



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **94-01646**

(22) Data de depozit: **09.02.1994**

(30) Prioritate: **11.02.1993 EP 93200387.4;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.06.1999 BOPI nr. **6/1999**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **EP 94 / 00359 09.02.1994**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO /9418343 18.08.1994**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP - A - 0005891

(71) Solicitant: **GIST-BROCADES N.V., DELFT, NL;**

(73) Titular: **GIST-BROCADES N.V., DELFT, NL;**

(72) Inventatori: **VAN RIJN FERDINAND THEODORUS, DELFT, NL; BEUKERS ROBERT, NOOTDORP, NL;
KERKHOF JOHANNES H.P.M., ROZENBURG, NL;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI**

(54) **METODĂ PENTRU DETECTAREA DE COMPUȘI
ANTIBACTERIENI ÎNTR-O PROBĂ TEST**

(57) **Rezumat:** Metoda conform invenției constă în aceea că proba de testat este introdusă într-un mediu de agar care este tamponat și conține cel puțin doi indicatori redox, ce dau o schimbare de culoare în partea vizibilă a spectrului și, eventual, o sursă nutritivă și o substanță care schimbă sensibilitatea organismului de testat față de compușii antibacterieni. Organismul de testat

este o tulpină de *Bacillus* cum ar fi *Bacillus stearothermophilus* sau o tulpină de *Streptococcus* cum ar fi *Streptococcus thermophilus*, într-o concentrație de 10^5 - 10^9 U.F.C./ml mediu agar. Substanța care schimbă culoarea este trimetoprim, ormetoprim sau tetraxoprim. Sursa nutritivă nu este în mediul de agar, ci se adaugă separat, sub formă de tabletă sau de disc de hârtie.

Revendicări: 4

RO 114686 B1



RO 114686 B1

Prezenta invenție se referă la o metodă pentru detectarea de compuși antibacterieni într-o probă test, și anume la detectarea de reziduri ale compușilor antibacterieni în lichide.

Sunt cunoscute metode de testare a compușilor antibacterieni într-un lichid, ce utilizează o metodă de schimbarea culorii unui indicator acid-bază sau redox, adăugat sistemului testat. Principiul metodei este acela că atunci când un compus antibacterian este prezent în lichidul de testat, într-o concentrație suficientă pentru a inhiba creșterea organismului testat, culoarea indicatorului va rămâne aceeași, în timp ce atunci când inhibarea nu are loc, creșterea organismului testat este însoțită de formarea de acid sau de metaboliți reduși care vor schimba culoarea indicatorului. În toate aceste teste este utilizat un singur indicator pentru a detecta formarea acidului sau a metabolitului redus. Aceste metode au dat rezultat într-un interval de două ore jumătate până la trei ore jumătate.

Metoda, conform invenției, constă în aceea că proba de testat este introdusă într-un mediu de agar care este tamponat și conține cel puțin doi indicatori redox, ce dau o schimbare de culoare în partea vizibilă a spectrului și eventual o sursă nutritivă și o substanță care schimbă sensibilitatea organismului de testat față de compușii antibacterieni. Organismul de testat este o tulpină de *Bacillus* cum ar fi *Bacillus stearothermophilus* sau o tulpină de *Streptococcus* cum ar fi *Streptococcus thermophilus*, într-o concentrație de 10^5 - 10^9 U.F.C./ml mediu agar. Substanța care schimbă culoarea este trimetoprim, ormetoprim sau tetraxoprim. Sursa nutritivă nu este în mediul de agar, ci se adaugă separat sub formă de tabletă sau de disc de hârtie.

Avantajul prezentei metode este o reducere semnificativă în ceea ce privește durata testului, până la o oră, ce poate fi realizată când se utilizează o combinație de doi sau mai mulți indicatori. O asemenea durată mai scurtă a testului este importantă pentru utilizator deoarece calitatea lichidului probă este cunoscută mai rapid, permițând astfel o distribuire sau prelucrare mai timpurie.

Un alt avantaj al metodei este că testul este foarte simplu de efectuat, așa încât persoana care efectuează testul nu trebuie să fie în mod special calificată. Testul este efectuat în 1 - 2 h, de la începutul lui, deci fiind mult mai scurt decât alte teste microbiene în care se folosește un singur indicator.

Deci, metoda din prezenta invenție cuprinde următoarele etape:

a) aducerea unui organism test și a cel puțin doi indicatori redox într-un mediu cu agar;

b) posibilitatea probei test de a veni în contact cu mediul cu agar, așa încât compușii antibacterieni din proba test să inhibe organismul de testat, în acest mediu cu agar.

