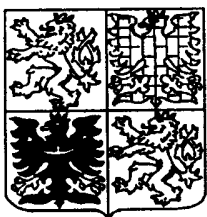


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 14.01.94
(32) 15.01.93, 11.03.93
(31) 93/004971, 93/029675
(33) US, US
(40) 13.03.96

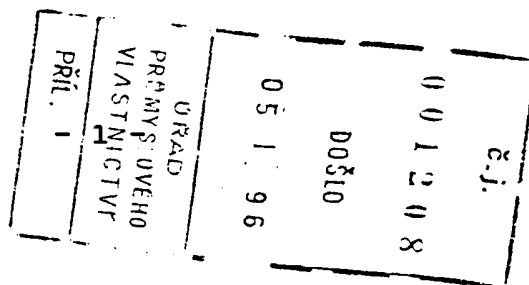
(21) 1790-95

(13) A3

6(51)

C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/02
C 12 Q 1/04
C 12 Q 1/06

- (71) REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA,
Minneapolis, MN, US;
- (72) Bloomquist Cynthia G., St.Louis Park, MN, US;
Douglas William, Falcon Heights, MN, US;
Dunny Gary, St.Paul, MN, US;
Liljemark Willian, Plymouth, MN, US;
Reilly Bernard, Minneapolis, MN, US;
- (54) **Způsob předvídání, kdy budou bakterie přilnuté
k povrchu vykazovat aktivní růst**
- (57) Řešení se týká faktoru začátku mikrobiální replikace, jakož
i způsobu jeho stanovení a použití. Faktoru začátku mikro-
biální replikace se může používat pro stimulaci růstu bakte-
rií v suspenzi nebo vázaných k povrchu. Také lze
identifikovat činidla, která inhibují nebo povzbuzují
účinnost faktoru začátku mikrobiální replikace. Předmětem
řešení jsou také způsoby ošetření nebo regulace růstu bakte-
rií, které jsou vázány k povrchům. Jak proliferace, tak meta-
bolismus bakterií, které jsou přilnuty k povrchům, jsou
nezávislé na čase a dodávce živin. Růst adherentních bakte-
rií je závislý na hustotě. Řešení se také týká způsobu předví-
dání, kdy budou bakterie přilnuté k povrchu vykazovat
rychlý růst. Dále jsou předmětem řešení kmeny transformo-
vaných bakterií a způsoby jejich použití pro měření mikro-
biálního růstu za přítomnosti nebo nepřítomnosti faktoru
začátku mikrobiální replikace. Tyto transformované bakte-
rie obsahují bakteriální reporterový gen pod kontrolou pro-
motoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem
buněk.



01-1219-95-Ho

Způsob předvídání, kdy budou bakterie přilnuté k povrchu
vykazovat aktivní růst

Oblast techniky

Vynález se obecně týká faktorů replikace mikrobů a způsobů inhibice nebo povzbuzování růstu mikroorganismů. Jeden způsob zahrnuje léčbu nebo potlačování bakteriální infekce vyvolané adherentními bakteriemi, které jsou připojeny k povrchům. Jiný aspekt vynálezu se týká způsobu léčby nebo potlačování infekce adherentních bakterií na povrchu zubů nebo interních implantovaných povrchů. Další aspekt vynálezu se týká přípravku vhodného pro použití k iniciaci aktivního či rychlého růstu nebo replikace bakterií a nových kmenů bakterií pro zkoušení tohoto přípravku. Ještě další aspekt vynálezu se týká způsobu potlačování aktivního či rychlého růstu adherentních bakterií za použití přípravku, který iniciuje či zahazuje aktivní růst bakterií.

Dosavadní stav techniky

Léčba a potlačování bakteriálních infekcí je v ohnisku zájmu moderního výzkumu. Zavedení a široké používání antibiotik vybavilo lékaře různými mocnými nástroji pro léčbu a potlačování bakteriálních infekcí u pacientů. Přes obrovský rozsah výzkumu a přes četnost farmaceutických prostředků pro potlačování bakteriálních infekcí nejsou problémy vztahující se k léčbě a potlačování bakteriálních infekcí odstraněny. Tak například široké používání antibiotik vedlo k vývoji kmenů patogenních organismů, které jsou resistantní vůči většině běžně používaných antibiotik. Kromě toho zvyšující se počet pacientů se sníženou imunitou

je novou výzvou pro lékaře. Lékaři mimo to již dlouho vědí, že přítomnost cizích zařízení, jako jsou dentální implantáty, umělé srdeční chlopně nebo katetry, představuje pro pacienta zvýšené riziko bakteriální infekce. Potlačování infekcí v případech, do nichž jsou zatažena taková cizí tělesa, je komplikované.

Samozřejmě se však očekává, že implantace různých zařízení bude pokračovat s tím, jak se bude vyvíjet pokrok v biomateriálech a implantačních technikách. Přes očekávaný nárůst používání implantovaných biomateriálů však nejsou k dispozici účinné metodologie a farmakologická činidla pro potlačování bakterií vyskytujících se ve spojení s těmito materiály.

Potlačování bakteriálního zamoření a růstu bakterií na površích je problematické zejména z toho důvodu, že povaha bakteriálního zamoření povrchů není dobře známa. Přestože bakterie mají sklon k zamořování povrchu téměř všech dostupných předmětů, jen málo je známo o potlačování bakterií na těchto površích nebo o faktorech, které přispívají k růstu bakterií na těchto površích.

Předpokládá se, že významný mechanismus, který se uplatňuje při rozvoji bakteriální biomasy na dostupných površích, zahrnuje

1) přilnutí indigenních bakterií ke specifickým receptorům pelikulárních povrchů skloviny a

2) růst nebo dělení adherentních (přilnutých) bakterií.

Předpokládá se také, že růst adherentních bakterií je velmi pomalý.

Bylo pozorováno a publikováno, že bakterie přilnuté k povrchům se podstatně liší od bakterií, které jsou v roztoku, nebo které nejsou vázány k povrchu. Tak například bakterie, které jsou v roztoku jsou citlivější na antibiotika ve srovnání s bakteriemi přilnutými k povrchům. Porozumění procesům růstu přilnutých, tj. adherentních bakterií a způsobům, jakými bakterie lnou k povrchu, je tedy potřebné pro úspěšnou léčbu a potlačování bakteriálních infekcí, které jsou přímo nebo nepřímo spojeny s povrchy.

