

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 152383 B



(21) Patentansøgning nr.: 5168/78

(51) Int.Cl.⁴ C 12 Q 1/04

(22) Indleveringsdag: 20 nov 1978

(41) Alm. tilgængelig: 22 maj 1979

(44) Fremlagt: 22 feb 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 21 nov 1977 US 853541 12 jun 1978 US 914414

(71) Ansøger: *PENICILLIN ASSAYS INC.; 33 Harrison Avenue; Boston; Massachusetts 02111, US

(72) Opfinder: Stanley Ely *Charm; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Hurtig, følsom fremgangsmåde til påvisning af antibiotika

(56) Fremdragne publikationer

DK freml. skrift nr. 135965

Andre publikationer. 1) Journal of Bacteriology, vol. 99, no. 2, (aug. 1969), John R. Edwards and James T. Park: "Correlation Between Growth Inhibition and the Binding of Various Penicillins and Cephalosporins to Staphylococcus Aureus.", p. 459-462. 2) Bacteriological Reviews, vol. 38, no. 3, (sep 1974), Peter M. Blumberg and Jack L. Strominger: "Interaction of Penicillin with the Bacterial Cells: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes", p. 291-335. 3) Evr. J. Biochem., vol 72 (1977), Brian G. Spratt: "Properties of the Penicillin-Binding Proteins of Escherichia coli; K 12", p. 341-352.

DK 152383 B

Den foreliggende opfindelse angår en hurtig, følsom fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af antibiotika i væsker såsom mælk, legemsvæsker, kødekstrakter og gæringssubstrater.

5

Muligheden for at påvise små antibiotikakoncentrationer i væsker er vigtig i forskellige situationer. Et eksempel er fødevareindustrien, hvor anvendelsen af antibiotika ved behandlingen af dyr, som frembringer fødevarer, har skabt behov for en hurtig, nøjagtig testfremgangsmåde, som kan anvendes som rutine f.eks. af fødevaregrossister. Da penicilliner anvendes til at behandle mastitis hos malkekvæg, er penicillinpåvisningsfremgangsmåder, som er egnede til hurtigt og nøjagtigt at undersøge mælk, særlig vigtige. Således fører den voksende medicinske bekymring om menneskers indtagelse af små mængder antibiotika til, at man interesserer sig for forekomsten af penicillin i mælk i mængder i området 0,010 - 0,050 I.U./ml eller mere og for simple undersøgelsesmetoder til påvisning af sådanne små mængder penicillin eller andre antibiotika.

20

Der kendes en række fremgangsmåder til påvisning af antibiotika. De fleste af disse involverer mikrobiologiske teknikker, ved hvilke tilstedeværelsen eller fraværelsen af penicillin eller andre antibiotika bestemmes ved at observere inhiberingen af væksten af antibiotikum-følsomme mikroorganismer i tilstedeværelse af den undersøgte prøve. Sådanne procedurer har hidtil krævet inkuberingstider på fire timer eller mere, men ved anvendelsen af mikroorganismestammer, som er "superfølsomme" over for antibiotika, er den nødvendige tid til udførelse af forsøgene reduceret til mellem 2 og 2 1/2 time.

25

30

Andre antibiotikumpåvisningsteknikker udnytter andre karakteristiske egenskaber hos det antibiotikum eller den klasse af antibiotika, som skal påvises, som testgrundlag. Således beskrives i Immobilized Enzyme-Based Flowing-Stream

35

Analyzer for Measurement of Penicillin in Fermentation Broths, J.F. Rusling et al., Analytical Chemistry, bind 48, side 1211, (juli 1976) en test baseret på den enzymatiske hydrolyse af penicillin med et immobiliseret β -lactamasederivat. I Simple Ultrasensitive Test for Detecting Penicillin in Milk, J.M.A. Palmer et al., J. Dairy Science, bind 50, side 1390, 1968, beskrives en fremgangsmåde til påvisning af penicillin på basis af væksten af *Bacillus subtilis*-sporer på sporenæring-farvepapirplader i en lille prøve mælk, som eksponeres for den atmosfæriske luft. Efterhånden som mælkens vandindhold fordamper, forøges penicillinkoncentrationen, hvis der er penicillin til stede, hvorved der i farvestoffet induceres et farveskift, der indikerer koncentrationen. I USA-patentskrift nr. 3.586.483 beskrives en fremgangsmåde til at detektere tetracyclin-antibiotika i væsker ved at absorbere væsken på en absorberende strimmel, som indeholder et complexdannende metal, der danner et fluorescerende metalcomplex med antibiotikumet, og ved observering af metalcomplexets fluorescens under ultraviolet lys.

Den ovenfor beskrevne og andre tilgængelige påvisningsteknikker er meget forskellige med hensyn til deres følsomhed og hastighed. Det formodes, at ingen hidtil tilgængelig test er i stand til at påvise så lidt som 0,01 I.U. penicillin pr. ml (6 ng/ml) på mindre end 1 time. Hvis en sådan test var tilgængelig, ville man på økonomisk vis hurtigt og pålideligt f.eks. kunne bestemme, om mælkeprøver indsamlet i praksis fra relativt små charger indeholder antibiotikumkoncentrationer, som overskrider de officielle normer.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt, hurtig, følsom fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af et antibiotikum i en flydende prøve, især i mælk, legemsvæsker, kødekstrakter og gæringssubstrater, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den omfatter trinnene:

A) Prøven inkuberes sammen med en fast fase omfattende en antibiotikumfølsom mikroorganisme eller en del deraf, som har receptorsteder, der er i stand til at bindes med antibiotikummet, idet inkuberingen udføres under betingelser, som tillader antibiotikum molekylerne, hvis de er til stede i prøven, at bindes til disse receptorsteder,

B) blandingen fra trin A) inkuberes sammen med et mærket stof, der kan være en antibiotikum, et derivat deraf eller en precursor derfor, som er i stand til reversibelt at bindes til de pågældende receptorsteder,

C) den faste fase skilles fra væsken,

D) mængden af mærket stof i den faste fase eller i væsken bestemmes, og

E) bestemmelsen sammenlignes med en standard til opnåelse af en indikation for tilstedeværelsen af antibiotikum i prøven.

Hvis der er antibiotikum molekyler til stede i prøven, så vil de mærkede og umærkede molekyler begge forsøge at binde sig til et begrænset antal receptorsteder på cellerne eller de cellulære underenheder, og den mængde mærket antibiotikum, som bliver immobiliseret, er omvendt proportional med koncentrationen af antibiotikum i testprøven. På lignende måde er den mængde mærket antibiotikum som forbliver i væskefasen, en funktion af den oprindelige antibiotikumkoncentration.

Den særlige fordel ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er, at den er i stand til at påvise meget små antibiotikumkoncentrationer, f.eks. 0,001 I.U./ml penicillin, og kan gøre det hurtigt, f.eks. på mindre end 10 minutter.

Visse udførelsesformer for den foreliggende opfindelse er ideelt egnede til bestemmelse af, om mælk indeholder antibiotika af penicillintypen, og den foreliggende opfindelse vil i det følgende blive beskrevet i detaljer med hensyn til denne anvendelse.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen foretrækkes det at bestemme mængden af mærket stof i den faste fase. Trinne A) og B) udføres hensigtsmæssigt samtidigt.