Prezenta invenție prevede și o unitate pentru detectarea compușilor antibacterieni, care constă într-un mediu cu agar conținând un organism test, opțional cu sursa nutritivă separată și doi sau mai mulți indicatori redox care pot fi, fiecare, prezenți în mediul cu agar, în proba test sau în sursa nutritivă separată.

Unitatea din prezenta invenție este utilă pentru detectarea reziduurilor de compuși antibacterieni cum ar fi compușii sulfat și antibioticele.

Unitatea poate fi folosită pentru detectarea compușilor antibacterieni în lichide, cum ar fi de exemplu în lapte, apă, sucuri de carne, ser sau urină.

RO 114686 B1

Organismul test este, preferabil, o tulpină de *Bacillus* sau *Streptococcus*. O specie preferată de *Streptococcus* este de exemplu *Streptococcus thermophilus* T 101 (DSM 4022). O tulpină a acestei specii poate fi introdusă în mediul cu agar, preferabil în concentrații de 10^5 - 10^9 unități formatoare de colonii (UFC) per ml mediu cu agar. O specie preferată de *Bacillus* este *Bacillus stearothermophilus*, mai preferabil *Bacillus stearothermophilus*, varietatea *calidolactis* C 953. *Bacillus stearothermophilus* poate fi introdus în mediul cu agar preferabil în concentrații de 10^5 - 10^9 UFC per ml de mediu de agar.

50

Exemple de unități utile pentru scopul prezentei invenții sunt tuburi transparente, singure sau într-un set, sau combinate într-un bloc de material translucid prevăzut cu un număr de orificii fasonate înăuntru.

55

O varietate largă de indicatori redox poate fi folosită, conform cu procedeul din prezenta invenție. Astfel de indicatori redox sunt, de asemenea cunoscuți ca mediatori redox și purtători de electroni. Exemple de asemenea compuși sunt Brilliant Black, Methylene Blue, Toluidin Blue, Safranin O, Indigo Carmin, Thionin, Galloxyanin, Nile Blue A, Brilliant Crocein MOO, Acid Yellow 38, Acid Orange 51, Acid Blue 120, Basic Blue 3, Azure A, Azure B, Congo Red, 1-10 Phenanthroline, Janus Green B, Brilliant Cresyl Blue. Alți indicatori redox (mediatori redox, catalizatori redox și purtători de electroni) pot fi utilizați la fel de bine ca cei arătați mai sus. Asemenea compuși sunt disponibili comercial.

60

65

Preferabil este ca unul din indicatori să dea o schimbare de culoare în partea vizibilă a spectrului. Combinațiile preferate sunt: a) Negru Brilliant și albastru de metilen; b) Negru Brilliant și albastru de toluidină și c) Negru Brilliant și albastru de Nil A.

Nutrienți sunt adăugați pentru a permite multiplicarea organismului testat.

Unitatea prezentei invenții cuprinde, opțional, cel puțin o parte din nutrienții care nu sunt încorporați în mediul cu agar și astfel, sunt adăugați ca o sursă separată, ca de exemplu ca o tabletă sau disc de hârtie, care pot fi plasate pe mediul de agar înainte de desfășurarea testului. Nutrienții pot fi prezenți atât în mediul de agar cât și ca o sursă separată. Cel puțin unul din indicatorii redox pot fi incluși în sursa nutritivă separată.

70

Nutrienții și unul din ambii indicatori redox, de exemplu într-o tabletă pot fi, de asemenea, incluși în unitățile anterior menționate pentru care sunt luate, preferabil, măsuri pentru a evita transportul umidității din mediul cu agar în tabletă. Aceasta poate fi realizată, de exemplu, prin acoperirea tabletei cu un strat rezistent la umiditate cum ar fi de exemplu o ceară. Totuși cu această acoperire, trebuie să se degradeze sau să se topească în timp procedeul test. Adecvat în în acest scop este o ceară care are temperatura de topire de 35°C - 55°C , preferabil de 40° - 45°C .

75

80

Tulpina C 953 de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* a fost depozitată la Laboratorul de Microbiologie Universitatea Tehnică din Delft sub numărul de înregistrare LMD 74.1 în 1974 și la Biroul Central Schimmelcultures (CBS) Baarn sub numărul de înregistrare CBS 760.83 în 1983, unde tulpina este disponibilă publicului. Microorganismul este foarte sensibil la peniciline și alte antibiotice, și este un microorganism cu creștere rapidă. Acest microorganism are avantajul suplimentar că temperatura de creștere optimă este ridicată (între 50° - 70°C). Doar puține specii microbiene sunt capabile să crească la această temperatură. Există, deci, o mică posibilitate ca organismele prezente în lichidul testat sau care au fost incluse, astfel în sistemul test, să efectueze rezultatul testului.