Kromě toho, nebyly ani identifikovány nebo dobře charakterizovány faktory mikrobiálního růstu, které jsou důležité pro stimulaci růstu populace buněk nebo iniciace růstu jednotlivých buněk. Identifikace faktorů mikrobiálního růstu z bakteriálních buněk rostoucích na površích nebo v suspenzi by se mohla stát důležitým prostředkem pro stimulaci růstu bakterií nebo inhibici růstu bakterií v suspenzi nebo na površích.

Zřejmě tedy existuje potřeba porozumět bakteriálnímu růstu na povrchu biomateriálů a takový růst předvídat, a také potřeba vyvinout účinný způsob potlačování proliferace a metabolismu bakterií přilnutých k takovým materiálům. Dále též existuje potřeba identifikovat a charakterizovat faktory mikrobiálního růstu, aby bylo možno stimulovat nebo inhibovat růst bakterií na površích.

Podstata vynálezu

Vynález představuje nové řešení výše uvedených problémů spojených s potlačováním bakteriálního růstu na površích (například jako součást léčby), které se opírá o nový poznatek, že růst bakterií na povrchu materiálu je závislý na hustotě bakterií. Pokud se hustota adherentní bakteriální populace nepřiblíží hustotě, která je spojena

se zvýšeným poměrem aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím, je bakteriální růst nepodstatný. Jinými slovy, významná proliferace a metabolismus bakterií přilnutých k povrchům biomateriálů jsou nezávislé na čase a dodávce živin.

Jedním aspektem tohoto vynálezu je způsob předvídání, kdy budou bakterie vykazovat aktivní růst na povrchu, jehož podstata spočívá v tom, že se stanoví hustota první populace životaschopných bakterií na povrchu, potom se hustota první populace porovná s hustotou druhé populace obsahující stimulovaný nebo zvýšený poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím, přednostně při hustotě v rozmezí od asi 400 000 do asi 6 300 000 bakterií/mm². Aktivní bakteriální růst je možno předvídat, když je hustota první populace vyšší než hustota druhé populace. Tohoto způsobu se může s výhodou používat k měření růstu bakterií na površích. Poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím v dané populaci je možno stanovit způsoby popsány v příkladu 1, který je uveden dále.

Dalším aspektem tohoto vynálezu je způsob předvídání rychlého zvýšení růstu bakterií na povrchu, jehož podstata spočívá v tom, že se stanoví hustota populace životaschopných rostoucích bakterií na povrchu, dále se stanoví populace aktivně rostoucích bakterií na povrchu, vypočítá se poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím na povrchu, přičemž aktivní bakteriální růst na povrchu se předvídá, pokud poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím leží v rozmezí od asi $5 \times 10^{-4} : 1$ do asi $20 \times 10^{-2} : 1$. Přednostní poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím leží v rozmezí od asi $20 \times 10^{-4} : 1$ do $40 \times 10^{-4} : 1$.

Dalším aspektem vynálezu je způsob inhibice bakteriálního růstu na povrchu, jehož podstata spočívá v tom, že se bakteriální růst reguluje tak, aby se hustota populace udržovala pod hustotou populace spojenou se zvýšením nebo stimulací poměru rostoucích buněk k životachopným buňkám v této populaci. Jedná se tedy o regulaci na hodnotu, při níž růst, který je závislý na hustotě již není stimulován. Bakteriální růst je možno regulovat omezením styku bakterií s činidly povzbuzujícími přilnutí, jako jsou uhlohydráty, nebo modifikací hydrofobicity povrchu.

Kromě způsobů uvedených výše, jsou předmětem vynálezu také přípravky a způsoby pro potlačování nebo léčbu bakteriálních infekcí. Předmětem vynálezu je tedy také přípravek obsahující faktor začátku mikrobiální replikace (faktor SMR), který iniciuje či zahajuje procesy aktivního růstu bakterií přilnutých k povrchu, přičemž pokud je faktor začátku mikrobiální replikace izolován, vykazuje molekulovou hmotnost nižší než 3 000 (při měření filtrací přes membránu s určitou vylučovací mezí molekulové hmotnosti (size exclusion membrane filtration). Izolovaný faktor SMR je také odolný vůči zpracování v autoklávu, zmrazení a lyofilizaci.

Prostředek obsahující faktor SMR se může vyrobit tak, že se vytvoří kultura sanguis streptococci a z kultivačního média se izoluje extracelulární materiál v době, kdy jsou bakterie ve fázi aktivního růstu. Pro výrobu faktoru SMR se hodí jak suspenzní, tak agarové kultury sanguis streptococci. Přednostní bakteriální kmeny zahrnují *Streptococcus gordonii* kmen, Challis, přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105 (dříve *S. sanguis*) nebo *E. coli* 149, přírůstkové číslo sbírky ATCC 55535.

Přítomnost faktoru SMR je možno snadno určit mnoha metodami, jako je metoda, při níž se látka obsahující faktor SMR uvede do styku s bakteriemi přilnutými ke kousku skloviny potažené slinami, provede se inkubace skloviny pokryté bakteriemi a stanoví se aktivní růst na základě zavedení (inkorporace) nukleotidů značených radioisotopem do bakteriálních buněk způsobem popsáným v příkladu 1.

Z jiných metod stanovení faktoru SMR je možno uvést měření nárůstu poměru aktivně rostoucích buněk imobilizovaných na povrchu za přítomnosti faktoru SMR ve srovnání s populací bakterií, na kterou se faktorem SMR nepůsobí. Buňky mohou být gram-pozitivní nebo gram-negativní, ale přednostně se jedná o *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105. Také se může použít transformovaných bakteriálních kmenů, které obsahují integrovaný bakteriální reporterový gen pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk.

Faktoru SMR se také může použít při způsobu zvyšování poměru aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci, přednostně na hodnotu poměru asi v rozmezí od $5 \times 10^{-4} : 1$ do $20 \times 10^{-2} : 1$. Stimulace mikrobiálního růstu může být důležitá v mnoha průmyslových a diagnostických situacích.

Předmětem vynálezu je dále také způsob zvyšování účinnosti antimikrobiálních činidel, jehož podstata spočívá v tom, že se bakterie uvedou do styku s antimikrobiálním činidlem a faktorem SMR, za účelem iniciace aktivního růstu těchto bakterií.

Předmětem vynálezu je dále také způsob identifikace činidel inhibujících nebo stimulujících faktor SMR. Činidla inhibující aktivitu faktoru SMR by mohla představovat nová

chemoterapeutická činidla a činidla stimulující aktivitu faktoru SMR by mohla představovat jiné nové faktory mikrobiálního růstu.