- 5 Testens overraskende følsomhed og hurtighed formodes at skyldes både den høje bindingskonstant for tiltrækningen mellem antibiotikummolekyler og receptorstederne på cellevæggene eller andre subcellulære strukturer hos den antibiotikumfølsomme organisme og antibiotikummolekylernes
- 10 specificitet for deres virkningssteder på sådanne organismer. F.eks. er bindingskonstanten for penicilliner med receptorsteder på grampositive celler størrelsesordenen større end bindingskonstanten for den immunokemiske antigen-antistof-reaktion, på hvilken analoge detekteringsteknikker (immunobestemmelse) har været baseret.
- 15

- I J.R. Edwards et al., Journal of Bacteriology, august 1969, s. 459 - 462, beskrives binding af penicilliner og cephalosporiner til Staphylococcus aureus, og der påvises en sammenhæng mellem disse antibiotikas evne til at
- 20 inhibere vækst og den hyppighed, hvormed de binder til receptorsteder på cellemembranen og derved forhindrer cellevægsyntesen. De i artiklen beskrevne forsøg er udført med kendte og forinden udvalgte antibiotikakoncentrationer.
- 25

- I modsætning hertil angår den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til påvisning og kvantitativ måling af en ukendt mængde antibiotikum i en flydende prøve, og
- 30 der opnås ved denne fremgangsmåde en forbedring med hensyn til hastighed og følsomhed på mindst en størrelsesorden i forhold til den kendte teknik. Opnåelsen af en sådan forbedring ved måling af en ukendt antibiotikumkoncentration ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
- 35 er ikke nærliggende på grundlag af det i ovennævnte artikel beskrevne.

Ved en vigtig udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, udføres der til opnåelse af en hurtig test, der er egnet til anvendelse til screening af mælk, en enkelt inkubering, i hvilken der medtages den antibiotikumfølsomme mikroorganisme, den prøve, der skal testes, og den mærkede antibiotikumprecursor, og adskillelsestrinnet udføres ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt ved centrifugering. Når det f.eks. drejer sig om påvisning af et β -lactamantibiotikum, omfatter det mærkede stof således ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt en β -lactamdel, og mikroorganismen er ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt en β -lactamantibiotikum-følsom mikroorganisme. Både bestemmelsens hastighed og følsomhed fremmes ifølge opfindelsen ved at anvende cellestammer, der er superfølsomme over for en klasse af antibiotika eller et specifikt antibiotikum, der skal påvises. Til yderligere effektivisering af testen er de foretrukne antibiotikumfølsomme mikroorganismer ifølge opfindelsen stammer, der har en optimal væksttemperatur over ca. 50°C. I dette tilfælde kan inkuberingen udføres ved relativt høje temperaturer, og kinetikken for den organiske antibiotikum-receptorstedreaktion fremmes. Den foretrukne mikroorganiske til udførelse af tests for β -lactamantibiotika er ifølge opfindelsen *Bacillus stearothermophilus* (ATCC nr. 10149 eller 15952). Der kan imidlertid anvendes forskellige andre antibiotikumhøjfølsomme stammer, og der kan, hvis en reduceret følsomhed kan tolereres, simpelt hen anvendes følsomme stammer. Eksempler på egnede cellestammer er f.eks. visse mutanter af *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* og *Streptomyces aureus*.

Ved udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, hvor hurtigheden er mindre vigtig end følsomheden, inkuberes cellekulturen en tid, og det mærkede antibiotikum tilsættes senere. Når der anvendes følsomme mikroorganismer med en høj optimal vækstrate, er det kon-

stateret, at følsomheden ikke forøges lineært med tiden, og at der ikke bør udføres inkuberinger med mere end 15 minutters varighed.

- 5 Ved foretrukne udførelsesformer for den foreliggende opfindelse er det antibiotikum, der skal påvises, et β -lactam-antibiotikum såsom benzylpenicillin, cephalosporin, ampicillin, oxacillin, methicillin, cloxacillin, cephaloridin og cephalothin, og det mærkede antibiotikum, som kan være radioaktivt mærket, er valgt blandt gruppen bestående af 6-aminopenicillansyre og benzylpenicillin. Andre eksempler på antibiotika, der kan påvises, er f.eks. erythromycin, lincomycin, actinomycin, vancomycin, bacitracin eller aminoglycosider såsom streptomycin, gentamycin, kanamycin eller neomycin.
- 10 I tilfælde af at det antibiotikum, der skal påvises, er streptomycin, kan det mærkede stof ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt være tritium-mærket tetrahydrostreptomycin. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse arbejder enestående godt med penicillin eller penicillinlignende antibiotika af den type, som inhiberer cellereproduktionen ved at binde sig til steder på cellemembranen og inhibere cellevægssyntesen. Antibiotika med andre virkningssteder såsom rifamycin og tetracycliner kan imidlertid også påvises. Det mærkede stof kan ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt være mærket med et radioaktivt atom, et enzym, en enzyminhibitor eller et coenzym. Foretrukne mærker er f.eks. et ^{14}C -atom inkorporeret i antibiotikumlekylets struktur, et ^{125}I -atom bundet til antibiotikummet via reaktion med f.eks. tyrosin eller et
- 15 20 25 30 egnet derivat deraf, eller et enzym såsom peroxidase.

- Ved en anden betydningsfuld udførelsesform for den foreliggende opfindelse immobiliseres mikroorganismen eller delene deraf, som indeholder receptorsteder, på en ikke-vandopløselig bærer, f.eks. en vattampon. Ved denne udførelsesform lettes adskillelsestrinnet, da bæreren efter inkuberingen simpelt hen kan fjernes fra væsken og skyl-
- 35

les. Behovet for et apparat, der er i stand til at detektere radioaktive henfaldsprodukter, kan elimineres ved at mærke med et enzym. I dette tilfælde opnås ifølge opfindelsen en indikation for den tilstedeværende enzymmængde ved inkubering med en enzymsubstratopløsning, der er i stand
5 til at undergå et farveskift som svar på den katalytiske virkning af enzymmærket, og den i trin E) anvendte standard omfatter en optisk densitetsværdi bestemt under standardbetingelser, hvorhos værdien svarer til en udvalgt antibiotikumkoncentration. Et foretrukket system omfatter
10 et peoxidasmærke og en substratopløsning, der indeholder H_2O_2 og 4-aminoantipyrin, som skifter farve i nærværelse af peroxidase.

Et andet aspekt af den foreliggende opfindelse er et testsæt til brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen til påvisning af tilstedeværelsen af et antibiotikum i en flydende prøve, hvilket testsæt er ejendommeligt ved, at det omfatter en kombination af

20 A) koncentrationsstabiliserede celler eller celledele fra en antibiotikumfølsom mikroorganisme med receptorsteder, der er i stand til at binde antibiotikummet,

25 B) et mærket antibiotikum, en mærket antibiotikumprecursor eller et mærket derivat deraf, der er i stand til at binde sig til receptorsteder ved inkubering sammen med cellerne eller celledelene, og

30 C) en standard, med hvilken resultater for bestemmelser udført med cellerne og det mærkede materiale kan sammenlignes.

Ved foretrukne udførelsesformer omfatter testsættet frysetørret *Bacillus stearothermophilus*, det mærkede antibiotikum er benzylpenicillin mærket med et radioaktivt atom, f.eks. ^{14}C , og standarden er enten en standardkur-

ve eller mindst én prøve, der indeholder en kendt koncentration af det antibiotikum eller den klasse af antibiotika, der skal påvises.

