteltävän keksinnön mukainen havaitsemisväliaine sisältää litraa kohti noin 15,1 - 28,0 grammaa ravintoaineita, noin 15-35 millilitraa indikaattoria, joka osoittaa *E.coli*-organismien aiheuttaman hapon muodostumisen, noin 1,5-4,5 grammaa pinta-aktiivisia aineita gram-positiivisten organismien kasvun estämiseksi ja noin 0,05-1,5 grammaa p-kumariinihappoa, noin 0,05-1,5 grammaa 3,4-dihydroksibentsoehappoa, noin 0,75-1,25 grammaa saponiinia, mitkä yhdessä estävät muiden koli-tyyppisten organismien (tyypillisesti *Klebsiella*) kasvun, jotka tavallisesti antavat positiivisia tuloksia testattaessa *E.coli*'a.

Väliaineen ravinto-osa sisältää noin 4,0-6,0 g/l laktoosia, noin 4,0-6,0 g/l L-arabinoosia ja noin 4,0-6,0 g/l gelysaattia ja noin 0,75-1,25 g/l hiivauutetta.

Gelysaattia valmistaa BBL ja on se gelatiinihydrolysaatti valmistettuna uuttamalla haimaa ja on sille tunnusomaista pieni kystiini- ja tryptofaanipitoisuus. Sitä on helposti saatavana lääkkeissä käytettynä kaupallisena artikkelina.

Useimmat E.coli lajit käyttävät laktoosia muodostaen happoa. L-arabiinooisia käytetään ilmaisuaineena, koska se pienempi kuin 10 prosenttia oleva ryhmä E.coli rotuja, jotka eivät pysty helposti käyttämään laktoosia, pystyy käyttämään sen. Täten tämä väliaine, jossa käytetään sokeriyhdistelmää, havaitsee kaikki E.coli rodut.

Sopivia korvikkeita gelysaatille ovat tryptikaasi, fytoni ja polypeptoni.

Sappihappojen suolaseosta, jota toimittaa BBL, käytetään estämään gram-positiivisten organismien kasvua. Sappihappojen suolaseos sisältää sappiuutteita ja on se pinta-aktiivisten aineiden seos, joka estää gram-positiivisten organismien, kuten Bacillus-lajien kasvun. Muihin sopiviin pinta-aktiivisiin aineisiin kuuluvat sappihappojen suolat No 3. taurokoliinihappo jne. Sappihappojen suolaseos on kaupallisesti saatavaa materiaalia, jota yleisesti käytetään estämään gram-positiivisten organismien kasvua.

3,4-dihydroksibentsoehapon, saponiinin ja para-kumariinihapon yhdistelmää käytetään estämään Klebsiella'n ja muiden kolimuotoisten organismien kasvua. Voidaan käyttää myös kumariinihapon orto- ja meta-muotoja. Nämä muodot eivät kuitenkaan estä kolimuotoisten organismien kasvua yhtä tehokkaasti kuin para-muoto.

Käsittelyn alaisessa patenttiansomuksessamme No -----, päivätty -----nimelle A. Wilkinson otsikolla "elatusliemi E.coli'n havaitsemiseksi", esittelemme väliaineen E.coli'n havaitsemiseksi, joka sisältää vain kumariinihappoa estoaineena. On havaittu, että jos organismienseos on läsnä, so.E.coli ja Klebsiella, tapahtuu ilmiö jota ei täysin ymmärretä. Näissä olosuhteissa kumariinihappo estää sekä Klebsiella'n että E.coli'n kasvun. Oletetaan, että Klebsiella on muuttanut kumariinihapon yhdisteiksi, jotka estävät myös E.coli'n kasvun. Lisäämällä saponiinia ja 3,4-dihydroksibentsoehappoa estyy tämä vaikutus ja vain Klebsiella'n kasvu estyy ja E.coli'n sallitaan kasvaa ja vaikuttaa metabolisesti laktoosiin ja L-arabiinooisiin.

Tässä havaitsemisväliaineessa käytetty indikaattori on biologinen pH-indikaattori, jonka väri muuttuu noin pH-arvolla 6,8-7,0. Pelkistetty aniliinisininen on suositeltava indikaattori, koska tämä indikaattori muuttaa väriään väriltömästä siniseksi, joka voidaan helposti havaita otsikolla "automatisoitu mikrobianalysaattori" varustetussa patenttiansomuksessa esitetyn mekanismin avulla. Jos aniliinisininen pelkistetään menetelmän avulla, joka on esitetty Clifton Aldridge'n ja Michael Meyer'in patenttiansomuksessa "herkkä pH-indikaattori", päivätty samalla päivämäärällä, saadaan stabiili tai kirkas neste, joka

muuttuu siniseksi pH-arvolla 6,8-7. Ei tunneta muuta indikaattoria, jolla on sama vaikutus tällä pH-alueella.