Předmětem vynálezu je dále také genetická kazeta a transformovaná bakterie s touto integrovanou genetickou kazetou. Genetická kazeta podle vynálezu se skládá z první sekvence DNA kódující bakteriální reporterový gen připojené k 3' konci druhé sekvence DNA, která se hybridizuje ke genu nebo části genu, jehož exprese je koordinovaně regulována bakteriálním růstem. Druhá sekvence DNA způsobuje integraci genetické kazety nebo její části do genu v bakteriálním chromozomu. Transformované bakteriální kmeny obsahují genetickou kazetu integrovanou do bakteriálního chromozomu v místě pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky. Transformovaných bakteriálních kmenů je možno použít při způsobu měření mikrobiálního růstu za přítomnosti nebo za nepřítomnosti faktoru SMR na základě monitorování exprese produktu bakteriálního reporterového genu, počítáno na buňku a jednotku času.

Přehled obr. na výkresech

Na obr. 1A je uvedena grafická reprezentace aktivního růstu bakterie na zubním implantátu in vivo v situaci, kdy se hustota bakteriální populace blíží hustotě přibližně v rozmezí od 2 500 000 do 3 200 000 [$10^{6,4-6,5}$] bakterií/mm².

Na obr. 1B je znázorněna grafická reprezentace nasycení pelikulárních vazebných míst skloviny, k němuž dochází během prvních dvou až osmi hodin na in vivo dentálních implantátech. Orální flóra nasytí tyto povrchy s hustotou 200 000 až 630 000 [$10^{5,3}$ až $10^{5,8}$] bakterií/mm².

Na obr. 2 je uvedena grafická reprezentace aktivního růstu bakterií na in vivo dentálních implantátech za přítomnosti sacharosy (čtverečky), glukosy (trojúhelníčky) nebo vody (kolečka) za situace, kdy se bakteriální populace blíží hustotě v rozmezí od asi 2 500 000 do 3 200 000 $[10^{6,4-6,5}]$ bakterií/mm².

Na obr. 3 je uvedena grafická reprezentace porovnávací celkového počtu životaschopných bakterií v ústech na neošetřené sklovině nebo sklovině ošetřené natriumoktadecylsulfátem.

Na obr. 4 je uvedena grafická reprezentace aktivního bakteriálního růstu na povrchu skloviny hovězí dobytka, dentálního dostavbového materiálu vytvrditelného světlem, VISIO-DISPERS (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA) a dentálního dostavbového materiálu SILUX (3M, St. Paul, MN, USA) v situaci, kdy se hustota populace na kterémkoliv z těchto povrchů blíží hodnotě 2 500 000 do 3 200 000 $[10^{6,4-6,5}]$ bakterií/mm².

Na obr. 5A je znázorněna imobilizace radioaktivním izotopem značené bakterie Streptococcus gordonii kmene Challis (přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105) (hvězdičky) a Streptococcus parasanguis PW213 (plná kolečka) na miskách aktivovaných maleinanhydridem v závislosti na počtu buněk na mm².

Na obr. 5B je znázorněna vazba radioaktivním izotopem značené bakterie Streptococcus gordonii kmene Challis (přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105), v závislosti na hustotě buněk/mm², k celkem třem povrchům: k povrchu stripovací misky z polystyrenu aktivovaného maleinanhydridem (prázdné čtverečky) (Reacti-Bind, Pierce, Rockford, ILL, USA); k povrchu stripovací misky Immulon (prázdné kosočtver-

ce) (Dynatech Labs) a k povrchu stripovací misky s jamkami pro zkoušky ELISA (Easy Wash) (plné kroužky) (Corning, NY, USA).

Na obr. 6 je znázorněna inkorporace [^3H -methyl]-thymidinu do *S. gordonii* kmene Challis (přirůstkové číslo sbírky ATCC 35105) za přítomnosti izolovaného faktoru SMR (hvězdičky) a kontrolního Todd-Hewittova média (TH) (čtveřečky) v závislosti na době inkubace faktoru SMR nebo média TH. Šipkou je označena doba sklizně při přednostní zkoušce in vitro bakteriální replikace.

Na obr. 7 je znázorněna genetická a fyzikální mapa plasmidu pMSP16Samy. Tento plasmid byl zkonstruován ligací fragmentu DNA, který je homologický k vnitřnímu segmentu streptokokového genu 16s rRNA, do pRQ200 způsobem uvedeným v tomto popisu.

Na obr. 8 je znázorněna předpokládaná struktura chromosomální rDNA *S. gordonii* Challis obsahující bezpromotorový amylasový gen fúzovaný k 16s rRNA promotoru (označenému P) po integraci pMSP16Samy do chromosomu Challis homologickou rekombinací.

Následuje podrobnější popis tohoto vynálezu.

Vynález se týká způsobů ovlivňování a potlačování růstu bakterií, které jsou připojeny či přilnuty k povrchům biomateriálů. Dále se vynález týká způsobů stanovení, za jakých podmínek a za jakou dobu budou bakterie vykazovat zvýšený, stimulovaný, aktivní či rychlý růst na povrchu. Aktivní růst bakterií má přímý vztah k hustotě populace. Růst závislý na hustotě je spojen se zvýšením poměru aktivních rostoucích buněk k životaschopným buňkám obsaženým v dané populaci. Poměr počtu aktivně rostoucích buněk k počtu

životaschopných buněk v dané populaci se může stanovit různými metodami, ale přednostně se měří pomocí zavádění radioizotopem značeného nukleotidu do buněčné DNA. Stimulace obsahu aktivně rostoucích buněk vede k hodnotě poměru počtu aktivně rostoucích buněk k počtu životaschopných buněk od $5 \times 10^{-4} : 1$ do $20 \times 10^{-2} : 1$, přednostně od $10 \times 10^{-4} : 1$ do $40 \times 10^{-4} : 1$. Aktivního růstu závislého na hustotě je možno dosáhnout, když má přírodní, převážně streptokoková populace bakterií o velikosti, která se blíží 1 až 2 μm , hustotu populace přibližně v rozmezí od asi 400 000 ($10^{5,6}$) do asi 6 300 000 ($10^{6,8}$) bakterií/ mm^2 . Přednostní hustota populace leží v rozmezí od asi 2 500 000 do 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/ mm^2 .