5 Ved en anden udførelsesform for testsættet ifølge opfindelsen omfatter reagenset A) en ikke-vandopløselig bærer, hvorpå der er immobiliseret celledele fra en antibiotikumsuperfølsom mikroorganisme, og reagens B) omfatter et
10 enzyummærket antibiotikum, hvorhos sættet endvidere omfatter en enzymsubstratopløsning, der er i stand til at undergå en farveændring som svar på enzyummærkets katalytiske påvirkning. Enzyummærket kan være oxidase; substratopløsningen omfatter H_2O_2 , phenol og 4-aminoantipyrin. Ifølge opfindelsen kan reagenset A) fremstilles ud fra
15 Bacillus stearothermophilus, og reagenset B) kan være mærket med tritium, ^{125}I eller ^{14}C . Standarden omfatter ifølge opfindelsen mindst én standard udvalgt blandt gruppen bestående af en standardkurve, mindst én prøve, der indeholder en kendt koncentration af det antibiotikum,
20 som skal påvises, og en mærkeudlæsningsværdi bestemt under standardbetingelser og svarende til en udvalgt antibiotikumkoncentration.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde
25 til detektering af antibiotika, ved hvilken fremgangsmåde der kan detekteres en lang række forskellige antibiotiske medikamenter i en lang række flydende medier, og hvilken fremgangsmåde kan tilpasses til at være meget hurtig og acceptabelt følsom, eller til at være lidt langsommere, men
30 ekstraordinært følsom. Den foreliggende opfindelse angår også en hurtig antibiotikumpåvisningsteknik, som hensigtsmæssigt kan udføres uden for laboratoriet. Et andet aspekt af den foreliggende opfindelse er et testsæt, der er egnet til bestemmelse af tilstedeværelsen af så lidt som et
35 ng/ml antibiotikum i en væskeprøve fra materialer såsom mælk, legemsvæsker, kødrester eller gæringsvæsker. Et andet aspekt er et testsæt, med hvilket der åbnes mulighed for udførelse af fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse uden en centrifuge eller scintillationstæller.

På tegningen viser fig. 1 en skematisk gengivelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, og fig. 2 en standardkurve for benzylpenicillin.

5 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse omfatter fire grundlæggende trin: En inkubering, ved hvilken antibiotikumet (hvis der er noget) i prøven og det mærkede antibiotikum bindes til antibiotikumfølsomme celler eller celleunderenheder, en adskillelse, ved hvilken cellerne med
10 bundet antibiotikum isoleres fra resten af systemet, en bestemmelse, ved hvilken der fås en indikation for mængden af mærket antibiotikum forbundet med enten cellerne eller den fraskilte væske, og en sammenligning, ved hvilken bestemmelsen sammenlignes med en standard. Når koncen-
15 trationen af antibiotikum i testprøven forøges, vil færre mærkede antibiotikummolekyler findes i forbindelse med cellerne (og flere i den fraskilte væske).

Ved at fremstille en serie prøver med kendt antibiotikum-
20 koncentration og behandle dem i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan der frembringes en standardkurve over f.eks. antibiotikumkoncentration mod tællinger pr.minut (i tilfælde af radioaktive mærker). Bestemmelser på ukendte prøver vil give en kvantitativ in-
25 dikation for antibiotikumkoncentrationen, hvis de sammenlignes med en sådan kurve. Den i trin E) anvendte standard er således ifølge opfindelsen hensigtsmæssigt en standardkurve for antibiotikumkoncentrationen mod en kvantitativ indikation for mængden af mærket stof i forbindelse i forbindelse med den faste fase. En indikation for tilstedevæ-
30 relsen af antibiotikum i en prøve kan også opnås ved at sammenligne testprøveresultatet for mærket antibiotikum med resultaterne fra parallelle bestemmelser på prøver med kendte mængder antibiotikum. Hvis der kun søges efter til-
35 stede værelsen af antibiotikum i koncentrationer over et vist maksimum, kan den nødvendige sammenligning udføres indirekte. Dette udføres ved at notere udlæsningen for testprøven og sammenligne med en tidligere foretaget udlæsning, som er korreleret med den kritiske antibiotikumkoncentration. Denne simple sammenligning muliggøres ved

standardisering af reagenser og procedurer. Den tekniker, som udfører testen, foretager da uden videre sammenligningen, når han tolker udlæsningen.

5 Det formodes, at bestemmelsesmetodens gode følsomhed og hurtighed skyldes de typisk høje bindingskonstanter for reaktionerne mellem antibiotika og celler og antibiotika-
10 enesspecificitet for deres virkningssteder. Således kan ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse endog
ekstremt små mængder antibiotikum i en testprøve hurtigt bindes til receptorsteder på cellemembranen eller en anden
lokalitet på den mikroorganisme, sammen med hvilken anti-
biotikummet inkuberes. I denne henseende er det kendt, at
15 mange antibiotika fungerer ved at binde sig til visse cel-
lelokaliteter, hvorved de forhindrer normal reproduktiv
metabolisme. F.eks. er det kendt, at vancomycin, baci-
tracin, penicilliner og cephalosporiner inhiberer celle-
reproduktionen ved at binde sig til receptorsteder på
cellemembranen og derved forhindre cellevægssyntesen. Se
20 f.eks. Correlation between Growth Inhibition and the
Binding of Various Penicillins and Cephalosporins to
Staphylococcus aureus, J.R. Edwards et al., Journal of
Bacteriology, August 1969, side 459-462, og The Actions
of Penicillin and Other Antibiotics on Bacterial Cell Wall
25 Synthesis, J.L. Strominger, Hopkins Med. J., V. 133,
side 63 (1973). Andre antibiotika har virkningssteder, der
er noget mindre tilgængelige end cellemembranen, men ikke
desto mindre virker de ved at binde sig til specifikke
cellelokaliteter såsom ribosomer eller nucleinsyrer. Frem-
30 gangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan derfor
ud over β -lactamantibiotika og andre ovenfor nævnte anti-
biotika anvendes til at påvise erythromycin, lincomycin,
actinomycin og tetracyclin samt aminoglycosider såsom
streptomycin eller neomycin. De sidstnævnte stoffer har
35 forskellige virkningssteder i cellerne, f.eks. ribosomer.

Hvis mærkede antibiotika tilsættes ved inkuberingen af prøven, så vil mærkede og umærkede molekyler konkurrere om de tilgængelige receptorsteder, idet de relative mængder af mærkede og umærkede antibiotikumolekyler, der bin-
des til receptorstederne, afhænger af antibiotikumkoncen-

trationen i prøven. Hvis de mærkede molekyler er tilsat, efter at prøven er inkuberet sammen med cellerne i en periode, så vil de mærkede antibiotikum-molekyler binde sig til de resterende receptorsteder. I hvert tilfælde
5 fås, da der ved detektering af tilstedeværelsen af mærkede molekyler immobiliseret på cellerne kan opnås et mål for graden af bindingen af mærket antibiotikum, et indirekte mål for bindingen af umærkede molekyler, da mængden af mærket antibiotikum på cellerne er en funktion af mængden af antibiotikum, der er til stede i
10 prøven.