85

90

RO 114686 B1

Conform unei prezentări preferate a prezentei invenții, sensibilitatea organismului test este ajustabilă. Sensibilitatea poate fi alterată prin modalități diferite, spre exemplu prin adăugarea de diferite substanțe, prin schimbarea condițiilor testului cum ar fi de exemplu pH-ul sau concentrația substanțelor de tamponare, agarul sau sporii, sau prin variația raportului de volume, în volumele de agar și de lichid de testat. Exemplele de substanțe care pot fi adăugate sunt nucleozide, ca adenzina sau antifolați ca trimetoprim, ormetoprim și tetroxoprim, care îmbunătățesc sensibilitatea organismului test la compușii sulfa, săruri ale acidului oxalic sau acidului hidrofluoric care îmbunătățesc sensibilitatea la tetraciline și cisteină pentru a diminua sensibilitatea la peniciline.

Este de preferat ca metoda din prezenta invenție să se desfășoare în așa fel încât organismul testat să rămână viu, dar să nu se multiplice în mediul de agar. Acest lucru se obține, în general, prin privarea organismului de nutrienți până când testul este realizat și/sau prin menținerea culturii la o temperatură suficient de joasă, de exemplu spre o temperatură sub 30°C.

În detectarea de reziduri ale compușilor antibacterieni în fluide, preferabil fluide biologice, cum ar fi de exemplu lapte, apă, suc de carne, ser și urină, utilizarea unităților așa cum s-a descris mai sus constă în aceea că o cantitate predeterminată din proba de testat, spre exemplu 0,05 ml- 0,5 ml este plasată pe mediul cu agar (de exemplu pe 0,2 - 3 ml), după care conținuturile unității sunt incubate la, sau aproape la temperatura optimă pentru organismul test, spre exemplu 63 ... 66°C, într-o perioadă predeterminată, spre exemplu 60 ... 120 minute, după care se observă culoarea indicatorului, ceea ce indică prezența sau absența compușilor antibacterieni pentru o anumită concentrație minimă.

Se dau în continuare 6 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1 - Prepararea tuburilor test pentru detectarea antibioticelor.

S-a realizat o soluție din 12 g agar și 9 g clorură de sodiu într-o cantitate de 1000 ml apă distilată. La această soluție s-a adăugat 2,5 ml dintr-o soluție tampon trietanolamină 0,09 M (pH 8,0). Soluția finală a fost sterilizată timp de 20 minute la temperatura de 121°C și apoi răcită la temperatura de aproximativ 60°C. La această soluție sterilă s-a adăugat o cantitate suficientă dintr-o suspensie de spori de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* în apă distilată, pentru a obține o concentrație finală între 10^9 și 10^{10} spori per litru și o cantitate dintr-o soluție sterilă de Negru Brilliant pentru a obține o concentrație finală de 80 mg la litru. În continuare, tuburi sterile cu diametru de aproximativ 9 mm au fost umplute cu o cantitate de 0,3 ml din soluția de agar, în condiții aseptice după care s-au astupat imediat, spre exemplu cu o folie de aluminiu. Conținuturile tuburilor test au fost lăsate să se solidifice, și în acest timp tuburile au fost ținute într-o poziție verticală. Astfel preparate, aceste tuburi au fost păstrate la temperatura cuprinsă între 5°C și 15°C.

Exemplul 2 - Prepararea unui tub test pentru detectarea antibioticelor și a compușilor sulfa.

S-a procedat ca în exemplul 1, cu excepția că, împreună cu soluția tampon s-a adăugat și o anumită cantitate din soluția de trimetoprim pentru a obține o concentrație finală de 60 μg per litru.

Exemplul 3 - Prepararea tabletelor de nutrienți.

S-a făcut un amestec din 100 g dextroză, 160 g Avicel PH 101, 50 g triptoză, 10 g fiton peptonă, 15 g precinol și 500 mg Albastru de Toluidină, dizolvat în 50 ml alco-

RO 114686 B1

ol etilic. Acest amestec a fost suficient pentru a prepara 30.000 tablete cu un diametru de 3 mm și o grosime de 1,2 mm.

Exemplul 4 - Desfășurarea testului.