Vynález se dále týká faktorů mikrobiální replikace, což jsou činidla nebo produkty, které iniciují či zahajují růstové či replikační procesy v bakteriích. Variace a modifikace těchto faktorů mikrobiální replikace umožňují regulaci podmínek a doby, kdy bakterie budou vykazovat aktivní růst. Vynález se týká způsobu stanovení účinku faktorů mikrobiální replikace na buňky a způsobů identifikace činidel, která inhibují nebo stimulují faktory mikrobiální replikace. Dále se vynález týká také použití faktorů mikrobiální replikace pro stimulaci nebo inhibici mikrobiálního růstu na površích nebo v suspenzi. Při způsobu měření mikrobiálního růstu za přítomnosti nebo za nepřítomnosti faktorů mikrobiálního růstu je možno použít nových kmenů bakterií.

Vynález se dále také týká genetických kazet a transformovaných bakteriálních buněk. Genetická kazeta podle vynálezu obsahuje první sekvenci DNA, která kóduje bakteriální reporterový gen vázaný k 3' konci druhé sekvence DNA. Druhá sekvence DNA zajišťuje rekombinaci a integraci genetické kazety do bakteriálního chromosomu v místě za promotorem, jehož exprese je koordinovaně regulo-

vána růstem buněk. Transformované buňky obsahují genetickou kazetu zahrnující bakteriální reporterový gen, který je stabilně integrován do bakteriálního chromosomu pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk. Reporterový gen funguje jako indikátor podílu rostoucích buněk v bakteriální populaci. Dále jsou předmětem vynálezu také způsoby měření mikrobiálního růstu za přítomnosti nebo za nepřítomnosti faktorů mikrobiální replikace.

V popisu a nárocích se používá některých termínů, které jsou vysvětleny dále.

Pod pojmem "životaschopné bakterie" se rozumějí živé bakterie, které jsou schopny růstu za přítomnosti vhodného média obsahujícího živiny. Pro jejich stanovení se obvykle používá postupu, při němž se alikvot či vzorek obsahující bakterie přidá k agarovému médiu bohatému na živiny a bakterie se nechají růst. Počet bakterií obsažených ve vzorku je možno snadno stanovit spočítáním jednotek tvořících kolonie, které rostou na agaru. Počet životaschopným bakterií však neposkytuje žádnou informaci vztahující se ke specifickému stavu růstu, v jakém se bakterie mohou nacházet v daném čase. Životaschopné bakterie tedy zahrnují dormantní, latentní a aktivně rostoucí, jakož i hynoucí bakterie.

Pod označením "aktivně rostoucí bakterie" se rozumějí bakteriální buňky, které se nalézají v poměrně krátkém časovém období, v němž vstupují do fáze aktivní či rychlé proliferace, metabolismu, růstu a replikace, ve srovnání s rychlostí proliferace, metabolismu, růstu a replikace, které jsou pozorovány u dormantních, latentních nebo pomalu rostoucích buněk. Aktivně rostoucí buňky je možno stanovit na základě zvýšení počtu životaschopných buněk za jednotku času při růstu v kapalně nebo suspenzní

kultuře. Když se bakterie nacházejí v exponenciální fázi růstu v kapalně kultuře, je možno na základě změny počtu životaschopných buněk za jednotku času vypočítat dobu zdvojnásobení. Zvýšení poměru počtu aktivně rostoucích buněk k počtu životaschopných buněk v dané populaci je možno stanovit stanovením obsahu buněk, které aktivně syntetizují DNA nebo RNA nebo polypeptid. Parametry zahrnující množství celkové buněčné hmoty, množství polypeptidu, RNA a DNA jsou funkcemi rychlosti růstu (viz *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*, ed. F. C. Neidhardt et al. (1990) Sinauer Associates, Inc. strany 199 až 202 a 216 až 220. Podíl aktivně rostoucích buněk je možno stanovit ze změřeného množství syntetizované buněčné DNA za použití techniky značení radioizotopy, která je popsána v příkladu 1.

Pod označením "patogenní bakterie" se rozumějí jakékoliv rody, druhy nebo typy bakterií, které mají škodlivý klinický účinek na pacienta vyvolaný škodlivým vlivem nežádoucího bakteriálního růstu nebo přítomnosti nežádoucích bakteriálních metabolitů. Patogenní bakterie jsou odborníkům v tomto oboru dobře známy a jsou popsány v učebnicích, jako je *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*, 2. vydání, John C. Sherris (editor) (1990) Elsevier Publishing Co., Inc. New York, NY, USA. Je známo, že patogenita specifického rodu, druhu nebo typu bakterií se bude měnit od pacienta k pacientovi. Odborník v tomto oboru však může snadno určit, která specifická bakterie má škodlivý účinek na specifického pacienta, aniž by musel provádět nadměrné zkoušení či experimentování. Také je známo, že ne všechny bakterie škodlivě ovlivňují pacienta a že přítomnosti známých, relativně benigních či neškodných bakterií (tj. normální flory) na površích biomateriálů není považována na škodlivou a může být pro pacienta prospěšná.

Pod označením "oportunní bakterie" se rozumějí mikroorganismy, které jsou obvykle považovány za nevirulentní nebo za omezeně virulentní, ale které mohou vyvolat chorobu nebo infekci, pokud se dostanou do chráněné oblasti těla nebo v případě, že je obranný mechanismus hostitele narušen. Oportunní bakteriální infekce jsou známy odborníkům v tomto oboru a jsou popsány v učebnicích, jako je publikace Medical Microbiology, citovaná výše.

Pod označením "hustota populace" se rozumí počet životaschopných bakterií, které jsou přilnuty či připojeny ke jednotkovému povrchu nebo které jsou obsaženy v jednotkovém objemu kapaliny. Hustotu populace bakterií je možno stanovit dobře známými postupy kultivace, počítání kolonií v miskách a vybarvování.

Pod označením "biomateriály" se rozumějí předměty, obsahující povrchy, k nimž mohou být životaschopné bakterie přilnuty, připojeny nebo na nichž mohou ulpívat. Jako vhodné biomateriály je možno uvést různé materiály, jako jsou pryskyřice, dostavbové materiály, kompozity, kovy nebo keramické materiály. Pod označením "povrchy" se rozumějí exponované povrchy těchto materiálů, které mohou přicházet do styku s bakteriemi obsaženými v kapalinách.

Pod označením "činitel podporující adheenci" se rozumějí materiály, látky nebo směsi, které povzbuzují, podporují nebo zvyšují schopnost bakterií připojit se k povrchu, přilnout k němu nebo na něm ulpívat.

Pod označením "činitel potlačující adheenci" se rozumějí materiály, látky nebo směsi, kterých se může používat pro modifikaci vlastností povrchu materiálu za účelem potlačení nebo inhibice schopnosti bakterií při-

pojit se k povrchu biomateriálu, přilnout k němu nebo na něm ulpívat.