Sagt på en anden måde beror fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse på, at mærkede antibiotikum-molekyler og
15 antibiotikum, der kan være til stede i prøven, søger af reagerer med et endeligt antal receptorsteder hos cellerne, enten samtidigt eller efter hinanden. Der kan således ifølge opfindelsen opnås en vellykket test, når det antibiotikum, der skal påvises, og det mærkede stof er samme antibiotikum. Der
20 kan imidlertid ved inkuberingen anvendes en hvilken som helst egnet mærket repræsentant for den klasse af antibiotika eller beslægtede molekyler såsom antibiotikumprecursorer eller -derivater, der binder sig til samme gruppe receptorsteder som det antibiotikum, der skal påvises. F.eks. kan et hvilket
25 som helst specifikt penicillin- eller cephalosporinantibiotikum, hensigtsmæssigt mærket, anvendes til at detektere den samme penicillin eller cephalosporin, en hvilken som helst anden penicillin eller cephalosporin eller en blanding af penicilliner eller cephalosporiner. Foretrukne
30 antibiotika anvendt til mærkning er imidlertid sådanne repræsentanter for en given klasse, som har en høj bindingskonstant såsom benzylpenicillin (penicillin G), ampicillin eller cephalosporin inden for klassen af β -lactam-antibiotika. Et eksempel på en antibiotikumprecursor inden for denne klasse er 6-aminopenicillansyre; et eksempel
35 på et derivat er reaktionsproduktet af 6-aminopenicillansyre og tyrosin. Udtrykket "mærket antibiotikum" eller "mærket stof" betegner her mærkede antibiotika, mærkede

antibiotikumprecursorer og mærkede antibiotikumderivater samt andre beslægtede stoffer, der har en affinitet for virkningsstederne for de antibiotika, med hvilke de er beslægtet, eller af hvilke de er afledt.

5

Med hensyn til arten af mærkningen findes der inden for den kendte teknik adskillige typer af tilgængelige mærker. Således kan det mærkede antibiotikum indeholde ^{14}C eller ^{125}I eller et andet radioaktivt atom, der f.eks. kan detekteres med en tæller, eller et hvilket som helst enzym, en hvilken som helst enzyminhibitor, f.eks. methotrexat, eller et hvilket som helst coenzym, f.eks. NAD (nicotinamide-nin-dinucleotid), som kan detekteres ved at påvirke det mærkede antibiotikum med en substratopløsning, som undergår en 10 detekterbar kemisk reaktion under katalytisk indflydelse af mærket, eller i hvilken en reaktion inhiberes. Der er opnået fremragende resultater under anvendelse af radioaktivt mærkede antibiotika, f.eks. ^{14}C -mærket benzylpenicillin (penicillin G), som nu er kommercielt tilgængeligt. Det er for fagmanden klart, at der i de fleste 20 tilfælde må syntetiseres et derivat af antibiotikummolekylet for at tilvejebringe et sted, hvor et radioaktivt iodatom kan tilknyttes. Enzymmærker er også blevet anvendt med held, og cozymer såsom dehydrogenasecozymer kan anvendes. Tilstedeværelsen af enzymmærket påvises 25 på i og for sig kendt måde under anvendelse af en enzymsubstratopløsning, som f.eks. skifter farve, når den udsættes for enzymet. Den kvantitative bestemmelse af coenzymet udføres ved at behandle de fraskilte celler (eller 30 den tilbageværende væske) med en opløsning, der indeholder et substrat, som skifter farve, når det påvirkes af et enzymsystem, i hvilket coenzymet indgår som kritisk komponent. De andre enzymer i systemet indgår i opløsningen.

35

Generelt kan de celler, som kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, være en hvilken som helst celle, der er følsom over for det antibiotikum, som

skal påvises. Således kan f.eks. en hvilken som helst mikroorganisme, der inhiberes med penicillin, anvendes til at påvise antibiotika af penicillintype. Det foretrækkes imidlertid for at forbedre følsomheden at anvende en mikroorganisme, der er "superfølsom" over for det antibiotikum, der skal påvises. I de seneste år er mange stammer af celler, der er superfølsomme over for enten specifikke antibiotika eller klasser af antibiotika blevet tilgængelige. Eksempler på β -lactamfølsomme mikroorganismer er f.eks. *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* samt visse mutanter af *Escherichia coli*. De mest gunstige resultater med hensyn til hurtighed og følsomhed er opnået under anvendelse af superfølsomme mikroorganismestammer med en optimal væksttemperatur, der generelt ligger over ca. 50°C. Den foretrukne mikroorganisme er i denne henseende *Bacillus stearothermophilus* (ATCC nr. 10149). *Bacillus stearothermophilus* ATCC nr. 15952 kan også anvendes. Da inkuberingerne kan udføres ved høj temperatur med denne type mikroorganisme, forøges antibiotikumbindingshastigheden.

Det skal bemærkes, at der ikke nødvendigvis behøver anvendes hele celler ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. Således kan de celleunderenheder, på hvilke de pågældende receptorsteder er placeret, f.eks. cellevægge eller -membraner, ribosomer eller bundne enzymer, anvendes i steder for hele celler. F.eks. er det kendt, at penicillin G bindes til og inhiberer virkningen af D-alanincarboxypeptidase, som normalt er immobiliseret på cellemembraner. Der findes imidlertid nu fremgangsmåder til isolering af sådanne enzymer, og disse kan anvendes i stedet for hele celler (se Purification and Characterization of Thermophilic D-Alanine Carboxypeptidase from Membranes of *B. stearothermophilus*, R. Rogers et al., J. Biol. Chem. V. 249, side 4863 - 4876). Selv om adskillelsen af sådanne underenheder fra

- resten af reaktionsblandingen kan være vanskelig at udføre hurtigt, medmindre underenhederne, som det beskrives her, immobiliseres på et uopløseligt fast stof, vil det være klart for fagmanden, at anvendelsen af sådanne materialer er ækvivalent til anvendelsen af hele celler. Udtrykket "celledele" betegner således her hele celler samt cellulære underenheder såsom cellemembraner eller andre strukturer, der indeholder receptorsteder.
- 10 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan også udføres under anvendelse af receptorsted-holdige celledele, der er immobiliseret på egnet bærer såsom en vattampom, collagenmatrix, en fordybning i et polystyrenlegeme eller polystyrenperler, polyacrylamidgel eller en lille mængde af en formfast næringsagar anbragt på en duppe-stav. På denne måde kan adskillelsen af cellerne fra væskebestanddelene i reaktionsblandingen udføres meget simpelt og hurtigt. Når der anvendes hele celler, er en foretrukken adskillellesmetode centrifugering. Der kan imidlertid anvendes andre fremgangsmåder til at adskille cellerne fra resten af reaktionsblandingen, f.eks. ultrafiltrering.
- 20 Af det ovenstående er det klart, at testen ifølge den foreliggende opfindelse kan tilpasses til at påvise tilstedeværelsen af en række antibiotika eller blandinger deraf i et antal forskellige flydende medier.
- 25 En række mærkede antibiotika eller celler eller celleder underenheder kan anvendes, og der kan udføres enten en kvalitativ eller kvantitativ test. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse belyses nærmere ved følgende eksempler, af hvilke de første beskriver en metode egnet til hurtig undersøgelse af mælkeprøver for tilstedeværelsen af så lidt som 0,001 I.U. penicillin pr. ml.
- 30
- 35

Eksempel 1.