140

Un tub test care a fost preparat în conformitate cu cele arătate la exemplul 1, a fost deschis prin înțeparea capacului și s-a adăugat o tabletă nutritivă care a fost preparată cu cele arătate în cadrul exemplului 3. S-a luat din probă (de exemplu o probă de lapte ce urmează să fie investigată) 0,1 ml și s-a adăugat la tubul test, și acest tub test a fost plasat într-un incubator (baie de apă sau termostat) și păstrat la temperatura de 64°C. Au fost făcute observații după o oră și 20 minute, până la o oră și 40 minute. Dacă în acest timp culoarea mediului cu agar este galbenă, proba nu conține o cantitate detectabilă dintr-un copus antibacterian (de exemplu 0,003 U.I., sau mai puțin, de penicilină G sau 0,1 μg, sau mai puțin, de sulfametazin, per ml).

145

Dacă totuși, culoarea mediului cu agar este albastră, proba conține cel puțin o cantitate detectabilă dintr-un compus antibacterian (de exemplu 0,006 U.I., sau mai mult de penicilină G sau 0,2 μg, sau mult, de sulfametazin per ml).

150

O concentrație intermediară, reprezentând astfel chiar cantitatea detectabilă poate da o culoare a mediului cu agar, între galben și albastru.

Exemplul 5 - Compararea unității de testare cu doi indicatori, cu un tub de testare cu un singur indicator.

155

Tuburile de testare au fost preparate în conformitate cu exemplul 1 sau exemplul 2. Tabletele cu nutrienți au fost preparate în conformitate cu cele prezentate la exemplul 3. Au fost preparate tablete nutritive similare, dar fără Albastru de Toluidină. Testele au fost efectuate conform exemplului 4, cu ambele tipuri de tablete nutritive și o probă de lapte fără antibiotice. Tuburile test, în combinație cu nutrienții care nu conțin Albastru de Toluidină, au luat aproape o oră pentru schimbarea culorii, adică două ore și 20 min până la două ore și 40 min, când s-a comparat cu combinația tub test plus tableta nutritivă care conține Albastru de Toluidină.

160

Exemplul 6 - Prepararea variațiilor și efectuarea testelor cu acestea.

165

Tuburile test au fost preparate conform exemplului 1, cu deosebire că în locul unei soluții cu Negru Brilliant s-a utilizat o soluție care conține o concentrație similară din unul dintre următorii indicatori redox: Brilliant Crocein MOO, Galben Acid 38, Galben Acid 51, Albastru Acid 120 sau Roșu Congo. Tabletele nutritive au fost preparate în conformitate cu cele prezentate în exemplul 2, cu deosebire că în locul Albastrului de Toluidină s-a utilizat o cantitate similară din unul dintre următorii indicatori redox: Safranina O, Indigo Carmin, Tionină, Albastru de Nil, Azur A, Azur B, Janus Green B, Brilliant Cresyl, Albastru ALD sau Albastru de Metilen. Testul a fost efectuat în conformitate cu exemplul 4, cu tuburi test și tablete nutritive preparate în conformitate cu cele prezentate mai sus.

170

175

O schimbare de culoare rezultată, indică că proba de lapte investigată nu conține cantități detectabile de antibiotic și/sau compuși sulfa. Dacă culoarea testului nu se schimbă, proba de lapte conține asemenea reziduuri. Durata testului variază în funcție de combinația de indicatori aleasă, dar a fost scurtată semnificativ față de cea a unui test indicator, într-un mod asemănător celui descris în exemplul 5.

180

Revendicări

185 1. Metodă pentru detectarea de compuși antibacterieni într-o probă test **caracterizată prin aceea că** proba de testat este introdusă într-un mediu de agar care este tamponat și conține cel puțin doi indicatori redox, ce dau o schimbare de culoare în partea vizibilă a spectrului și eventual o sursă nutritivă și o substanță care schimbă sensibilitatea organismului de testat față de compușii antibacterieni.

190 2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** organismul de testat este o tulpină de *Bacillus* cum ar fi *Bacillus stearothermophilus* sau o tulpină de *Streptococcus* cum ar fi *Strptococcus thermophilus* într-o concentrație de 10^5 - 10^8 U.F.C./ml mediu agar.

195 3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** substanța care schimbă sensibilitatea este trimetoprim, ormetoprim sau tetraxoprim.

4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** sursa nutritivă nu este în mediul de agar ci se adaugă separat sub formă de tabletă sau disc de hârtie.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**

Examinator: **farm. Pentelescu Elena**