Pod označením "faktor začátku mikrobiální replikace" či "faktor SMR" se rozumí jakékoliv činidlo nebo směs činidel, které povzbuzuje nebo stimuluje bakteriální buňky v tom smyslu, že se z nich stávají aktivně rostoucí buňky, tj. které iniciuje nebo zahajuje jejich růst. Při vyšetřování účinku faktoru SMR na populaci bakteriálních buněk je pozorováno zvýšení poměru počtu aktivně rostoucích buněk k počtu životaschopných buněk, které vede k hodnotě tohoto poměru asi $5 \times 10^{-4} : 1$ až asi $20 \times 10^{-2} : 1$. Pod označením "aktivně rostoucí" se rozumí jak dělení bakteriálních buněk, tak jejich zvýšený buněčný metabolismus, zvýšená produkce DNA a RNA nebo jiné biologické odpovědi, které jsou spojeny s periodou aktivního růstu bakteriálních buněk. Je samozřejmé, že zjištěný účinek faktoru SMR bude ovlivněn řadou vnějších faktorů, jako je typ média, koncentrace, iontová síla, přítomnosti iontů, redukčně-oxidační potenciál, viskozita, vodivost a přítomnost jiných biologických činidel.

Pod pojmem "dynamický styčný úhel" (smáčení) se rozumí veličina, která se měří při stanovení interakce povrchu nebo modifikovaného povrchu a vody za použití soupravy Wilhelmy Balance metodou určenou výrobcem (Wilhelmy Balance model DCA-332 je obchodně dostupný výrobek firmy Cahn Instruments, Cerritos, California, USA). Tímto způsobem je možno měřit relativní hydrofobicitu povrchu nebo modifikovaného povrchu.

Pod označením "imobilizované bakterie" se rozumějí bakterie, které jsou připojeny k povrchu pomocí linkeru. Imobilizace může zahrnovat vazbu bakterií k povrchu za použití chemických nebo biologických činidel, jako je

maleinanhydrid nebo protilátka vázaná k nosiči. Pod označením "adherentní bakterie" se rozumí bakterie připojené ke kompatibilním povrchům za použití endogenních adhesinů. Pod označením "vázané bakterie" se rozumí bakterie připojené k povrchu.

Pod označením "bakteriální reporterový genový produkt" se rozumí polypeptid, který přednostně za normálních podmínek není obsažen v bakteriální hostitelské buňce, ať již tato buňka aktivně roste, nebo ne, a který může sloužit jako indikátor aktivního růstu buněk. Tento genový produkt má takové strukturní nebo funkční vlastnosti, které je možno měřit v závislosti na čase nebo na růstu.

Pod označením "genetická kazeta" se rozumí kombinace alespoň dvou různých sekvencí DNA, které mají přednostně odlišné funkce, za vzniku jednotky genetické informace.

Pod označením "stabilně integrovaná" se v souvislosti s genetickou kazetou rozumí, že je tato kazeta připojena k bakteriálnímu chromozomu tak, že dochází k její replikaci a přenosu do bakteriálního potomstva spolu s bakteriálním chromosomem. Integrované genetické kazety vykazují velmi nízkou četnost reverse vzhledem k plasmidům zhotoveným metodami genového inženýrství, přednostně četnost v rozmezí od asi 10^{-5} do asi 10^{-9} .

Pod označením "druhá sekvence DNA, která se hybridizuje s genem nebo jeho částí" se rozumí sekvence DNA, která je v dostatečné míře (přednostně z 90 až 100 % totožná se sekvencí komplementární oblasti bakteriálního chromozomu, aby mohla vzniknout stabilní dvojřetězcová hybridní molekula DNA, když se tato hybridizační sekvence zavede transformací

do bakterie. Hybridních molekul vytvořených in vivo mezi klonovanými sekvencemi DNA (přednostně o délce 500 až 5 000 bázových párů) je možno použít pro integraci genetikých kazet do bakteriálního chromozomu na specifických místech.

Způsoby předvídání aktivního růstu bakterií na povrchu

Vynález se opírá o zjištění, že proliferace a metabolismus bakterií, které jsou vázány k povrchu, nejsou závislé ani na čase, ani na dodávce živin a že u takových přilnutých bakterií nebude docházet ve významné míře k proliferaci nebo k metabolismu, pokud se tato bakteriální populace nepřiblíží svou hustotou hodnotě hustoty populace, která je charakteristická pro růst závislý na hustotě na přírodních površích.

Vzhledem k tomu, že bakterie se v přírodě vyskytují v podstatě všude a když se na určitém místě vyskytují, nevyhnutelně se pokoušejí o přilnutí k dostupnému povrchu, mají způsoby potlačování těchto bakterií široké pole aplikací. Povrchy, které jsou dostupné pro bakterie, mohou konkrétně zahrnovat dentální biomateriály, lékařská zařízení umístěná v těle, jiné dentální nebo lékařské nástroje, které přicházejí do styku s tekutinami, jako je sérum, tělesné tekutiny, jiné tekutiny obsahující polypeptidy, glykoproteiny nebo uhlohydráty, nebo do styku s volně žijícími bakteriemi. Povrchy, které jsou susceptibilní pro adheenci bakterií se vyskytují doma, na pracovišti a v průmyslovém prostředí.

Zkoušení biomateriálů, které se nalézají v ústní (orální) dutině, slouží jako snadno dostupný model pro studium chování a vlastností bakterií přilnutých k povrchům. Povrchy obsažené v orální dutině jsou snadno přístupné a

orální dutina obsahuje široké spektrum bakteriálních druhů a rodů, u nichž byla zjištěna škodlivost na jiných chráněných místech těla. Tak například bylo oznámeno, že určité bakterie, které jsou přítomny v orální dutině jsou schopny oportunně infikovat endokardiální povrch srdce, což je místo, které představuje chráněnou oblast, jež je obvykle sterilní, tj. jež není obvykle kontaminována bakteriemi. Tento typ endokardiální infekce je obzvláště problematický u pacientů s implantovanými srdečními chlopněmi. S ohledem na přítomnost řady rodů a kmenů bakterií na površích tělesné sliznice a v prostředí k nim přiléhajícím se očekává, že způsoby použité k hodnocení a potlačování (včetně léčebného potlačování) bakterií přilnutých k povrchům v orální dutině, bude možno snadno přenést do oblastí hodnocení nebo potlačování (včetně léčebného potlačování) bakterií přilnutých k povrchům v jiných částech těla nebo v jiném prostředí.