Bacillus stearothermophilus dyrkes som følger:

5 Medium:

	Opløsning A - Difco gærekstrakt	2,58	kg
	Difco bactotrypton	2,58	kg
	dibasisk natriumphosphat	1,54	kg
	monobasisk kaliumphosphat	515	g
10	ammoniumsulfat	515	g
	destilleret vand	515	liter

	Opløsning B - Vandfrit magnesiumsulfat	103	g
	Destilleret vand	1,29	liter

15

	Opløsning C - Calciumchloriddihydrat	12,9	g
	manganchlorid	0,52	g
	destilleret vand	1,29	liter

20

	Opløsning D - glucose	2,58	kg
	destilleret vand	12,9	liter

Betingelser: 60°C, beluftning, 10% inoculum.

Væksttid: 2,5 timer.

25

Fremgangsmåde:

30 Opløsning A steriliseres i fermentoren. Opløsning B steriliseres separat, og 2,5 ml tilsættes pr. liter opløsning A. Den endelige koncentration af magnesiumsulfat i mediet er 0,2 g/liter. Opløsning C steriliseres separat, og der tilsættes 2,5 ml pr. liter opløsning A. Den endelige koncentration i mediet er:

35

Calciumchloriddihydrat	0,025 g/liter
manganchlorid	0,001 g/liter.

Opløsning D steriliseres separat, og der tilsættes 25 ml for hver liter af opløsning A. Den endelige koncentration af glucose i mediet er 5 g/liter.

- 5 Temperaturen af opløsning A i fermentoren bør ligge mellem 60 og 65°C. Opløsningerne B, C og D tilsættes under kraftig omrøring i fermentoren. En langsom tilsætning af opløsning C og kraftig omrøring er nødvendig for at forhindre dannelsen af et bundfald. Det færdige medium har en pH-værdi på 6,9 uden indstilling. Der
- 10 tilsættes "Dow Corning B antifoam" til en koncentration på 0,1%. Der kræves en meget kraftig beluftning til dyrkning af organismen.
- 15 Når fermentationen er begyndt, podes en 6-liters glasballon med fuldstændigt medium med indholdet af 2 l-liters Ehrlenmeyerkolber, der hver indeholder 150 ml af en kultur, der er dyrket natten over. Når der er opnået en værdi for den optiske densitet på 0,150 (600 m_μ) anvendes
- 20 hele glasballonens indhold til podning af 60 liters fermentoren. Når faststofindholdet er 0,03%, anvendes 60 liters fermentoren til podning af 530 liters fermentoren.
- 25 Cellerne vaskes to gange med fem rumfang 0,2M ammoniumchlorid, pH-værdi 7,0, derpå to gange med 10 rumfang af en puffer, der indeholder 0,01M magnesiumacetat, 0,01M mercaptoethanol og 0,02M tris-HCl-puffer, pH-værdi 7,8.
- 30 Cellerne centrifugeres derpå og suspenderes efter dekantering af supernatanten i en blanding af de ovennævnte opløsninger A, B og C og fordeles i ampuller. Indholdet i hver ampul kan frysetørres på i og for sig kendt måde og lagres ved ca. 4°C i lang tid. Frysetørring i vækstmedium (minus glucoseopløsningen) bevarer cellernes maksi-
- 35 male aktivitet med hensyn til binding af antibiotikum. Sådanne frysetørrede celler udgør en ideel koncentrationsstabiliseret kilde for celler til anvendelse i testsæt.

Det anvendte mærkede antibiotikum er benzylpenicillin, der indeholder et ^{14}C -atom (150 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$), leveret af Amersham Searle Co. Dette reagens kan også frysetørres af hensyn til stabiliteten.

5

Til opnåelse af kvantitative resultater og som kontrol kan der parallelt testes to eller flere flydende prøver, hvoraf én vides at være antibiotikumfri, og den anden indeholder en kendt mængde af den antibiotikum, der skal påvises, f.eks. 0,01 enhed penicillin pr. ml. Disse prøver kan også frysetørres af hensyn til stabiliteten. Et hvilket som helst af de ovenfor nævnte reagenser kan rekonstitueres med destilleret vand eller phosphatpuffer med svagt sur pH-værdi. For penicilliner sker bindingen optimalt mellem pH-værdi 6,0 og 7,0. De stabiliserede celler, det mærkede antibiotikum og kontrollerne (eller standardkurven) udgør et testsæt der er egnet til udførelse af bestemmelserne i henhold til den foreliggende opfindelse.

De ovennævnte reagenser anvendes til at fremstille en standardkurve og til at teste ukendte prøver for tilstedeværelsen af penicillin. En standardkurve fremstilles ved at underkaste 12 mælkeprøver på hver 1,0 ml indeholdende kendte koncentrationer af benzylpenicillin (penicillin G) en inkubation med 1) en 100 ml's prøve af en *B. stearothermophilus*-suspension (rekonstitueret fra frysetørret materiale ved tilsætning af 2,5 ml destilleret vand til en ampul fremstillet som angivet ovenfor) og 2) ^{14}C -mærket benzylpenicillin (penicillin G) i tilstrækkelig mængde til at give ca. 10.000 tællinger/minut. Inkubationen udføres i 3 minutter i en tørbadsinkubator ved 90°C . Cellerne skilles derpå fra ved centrifugering ved 3.000 g i 2 minutter. Supernatanten kasseres, og glasset skylles med phosphatpuffer uden at forstyrre cellerne. Cellerne overføres derpå fra glasset til en scintillationsampul under anvendelse af scintillationsvæske som skyllevæske. Hvis der anvendes et ^{125}I -mærke, kan det sidste trin udelades, og de mærkede molekyler påvises direkte. Resultaterne er anført i nedenstående tabel I.

Tabel I.

Standardkurve til påvisning af benzylpenicillin.

5	Prøve nr.	Benzylpenicillin ng/ml	Tællinger/10 minutter	Baggrunds-korrigerede tællinger/10 minutter	Gennemsnit tællinger/10 minutter	C/C ₀ **
	1	*	331	84	102	0.007
	2	*	367	120		
10	3	0	15457	15210	15272,5	1,000
	4	0	15582	15335		
	5	1,0	13165	12918	13019,5	0,853
	6	1,0	13368	13121		
	7	5,0	9859	9612	10002,0	0,655
	8	5,0	10639	10392		
15	9	10	7615	7368	7699	0,504
	10	10	8277	8030		
	11	50	4175	3920	4071	0,267
	12	50	4461	4214		

20

* 20.000 enheder benzylpenicillin (penicillin G) sat til prøven.

** Tællinger for prøve/tællinger for kontrol (intet penicillin G til stede i prøve).

25

Som det fremgår af ovenstående tabel, sker der et signifikant og drastisk fald i tællingerne, når mængden af benzylpenicillin i prøverne forøges fra 0 (3,4) til 10 ng/ml (9, 10). Dataene i tabel I er vist grafisk i fig. 2, hvori penicillinkoncentrationen i ng/ml er afbildet som funktion af prøvetælling/nultælling.

30

35

Under anvendelse af den ovenstående tabel som sammenligningsstandard udføres tests på 20 mælkeprøver fremstillet i et kommercielt mælkebehandlingsanlæg. Den anvendte fremgangsmåde er identisk med den ovenfor beskrevne fremgangsmåde til fremstilling af standardkurven bortset fra, at man yderligere sammenligner tællinger/

minut målt med testprøverne med kurven og omsætter ng/ml penicillin til I.U./ml (0,01 I.U. $\approx$ 6 ng). Resultaterne af disse tests er anført i nedenstående tabel II:

5

Tabel II.