Hiivauutetta tai muuta biologista uutetta voidaan lisätä myös vitamiinilähteeksi. Hiivauutetta voidaan käyttää noin 0,95-1,05 g/l. Hiivauutetta toimittaa BBL ja on se autolysoitujen hiivasolujen vesiliukoinen uute. Näitä tuotteita on tavallisesti saatavissa useista lähteistä.

Väliaineen pH täytyy pitää arvossa 7,5 ennen käyttöä.

E.coli elatusliemen valmistus

Sata millilitraa 2x väliainetta valmistetaan sekoittamalla 0,2 grammaa p-kumariinihappoa ja 0,2 grammaa 3,4-dihydroksibentsoehappoa sekä 3 millilitraa 1N NaOH/100 ml väliainetta neljäsosaan tarvittavasta tilavuusmäärästä tislattua vettä. Tätä seosta lämmitetään, kunnes kaikki kiinteät aineet ovat liuenneet. Tähän liuokseen lisätään tislattua vettä, kunnes tilavuus on 95 millilitraa ja sitten lisätään 1,0 grammaa gelysaattia, 1,0 grammaa laktoosia 1,0 grammaa L-arabinoosia, 0,6 grammaa sappihapposuolojen seosta ja 0,2 grammaa hiivauutetta. Tämän jälkeen säädetään pH arvoon 6,2 ja lisätään 5 millilitraa pelkistettyä aniliinisini-indikaattoria yhdessä 0,2 gramman kanssa saponiinia. pH-arvo tarkistetaan ja korjataan arvoon 7,5 lisäämällä tarvittaessa emästä. Liuos suodatetaan steriiliksi, sijoitetaan steriiliin säiliöön ja varustetaan nimilapulla.

Käyttö

Käytetään edelläesitetyllä tavalla valmistettua kaksinkertaisen vahvuuden omaavaa väliainetta. Valmistetta sijoitetaan virtsan seulontakortin koloihin, jollainen on esitetty patenttihakemuksessa "automaattinen mikrobianalyysaattori" pakastekuivataan ja kortti teipataan väliaineen suojaamiseksi. Kaksinkertaisen vahvuuden omaavan väliaineen määrä vastaa puolta kolon tilavuudesta. Täten, kun kolon loppuosa täytetään virtsanäytteellä, väliaine rehydrautuu normaalissa, yksinkertaisen vahvuuden omaavassa pitoisuudessa, jolla pitoisuudella se on toimiva.

Tämä väliaine havaitsee 10^3 solua/ml olevat E.coli'n pitoisuudet 12 tunnissa. Hieman pitempi havaitsemisaika vaaditaan pienemmillä pitoisuuksilla.

Patenttivaatimukset:

1. Koostumus *E.coli*'n selektiiviseksi toteamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää ravintolähteen, indikaattorin *E.coli*'organismien läsnäolon osoittamiseksi sekä aineen muiden kolimuotoisten organismien kasvun estämiseksi, jotka tavallisesti antavat positiivisen tuloksen *E. colia* testattaessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaine on kumariinihapon, 3,4-dihydroksibentsoehapon ja saponiinin yhdistelmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaineeseen kuuluu para-kumariinihappo.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaine sisältää noin 0,05-1,50 g/l para-kumariinihappoa, noin 0,05-1,50 g/l 3,4-dihydroksibentsoehappoa ja noin 0,75-1,25 g/l saponiinia.

5. Jonkun edelläolevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että indikaattori on pelkistetty aniliinisininen.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että indikaattori muuttuu värittömästä siniseksi pH:n muuttuessa arvosta noin 7,5 arvoon noin 6,8-7.

7. Jonkun edelläolevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että siihen sisältyy laktoosin ja L-arabinoosin yhdistelmä ravintolähteenä, jonka *E.coli* käyttää.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää litraa kohti

- (a) noin 0,05-1,50 grammaa para-kumariinihappoa,
- (b) noin 0,05-1,50 grammaa 3,4-dihydroksibentsoehappoa,
- (c) noin 0,75-1,25 grammaa saponiinia,
- (d) noin 4,0-6,0 grammaa laktoosia,
- (e) noin 4,0-6,0 grammaa L-arabinoosia,
- (f) noin 6,0 grammaa typpilähdettä,
- (g) noin 0,75-1,25 grammaa hiivauutetta,
- (h) noin 1,5-4,5 grammaa gram-positiivista estoainetta,
- (i) noin 15-35 millilitraa biologista pH-indikaattoria ja
- (j) tislattua vettä, kunnes tilavuus on 1 litra.

Patenttivaatimukset:

1. Koostumus *E.coli*'n selektiiviseksi toteamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää ravintolähteen, indikaattorin *E.coli*'organismin läsnäolon osoittamiseksi sekä aineen muiden kolimuotoisten organismien kasvun estämiseksi, jotka tavallisesti antavat positiivisen tuloksen *E. colia* testattaess.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaine on kumariinihapon, 3,4-dihydroksibentsoehapon ja saponiinin yhdistelmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaineeseen kuuluu para-kumariinihappo.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että estoaaine sisältää noin 0,05-1,50 g/l para-kumariinihappoa, noin 0,05-1,50 g/l 3,4-dihydroksibentsoehappoa ja noin 0,75-1,25 g/l saponiinia.