Dále se také očekává, že povrchy dostupné pro bakterie, které jsou ve styku se sérem nebo jinými tělesnými tekutinami, budou rovněž vykazovat jev růstu závislého na hustotě, podobně jako je tomu v případě chování bakterií vyskytujících se v orální dutině. Kromě toho, popsané způsoby budou také adaptovatelné pro hodnocení a potlačování bakterií přilnutých k povrchům mimo orální dutinu nebo mimo tělo vůbec.

Při vývoji metod a způsobů, jimiž mají být zasaženy bakterie, je důležitým faktorem nutnost selektivního zaměření na patogenní nebo oportunní bakterie bez škodlivého ovlivnění benigních nebo prospěšných bakterií obsažených v normální flóře. Účinnost antimikrobiálních činidel je možno významně zvýšit tím, že se patogenní bakterie uvedou do styku se specifickým antimikrobiálním činidlem a zároveň s faktorem začátku mikrobiální replikace (SMR),

poněvadž je dobře známo, že bakterie jsou obzvláště susceptibilní k antimikrobiálním činidlům, když se nacházejí v období aktivního růstu, zatímco mohou být antimikrobiálními činidly nepostiženy, pokud jsou ve stadiu dormantního nebo latentního růstu.

Jeden ze způsobů zaměřování na růst patogenních nebo oportunních bakterií spočívá v kontaktování vázaných bakterií se specifickým antimikrobiálním činidlem za přítomnosti faktoru začátku mikrobiální replikace. Aniž by platnost nějaké hypotézy měla omezující vliv na vynález, předpokládá se, že adherentní bakterie jsou resistantní vůči antimikrobiálním činidlům, zčásti díky nízké rychlosti růstu (Gustina et al., *Biomaterials*, 8: 423 (1987) a Brown et al., *Antimicrobial Chemotherapy* 22: 777 (1988)). Je známo, že rychlost růstu je hlavním modulátorem antibiotického účinku. Zaměření na patogenní bakterie lze přednostně provést kontaktováním těchto bakterií s antimikrobiálním činidlem, které je specifické pro tento typ patogenních nebo oportunních bakterií a faktorem začátku mikrobiální replikace, jak je to popsáno výše. Aniž by platnost nějaké hypotézy měla omezující vliv na vynález, předpokládá se, že stimulace aktivního růstu se projeví zvýšením počtu patogenních nebo oportunních bakterií, které budou susceptibilní vůči antimikrobiálnímu činidlu. Antimikrobiální činidla, která jsou specifická pro patogeny a oportunní bakterie, jsou odborníkům v tomto oboru dobře známa a jsou například popsána v *Internal Medicine*, 4. vydání, šéfredaktor Stein, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, USA nebo Wilson et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12. vydání, díl 1, Eds., McGraw-Hill, Inc., New York, NY, USA.

Alternativně může nastat situace, při níž není nutno brát v úvahu přítomnost benigních bakterií nebo nor-

mální flóry při volbě antimikrobiálního činidla, poněvadž určité chráněné oblasti těla jsou považovány za sterilní, tj. obvykle nejsou kontaminovány bakteriemi. Tyto chráněné oblasti těla zahrnují vnitřek oka, perikardiální vak, včetně srdce, vnitřních orgánů, kostí a svalů a mozek. Při potlačování patogenních nebo oportunních infekcí v těchto chráněných oblastech těla se může podávat antimikrobiální činidlo se širokým spektrem účinnosti spolu s faktorem začátku mikrobiální replikace.

Způsoby podle vynálezu zahrnují také způsob předvídání, kdy budou bakterie vázané k povrchu vykazovat aktivní růst. Při tomto způsobu se stanoví hustota, při níž dojde ke zvýšení poměru rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci na hodnotu přibližně v rozmezí od $5 \times 10^{-4} : 1$ do $20 \times 10^{-2} : 1$. Povzbuzení či stimulace aktivně rostoucích buněk v dané populaci bakterií je závislé na hustotě. Jakmile se stanoví tato hustota, může se předvídat, kdy bude populace vázaných bakterií vykazovat aktivní růst. Může se provést srovnání s poměrem počtu aktivně rostoucích buněk k počtu životaschopných buněk v populacích ošetřených různými činidly, jako jsou faktory mikrobiální replikace.

Stanovení hustoty populace životaschopných bakterií vázaných k povrchu je možno provést řadou různých metod. Tak například je možno bakterie odstranit z povrchu, vhodným způsobem zředit a umístit na vhodné médium, provést inkubaci a spočítat vzniklé kolonie, jak je to obvyklé. Odborníci v tomto oboru znají i alternativní způsoby stanovení hustoty populace. Takové způsoby umožňují v současné době velmi přesně stanovit hustotu populace životaschopných bakterií v dentálním plaku.

Při způsobu stanovení obsahu aktivně rostoucích buněk v dané populaci se alikvot či vzorek, který je souběžně podroben také zjišťování počtu životaschopných bakterií na určité ploše, uvede do styku se značeným nukleosidem. Kontaktní doba bývá obvykle kratší než je minimální doba dělení buněk. Při inkubaci bakterií za přítomnosti značeného nukleosidu dojde k zavedení značky do DNA (a/nebo RNA) těch životaschopných buněk, které aktivně rostou. Množství zavedeného značeného nukleotidu lze potom použít pro stanovení počtu či množství aktivně rostoucích bakterií ve srovnání s počtem či množstvím životaschopných bakterií ve vzorku. Hodnoty poměru aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím je možno vzájemně srovnávat mezi vzorky s různou povrchovou hustotou životaschopných buněk.

Značený nukleotid je možno volit z vhodných derivátů purinu a pyrimidinu, které byly modifikovány tak, aby obsahovat vhodnou značku. Vhodné značky zahrnují radioaktivní ligandy, barviva a jiné značky, které jsou odborníkům v tomto oboru známy. Přednostním značeným nukleotidem je směs [methyl-³H]-thymidinu a [¹⁴C]-adeninu.

Zavádění (inkorporace) značeného nukleotidu, [methyl-³H]-thymidinu, do životaschopných bakterií je ilustrováno na obr. 1. V provedení znázorněném na tomto obrázku se počet aktivně rostoucích bakterií výrazně zvýší, když se hustota životaschopných bakterií přiblíží hodnotě v rozmezí od 2 500 000 do 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm². Při hodnotách hustoty, které jsou nižší než 630 000 ($10^{5,8}$) bakterií/mm² nebo vyšší než 6 300 000 ($10^{6,8}$) bakterií/mm², je hladina aktivně rostoucích bakterií nízká. Popis způsobů a technik používaných při generaci dat znázorněných na obr. 1A je uveden v příkladu 1.