Sammenligning af følsomheden af mikrobiologisk teknik og teknikken ifølge den foreliggende opfindelse.

10

	Prøve nr.	Kendt penicil- linkoncentration IU/ml	Forsøgsresultater med mikrobiologisk teknik (IU/ml)	Testresul- tater (pr. ml) IU ifølge opfindelsen
	1	0,005	-	0,007
15	2	0,005	-	0,009
	3	0,003	-	0,008
	4	0,002	-	0,003
	5	0,000	-	0,002
	6	0,007	-	0,006
	7	0,000	-	0,001
	8	0,042	0,1	0,005
20	9	0,003	-	0,004
	10	0,030	0,06	0,07
	11	0,020	0,04	0,05
	12	0,020	0,03	0,04
	13	0,025	0,02	0,03
	14	0,037	0,05	0,06
	15	0,007	-	0,01
	16	0,017	0,01	0,02
25	17	0,043	0,09	0,10
	18	0,022	0,08	0,09
	19	0,030	0,07	0,08
	20	0,000	-	0,001

30

Det skal bemærkes, at de ovenfor beskrevne tests pålideligt påviser tilstedeværelsen af så lidt som 0,01 I.U. penicillin pr. ml. på ca. 6 minutters testtid (tælletid ikke medregnet).

35

Det skal også bemærkes, at den ovenfor beskrevne fremgangsmåde omfattede samtidig inkubering af både prøven og mærket penicillin i kun 3 minutter og 2 minutters centrifugering. Denne test er specifikt tilpasset til acceptabel følsomhed og så hurtig udførelse som muligt.

En anden testgruppe udføres for at påvise den følsomhed, der kan opnås under anvendelse af *Bacillus stearothermophilus*, mærket benzylpenicillin (1500 counts pr. minut) og 3 minutters inkubering i en tørbadsinkubator ved 90°C. Resultaterne for denne serie tests er anført i nedenstående tabel III. De i tabel III anførte data illustrerer, at der sker en signifikant reduktion i tællinger/minut for den fraskilte cellefraktion, når antibiotikumkoncentrationen i prøven forøges fra 0 til 0,001 I.U. pr. ml, 0,002 I.U. pr. ml og 0,005 I.U. pr. ml. Disse tests kan, indbefattet tælletrinnet, udføres på mindre end 10 minutter.

Tabel III

Prøve nr.	I.U. penicillin g pr. ml i prøve	Tællinger/minut for celler	Gennemsnit tællinger/minut
1	0	365	338
2	0	311	
3	0,001	207	217
4	0,001	227	
5	0,002	191	183,5
6	0,002	176	
7	0,005	97	100
8	0,005	103	
9	0,010	89	100,5
10	0,010	112	
11	-	27	

Eksempel 2.

Bacillus stearothermophilus dyrkes i overensstemmelse med den i eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde. Den resulterende celleduspension lydbehandles derpå for at lysere cellerne, fortrinsvis medens prøven er neddyppet i et isbad. Ikke-lyserede celler fjernes ved centrifugering af den lydbehandlede suspension ved 2500 g i 5 minutter. Cellemembranerne, der indeholder penicillinbindende steder, isoleres ved centrifugering i 10 minutter ved 5000 g.

100 vattamponer (vatstykker 6,5 g) sættes derpå
til 100 ml 30 g/liter CNBr-opløsning indstillet til
pH-værdi 11,0 med 5M natriumhydroxid. Efter 10 minut-
ter fjernes tamponerne, vaskes med natriumhydrogen-
5 carbonatopløsning og sættes til de cellemembraner, der
er frembragt på den ovenfor beskrevne måde, suspen-
deret i en natriumhydrogencarbonatopløsning, pH-værdi
8,1. Efter omrøring i 18 timer ved 4°C bliver cellemembra-
nerne bundet covalent til tamponerne via cyanogenbro-
10 midet. Tamponerne skylles derpå med destilleret vand,
gennemvædes med ethanolamin i 2 timer, skylles atter og
tørres.

Et konjugat af penicillansyre og peroxidase fremstilles
15 som følger. En alkalisk opløsning (pH-værdi 9,0), der
indeholder 28,1 mg 6-aminopenicillansyre, blandes med
en phosphatpufret peroxidaseopløsning, der indeholder
8,8 mg peroxidase og 8,2 mg carbodiimid i vand. Reak-
tionsblandingen holdes ved 4°C i 24 timer under omrø-
20 ring. Som resultat bindes peroxidasen og 6-aminopenicillan-
syren covalent. Konjugatopløsningen dialyseres derpå mod
0,05M phosphatpufret saltopløsning (PBS); penicillinak-
tiviteten forsvinder fra den phosphatpufrede saltopløs-
ning efter første opløsningskift. Efter fire opløsning-
25 skift er penicillan-peroxidase-konjugatet klar til an-
vendelse.

Bestemmelsen udføres under anvendelse af de på den oven-
for beskrevne måde fremstillede reagenser ved at sætte
30 en bomuldstampon til de respektive testprøver (eller kon-
troller) sammen med 100 µliter konjugatopløsning. Reak-
tionsblandingen inkuberes i en tørbadsinkubator i 3 minut-
ter ved 50°C. I denne periode konkurrerer penicillinen
i prøven (hvis der er penicillin til stede) og den
35 peroxidase-mærkede penicillansyre om bindingssteder på
cellemembranerne, der er bundet til tamponerne. Prøven
hældes derpå ud af glasset, tamponen skylles med vand til

fjernelse af ubundet konjugat, og 1 ml substratopløsning sættes til glassene. Substratopløsningen består af 1,0 ml 0,3%'s hydrogenperoxid, 25 mg 4-aminoantipyrin og 20 ml phenol opløst i 50 ml destilleret vand.

5

Tamponen plus substrat inkuberes derpå ved 25°C. Hvis der var mindre end 0,05 enheder penicillin til stede i prøven, bliver tilstrækkeligt meget konjugat immobiliseret på tamponen til ved peroxidasevirkningen at frembringe en visuelt erkendelig lyserød til rød farve på ca. 15 minutter. Hvis der ikke udvikles nogen farve efter 15 minutter, så indeholdt prøven mere end 0,05 enheder penicillin pr. ml.

15 For at få mere præcise resultater kan substratets optiske densitet måles ved 510 milli μ på et spektrofotometer. Resultaterne for nogle tests er anført nedenfor:

20	Penicillinkoncentration	Optisk densitet (510milli μ)
	1) 0,05 enheder	0,75
		0,78
	0,00 enheder	1,10
		1,05
	2) 0,05 enheder	0,70
		0,77
25	0,00 enheder	1,05
		1,00

Gennemsnitlig optisk densitet ved 0,05 enheder penicillin/ml - 0,75.