5. Jonkun edelläolevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että indikaattori on pelkistetty aniliinisininen.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että indikaattori muuttuu värittömästä siniseksi pH:n muuttuessa arvosta noin 7,5 arvoon noin 6,8-7.

7. Jonkun edelläolevan patenttivaatimuksen mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että siihen sisältyy laktoosin ja L-arabinoosin yhdistelmä ravintolähteenä, jonka *E.coli* käyttää.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää litraa kohti

- (a) noin 0,05-1,50 grammaa para-kumariinihappoa,
- (b) noin 0,05-1,50 grammaa 3,4-dihydroksibentsoehappoa,
- (c) noin 0,75-1,25 grammaa saponiinia,
- (d) noin 4,0-6,0 grammaa laktoosia,
- (e) noin 4,0-6,0 grammaa L-arabinoosia,
- (f) noin 6,0 grammaa typpilähdettä,
- (g) noin 0,75-1,25 grammaa hiivauutetta,
- (h) noin 1,5-4,5 grammaa gram-positiivista estoainetta,
- (i) noin 15-35 millilitraa biologista pH-indikaattoria ja
- (j) tislattua vettä, kunnes tilavuus on 1 litra.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää litraa kohti:

- (a) noin 1 gramman para-kumariinihappoa,
- (b) noin 1 gramman 3,4-dihydroksibentsoehappoa,
- (c) noin 1 gramman saponiinia,
- (d) noin 5 grammaa laktoosia,
- (e) noin 5 grammaa L-arabinoosia
- (f) noin 5 grammaa typpilähdettä,
- (g) noin 1 gramman hiivauutetta,
- (h) noin 3 grammaa gram-positiivista estoainetta,
- (i) noin 25 millilitraa biologista pH-indikaattoria ja
- (j) tislattua vettä, kunnes tilavuus on 1 litra.

10. Koostumus *E. coli*'n selektiiviseksi tunnistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se on pääosin esitetty edellä.

Patentkrav:

1. Komposition för selektivt identifierande av E.coli, k ä n - n e t e c k n a d därav, att den omfattar en källa näringsämnen; en indikator för att påvisa närvaron av E.coli-organismer; och medel för att hämma tillväxten hos andra coliformlikande organismer, vilka normalt ger positiva resultat vid testande av e.coli.
2. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att det hämnade medlet är en kombination av kumarinsyra, 3,4-dihydrobensoesyra, och saponin.
3. Komposition enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a d därav, att det hämmande medlet inkluderar para-kumarinsyra.
4. Komposition enligt patentkravet 1, 2, eller 3, k ä n n e - t e c k n a d därav, att det omfattar ca. 0,05-1,50 g/l 3,4-dihydroxi-bensoesyra och ca. 0,75-1,25 g/l saponin.
5. Komposition enligt något av föregående patentkrav, k ä n - n e t e c k n a d därav, att indikatorn är reducerad Aniline Blue (anilinblått).
6. Komposition enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att indikatorn förändras från färglös till blå då pH-värdet förändras från 7,5 till ca 6.8-7.
7. Komposition enligt något av föregående patentkrav, k ä n - n e t e c k n a d därav, att den inkluderar en kombination av laktos och L-arabinos som näringskällor och vilka jäses av E.coli.
8. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den per liter omfattar:
 - a) ca. 0,05-1,50 g para-kumarinsyra,
 - b) ca. 0,05-1,50 g 3,4-dihydroxibensoesyra,
 - c) ca. 0,75-1,25 g saponin,
 - d) ca. 4,0-6,0 g laktos,
 - e) ca. 4,0-6,0 g L-arabinos,
 - f) från ca. 6,0 g kvävekälla,
 - g) ca. 0,75-1,25 g jästextrakt,
 - h) ca. 1,5-4,5 g positiv inhibitor,
 - i) ca. 15-35 ml biologisk pH-indikator, och
 - j) destillerat vatten till 1 liter.

9. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den per liter omfattar:

- a) ca. 1 g para-kumarinsyra,
- b) ca. 1 g 3,4-dihydroxibensoesyra,
- c) ca. 1 g saponin,
- d) ca. 5 g laktos,
- e) ca. 5 g L-arabinos,
- f) ca. 5 g kvävekälla,
- g) ca. 1 g jästextrakt,
- h) ca. 3 g positiv inhibitor
- i) ca 25 ml biologisk pH-indikator, och
- j) destillerat vatten till 100%.

10. Komposition för selektivt identifierande av E.coli, k ä n - n e t e c k n a d därav, att den väsentligen är såsom här beskrivits.