Při jiném způsobu podle vynálezu je možno bakteriální růst na povrchu regulovat tak, že se populace bakterií udržuje na hodnotě hustoty nižší, než je hodnota odpovídající stimulaci poměru aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám. Adherenci k povrchu a/nebo růst bakterií na povrchu je možno stimulovat nebo inhibovat různým ošetřením povrchu. Inhibice adherence k povrchu a/nebo růstu na povrchu lze u bakterií dosáhnout tím, že se omezí kontakt s činidly podporujícími adherenci, jako jsou polypeptidy, glykoproteiny a uhlohydráty. Alternativně je možno růst bakterií na povrchu a/nebo adherenci bakterií k povrchu inhibovat potažením povrchu hydrofobní látkou, přednostně látkou, která poskytuje povrch se středním dynamickým styčným postupujícím úhlem v rozmezí od asi 60 do asi 130° a středním dynamickým styčným ustupujícím úhlem vyšším než asi 20°. Jako vhodné příklady takových sloučenin je možno uvést obchodně dostupné produkty, jako je dostavbový materiál SILUX (3M, St. Paul, MN, USA) a kompozitní materiál VISIO-DISPERS (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA) a činidla uvedená v US patentu č. 5 078 988, který byl vydán 7. ledna 1992.

Zavádění [methyl-³H]-thymidinu do aktivně rostoucích bakterií sejmutých z povrchu implantované skloviny hovězího dobytka je, jako příklad, graficky ilustrováno na obr. 2. Tyto implantáty byly in vivo oplachovány vodou (kolečka) a roztokem glukosy (trojúhelníčky) nebo roztokem sacharosy (čtverečky). Je známo, že sacharosa představuje činidlo povzbuzující adherenci. Když se hustota populace přiblížila hodnotě přibližně v rozmezí od 2 500 000 do 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm², dramaticky se zvýší počet aktivně rostoucích bakterií. Jak je to uvedeno na obr. 2, tato data ukazují, že nárůst počtu bakterií vykazujících rychlý růst je závislý na hustotě a nezávislý na vnějších faktorech, jako je přítomnosti sacharosy, glukosy nebo vody.

Činidla povzbuzující adhezenci mohou zkrátit dobu, za kterou se dosáhne této hustoty populace, ale významně neovlivňují hustotu, při níž je pozorováno zvýšení rozsahu rychlého růstu.

Jiný příklad je graficky ilustrován na obr. 4. Na tomto obrázku je ilustrováno zavádění [methyl-³H]-thymidinu do aktivně rostoucích bakterií sejmутých ze skloviny a dostavbových materiálů VISIO-DISPERS nebo SILUX, které jsou současně umístěny v ústech. VISIO-DISPERS a SILUX jsou materiály s hydrofobním povrchem. I v tomto případě platí, že jakmile se hustota populace přiblíží k hodnotě 2 500 000 až 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm², dramaticky se zvýší počet aktivně rostoucích bakterií. Jak je to uvedeno v příkladu 4, tato data ukazují, že zvýšení rozsahu rychlého růstu bakterií je nezávislé na povrchu a závisí na hustotě životaschopných bakterií. U hydrofobních povrchů však může být inhibována adherence bakterií a/nebo jejich růst prostřednictvím inhibice počtu bakterií přilnutých k povrchu, a to může mít za následek, že hustota populace zůstane pod hodnotou charakteristickou pro aktivní růst závislý na hustotě.

Při různých provedeních tohoto vynálezu se hustota populace patogenních nebo oportunních bakterií na povrchu reguluje tak, aby se udržela pod hodnotou hustoty, při níž je pozorován růst závislý na hustotě. Růst závislý na hustotě u bakterií o velikosti, která se blíží 1 až 2 μm, je pozorován, když je hustota populace přibližně v rozmezí od asi 400 000 ($10^{5,6}$) do asi 6 300 000 ($10^{6,8}$) bakterií/mm². Přednostní hustota populace leží v rozmezí od asi 2 500 000 do 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm². Aniž by platnost nějaké hypotézy měla omezující vliv na vynález, předpokládá se, že když se hustota bakteriální populace blíží k hodnotě, která je charakteristická pro růst závislý na hustotě, do-

cháží ke komunikaci mezi jednotlivými bakteriemi, které zahajují aktivní růst. Když se hustota bakteriální populace udržuje na hodnotě nižší než je hustota charakteristická pro růst závislý na hustotě, není předpoklad komunikace dostatečně naplněn, aby to umožnilo koordinovaný růst bakterií. Dokud se tedy hustota bakterií nepřiblíží hodnotě hustoty, která je charakteristická pro růst závislý na hustotě, jsou škodlivé účinky patogenních nebo oportunních bakterií způsobené jejich růstem nebo metabolickými činidly nevýznamné, nebo se jejich intenzita udržuje omezena na přijatelnou úroveň.

Faktor mikrobiální replikace (SMR)

Do rozsahu tohoto vynálezu spadá faktor mikrobiální replikace označovaný též názvem faktor začátku mikrobiální replikace (SMR), způsoby získávání faktoru SMR a způsoby regulace aktivního růstu bakterií za použití faktoru SMR nebo jeho derivátů. Faktor SMR iniciuje či zahajuje procesy aktivního růstu nebo replikace bakterií. Důležité je, že faktor SMR iniciuje či zahajuje procesy aktivního růstu bakterií i v tom případě, že je hustota populace bakterií nižší než hustota, která je spojována se stimulací aktivního růstu buněk *in vivo*.

Při měření účinku faktoru SMR u populace bakteriálních buněk vázané k povrchu je pozorováno zvýšení poměru rostoucích buněk k životaschopným buňkám ve srovnání s poměrem rostoucích buněk k životaschopným buňkám v případě kontrolní neošetřené populace bakterií. Poměr rostoucích buněk k životaschopným buňkám leží přibližně v rozmezí od $5 \times 10^{-4} : 1$ do $20 \times 10^{-2} : 1$. Poměr rostoucích buněk k životaschopným buňkám je možno stanovit výše uvedenými způsoby. Účinek faktoru SMR se přednostně zjišťuje metodami popsány v příkladech 7 a 11.

Faktor SMR je možno izolovat v bakteriálním nebuněčném supernatantu získaném z aktivně rostoucích bakterií. Přednostně lze faktor SMR identifikovat v extracelulární matrici obklopující *Sanguis streptococci*. Obzvláštní přednost se dává bakterii *S. gordonii* kmene Challis (přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105). Faktor SMR může být také produkován jinými streptokokovými kmeny, jako je *Streptococcus gordonii* kmen 12 a *Streptococcus gordonii* Blackburn, jakož i *Escherichia coli* kmen 149, přírůstkové číslo ATCC 55535. Kmen *Escherichia coli* 149 byl uložen ve sbírce ATCC, Rockville, MD, USA 7. ledna 1994 a obdržel přírůstkové číslo 55535.