30 Gennemsnitlig optisk densitet ved 0,00 enheder penicillin/ml - 1,05.

Eksempel 3

35

En anden gruppe tests udføres for at påvise den hastighed og følsomhed, med hvilken streptomycin kan påvises. Seks prøver i hver 5 ml mælk blandes med streptomycin

til fremstilling af prøver, der indeholder 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml og 10^6 ng/ml. Hver prøve blandes med tritiummærket dihydrostreptomycin med 228.000 tællinger/minut (kommercielt tilgængeligt, f.eks. fra Amersham Searle Co.) og med B. stearothermophilus-suspension fremstillet som beskrevet ovenfor i eksempel 1 og rekonstitueret ud fra 0,2 ml frysetørret materiale fortyndet med 8 ml vand. (En egnet koncentration af materialet før frysetørring opnås ved at resuspendere de ved centrifugering som beskrevet i eksempel 1 fraskilte celler til en koncentration, så at en 1:500 fortynding har en optisk densitet (O.D.) på 0,60 ved en bølgelængde på 600 millu/u.) Blandingerne opvarmes for at lette bindingen af det tritiummærkede dihydroxy-

streptomycin til dets bindingssted i cellerne. I dette eksempel opvarmes prøverne, der oprindeligt er ved 10 - 20°C, derfor til 90°C i en tørblokvarmer i 3 minutter, så at temperaturen i prøverne når 60 - 65°C. Prøverne centrifugeres derpå i 3 minutter ved 3000 g, supernatanterne dekanteres, og hvert bundfald vaskes to gange med destilleret vand. Bundfaldene (cellerne) overføres derpå med scintillationsvæske til scintillationstælleglas, og tællingerne bestemmes i et minut. Resultaterne for disse tests er anført i nedenstående tabel IV.

Tabel IV.

Prøve nr.	Streptomycin-koncentration (pr. ml)	Tællinger (cpm)	Tællinger/kontrolltællinger (%)
1	0	30.441	100
2	1 ng	25.849	84,9
3	10 ng	22.644	74,5
4	100 ng	18.123	59,6
5	1000 ng	14.189	48,7
6	10^6 ng	8.707	28,6

Det fremgår af den ovenstående tabel, at der sker en signifikant reduktion i tællingerne, når mængden af streptomycin i prøven forøges fra 0 (prøve 1) til 1, 10 og 100 ng/ml og mere. Tilstedeværelsen af streptomycin i prøver, der indeholder så lidt som 1 ng/ml, kan derfor påvises ved at behandle prøven i overensstemmelse med den ovenfor beskrevne fremgangsmåde og sammenligne tællingen med tabellens data. Sådanne bestemmelser kan udføres på ca. 8 minutter.

10 Af det ovenstående vil det være klart for fagmanden, at det er muligt at påvise endog mindre antibiotikumkoncentrationer, f.eks. ved at inkubere prøven sammen med de antibiotikumfølsomme celler i tilstrækkelig tid til at tillade alt det antibiotikum, der er til stede i 15 prøven, at bindes til receptorsteder. Det mærkede antibiotikum tilsættes bagefter og vil bindes til de tilbageværende receptorsteder. Bortset fra disse modifikationer vil fremgangsmåden i det væsentlige 20 være identisk med den ovenfor beskrevne og vil resultere i en lidt langsommere, men endnu mere følsom test.

PATENTKRAV

25 1. Hurtig, følsom fremgangsmåde til påvisning af tilstedeværelsen af et antibiotikum i en flydende prøve, især i mælk, legemsvæsker, kødekstrakter og gæringssubstrater, 30 k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter trinnene:

35 A) Prøven inkuberes sammen med en fast fase omfattende en antibiotikumfølsom mikroorganisme eller en del deraf, som har receptorsteder, der er i stand til at bindes med antibiotikummet, idet inkuberingen udføres under betingelser, som tillader antibiotikummolekylerne, hvis de er til stede i prøven, at bindes til disse receptorsteder,

B) blandingen fra trin A) inkuberes sammen med et mærket stof, der kan være et antibiotikum, et derivat deraf eller en precursor derfor, som er i stand til reversibelt at bindes til de pågældende receptorsteder,

5

C) den faste fase skilles fra væsken,

D) mængden af mærket stof i den faste fase eller i væsken bestemmes, og

10

E) bestemmelsen sammenlignes med en standard til opnåelse af en indikation for tilstedeværelsen af antibiotikum i prøven.

15

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

k e n d e t e g n e t ved, at mængden af mærket stof i den faste fase bestemmes.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

20

k e n d e t e g n e t ved, at trinnene A) og B) udføres samtidigt.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

25

k e n d e t e g n e t ved, at mærket på det mærkede stof er et radioaktivt atom, et enzym eller et coenzym.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

30

k e n d e t e g n e t ved, at det antibiotikum, der skal påvises, er et β -lactamantibiotikum, det mærkede stof omfatter en β -lactamdel, og mikroorganismen er en β -lactamantibiotikum-følsom mikroorganisme.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1,

35

k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen er *Bacillus stearothermophilus*.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at den antibiotikumfølsomme mikroorganisme er superfølsom over for det antibiotikum, der skal påvises.
- 5
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at den antibiotikumfølsomme mikroorganisme er en stamme med en optimal væksttemperatur over ca. 50°C.
- 10
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at adskillelsestrinnet udføres ved centrifugering.
- 15
10. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen eller delene deraf immobiliseres på en ikke-vandopløselig bærer, og adskillelsestrinnet udføres ved at fjerne bæreren fra væsken og skylle den.
- 20
11. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det antibiotikum, der skal påvises, og det mærkede antibiotikum er det samme.
- 25
12. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det antibiotikum, der skal påvises, er udvalgt blandt gruppen bestående af benzylpenicillin, cloxacillin, cephalosporin, ampicillin, oxacillin, methicillin, cephalosporidin og cephalothin, og det mærkede antibiotikum er et radioaktivt mærket stof udvalgt blandt
- 30
- gruppen bestående af 6-aminopenicillansyre og benzylpenicillin.
- 35
13. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det antibiotikum, der skal påvises, er streptomycin, og det mærkede stof er tritium-mærket tetrahydrostreptomycin.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at den i trin E) anvendte
standard er en standardkurve for antibiotikumkoncentra-
tionen mod en kvantitativ indikation for mængden af
5 mærket stof i forbindelse med den faste fase.

15. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes et enzym-
mærke, der opnås en indikation for den tilstedeværende
10 enzyemmængde ved inkubering med en enzymsubstratopløs-
ning, der er i stand til at undergå et farveskift som
svar på den katalytiske virkning af enzymmærket, og
den i trin E) anvendte standard omfatter en optisk
densitetsværdi bestemt under standardbetingelser,
15 hvorhos værdien svarer til en udvalgt antibiotikum-
koncentration.

16. Testsæt til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 1
til påvisning af tilstedeværelsen af et antibiotikum
20 i en flydende prøve,
k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter en kombi-
nation af

A) koncentrationsstabiliserede celler eller celledele
25 fra en antibiotikumfølsom mikroorganisme med receptor-
steder, der er i stand til at binde antibiotikummet,

B) et mærket antibiotikum, en mærket antibiotikumpre-
cursor eller et mærket derivat deraf, der er i stand
30 til at binde sig til receptorstedet ved inkubering sam-
men med cellerne eller celledelene, og

C) en standard, med hvilken resultater for bestemmelser ud-
ført med cellerne og det mærkede materiale kan sammen-
35 lignes.

17. Testsæt ifølge krav 16,
k e n d e t e g n e t ved, at reagenset A) omfatter
en ikke-vandopløselig bærer, hvorpå der er immobiliseret

celledele fra en antibiotikumsuperfølsom mikroorganisme, og reagens B) omfatter et enzym-mærket antibiotikum, hvorhos sættet endvidere omfatter en enzymsubstratopløsning, der er i stand til at undergå en farve-
5 ændring som svar på enzymmærkets katalytiske påvirkning.

18. Testsæt ifølge krav 16,
k e n d e t e g n e t ved, at reagenset A) er frem-
10 stillet ud fra Bacillus stearothermophilus.

19. Testsæt ifølge krav 16,
k e n d e t e g n e t ved, at reagens B) er mærket med
tritium, ^{125}I eller ^{14}C .

15 20. Testsæt ifølge krav 16,
k e n d e t e g n e t ved, at standarden omfatter mindst
én standard udvalgt blandt gruppen bestående af en
standardkurve, mindst én prøve, der indeholder en
kendt koncentration af det antibiotikum som skal på-
20 vises, og en mærkeudlæsningsværdi bestemt under
standardtestbetingelser og svarende til en udvalgt
antibiotikumkoncentration.

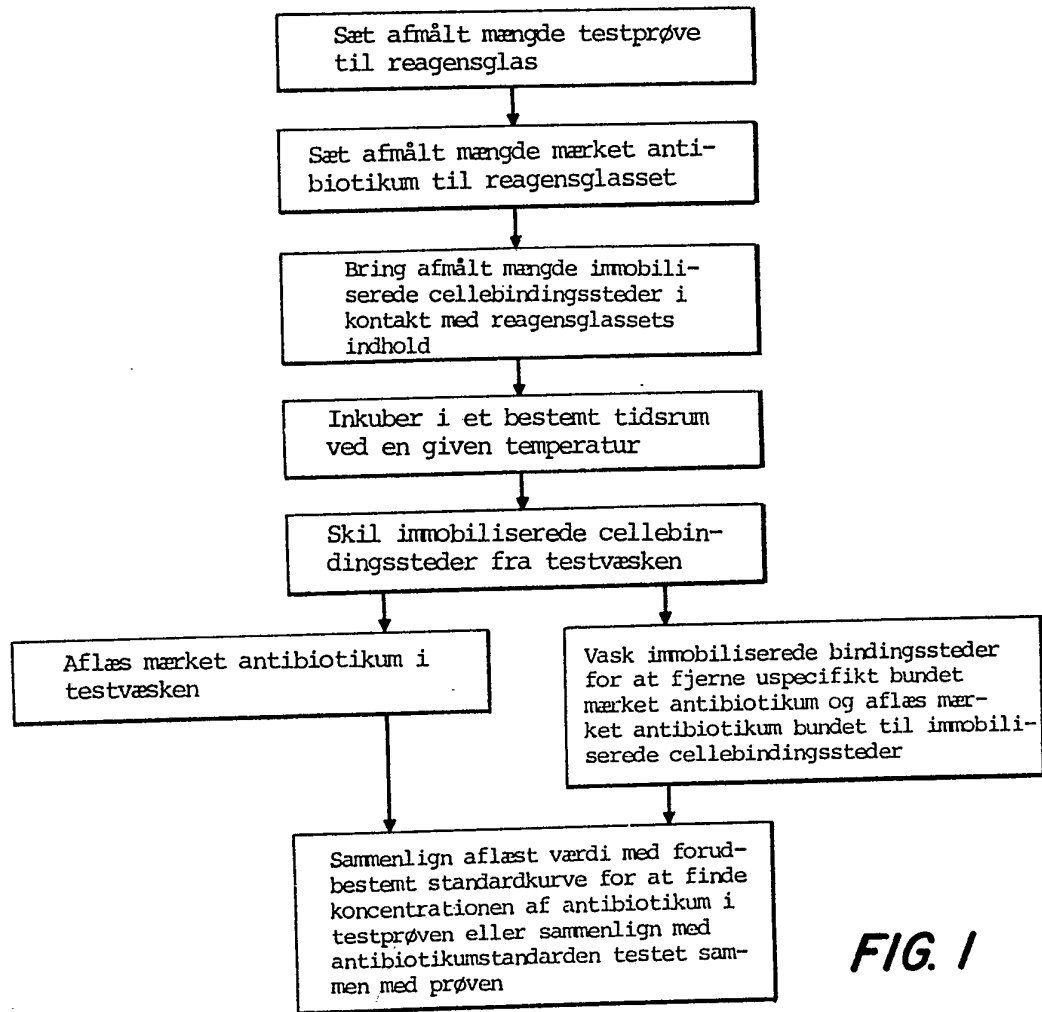


FIG. 1

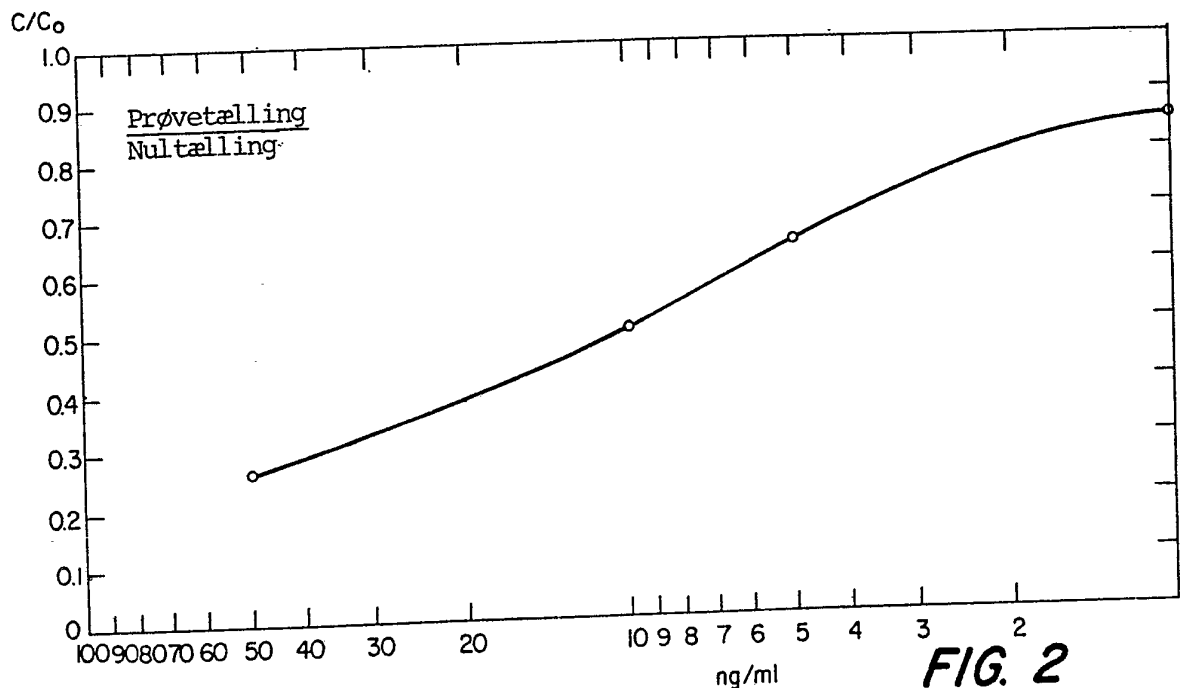


FIG. 2

KONCENTRATION AF PENICILLIN ng/ml