Faktor SMR je možno izolovat z buněk následujícím způsobem. Buňky *Sanguis streptococci* nebo *E. coli* se inkubují v pufrovaném médiu. Pro výrobu faktoru SMR se hodí jak suspenzní, tak agarové kultury těchto bakterií. Během kultivace buněk se shromažďuje extracelulární látka obklopující bakterie. Když se tato extracelulární látka uvede do styku s bakteriemi při zkoušce in vitro, může se faktor SMR v této látce stanovit změřením nárůstu buněčných složek spojených s růstem, vztaženo na buňku nebo jednotku času. Aktivita faktoru SMR byla kromě toho také identifikována ve slinných extraktech odebraných dobrovolníkům, v jejichž orální dutině je přítomna přírodní bakteriální populace.

Faktor SMR je možno izolovat z kultur gram-pozitivních a gram-negativních buněk. Izolovaný faktor SMR má molekulovou hmotnost nižší než 3 000 (při měření filtrací přes membránu s určitou vylučovací mezí molekulové hmotnosti (size exclusion membrane filtration). Izolovaný faktor začátku mikrobiální replikace (SMR) (ať již je získán z kultur gram-pozitivních nebo gram-negativních buněk) může stimulovat mikrobiální růst gram-pozitivních nebo gram-negativních kultur).

Aktivitu faktoru SMR je možno stanovit několika způsoby. Při jednom z nich se populace bakterií uvede do styku s faktorem začátku mikrobiální replikace, přednostně na dobu postačující pro iniciace procesů mikrobiálního růstu. Stimulace mikrobiálního růstu se stanoví na základě porovnání mikrobiálního růstu v ošetřené populaci s mikrobiálním růstem v neošetřené populaci bakterií. Tohoto způsobu je také možno použít pro stanovení účinného množství faktoru SMR pro stimulaci nárůstu poměru aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci, přednostně na hodnotu, která leží přibližně v rozmezí od $5 \times 10^{-4} : 1$ do $20 \times 10^{-2} : 1$.

Při alternativní metodě se pro stanovení faktoru SMR použije bakteriálního kmene obsahujícího bakteriální reporterový gen pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk, jak je to uvedeno v tomto popisu. Bakteriální kmen, jako je *S. gordonii* MSP812, přírůstkové číslo ATCC 69528, se uvede do styku s faktorem SMR na dobu postačující pro iniciaci procesů mikrobiálního růstu. Zvýšení podílu aktivně rostoucích buněk je možno měřit zavedením [methyl- ^3H]-thymidinu do DNA. Alternativně se může zvýšení počtu aktivně rostoucích buněk měřit detekcí zvýšení množství bakteriálního reporterového genového produktu, vztaženého na buňku za jednotku času, po expozici faktoru SMR, ve srovnání s množstvím bakteriálního reporterového genového produktu, vztaženého na buňku za jednotku času u kontrolních neošetřených buněk.

Způsoby použití faktorů SMR

Faktorů SMR se může používat při způsobech inhibice nebo stimulace růstu bakterií. Také je možno identifikovat činidla, která inhibují nebo stimulují účinek faktorů SMR. Činidla, která inhibují SMR, mohou předsta-

vovat nové terapeuticky využitelné antimikrobiální sloučeniny, kterých by bylo možno používat při léčbě nežádoucích bakteriálních infekcí.

V mnoha případech je možno použít faktorů SMR pro stimulaci růstu bakterií. Při průmyslových procesech se používá mnoho typů bakterií. Přídavkem faktoru SMR by bylo možno zvýšit výtěžek bakterií nebo účinnost jejich růstu. Kromě toho by bylo možno přidávat faktor SMR k růstovým médiím, zejména médiím používaným při diagnostice bakteriálních infekcí. Prostřednictvím stimulace mikrobiálního růstu v médiích by bylo možno provést časnější diagnosu infekce. Je možno uvést mnoho dalších příkladů, při nichž by byla stimulace nebo zvýšení mikrobiálního růstu prospěšná.

Do rozsahu vynálezu spadá také způsob stimulace mikrobiálního růstu. Tento způsob zahrnuje stupeň, v němž se mikrobiální populace uvede do styku s faktorem SMR v množství účinném pro stimulaci růstu buněk, tj. pro zvýšení poměru aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám k dané populaci. Účinné množství faktoru SMR pro konkrétní bakterii je možno stanovit pomocí standardního zkoušky závislosti odpovědi na dávce (vhodná metoda je popsána v příkladu 7). Za účinné množství faktoru SMR je možno považovat množství umožňující poskytnout poměr rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci $20 \times 10^{-2} : 1$.

Faktor SMR se může uvést do styku s vázanými bakteriemi nebo bakteriemi pěstovanými v kapalně kultuře. Faktor SMR může být ponechán v kultivačním médiu a může se čas od času přidávat tak, jak se vyčerpávají složky média, nebo pokud se bakterie pěstují kontinuálním způsobem kultivace.

Do rozsahu vynálezu spadá také způsob identifikace činidel inhibujících nebo stimulujících faktor SMR. Tento způsob zahrnuje stupeň, v němž se populace bakterií uvede do styku s faktorem SMR a činidlem, jehož inhibiční nebo stimulační účinnost na faktor SMR je zkoumána, za vzniku ošetřené populace. Tato populace se inkubuje po dobu postačující pro detekci iniciace mikrobiálního růstu. Poměr aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v ošetřené populaci se srovná s tímž poměrem v populaci, která byla ošetřena samotným faktorem SMR. Zvýšení tohoto poměru může ukazovat, že zkoušené činidlo představuje další faktor mikrobiálního růstu. Snížení tohoto poměru může ukazovat, že by toto činidlo mohlo být užitečné jak antibakteriální činidlo.

Genetické kazety

Předmětem vynálezu je také genetická kazeta obsahující první sekvenci DNA, která kóduje bakteriální reporterový gen vázaný k 3' konci druhé sekvence DNA. Druhá sekvence DNA se hybridizuje s genem nebo jeho částí, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky. Tento gen je umístěn v bakteriálním chromosomu. Druhá sekvence DNA v této kazetě zajišťuje rekombinaci a integraci genetické kazety nebo její části do bakteriálního chromosomu. Integrace kazety do bakteriálního chromosomu zajišťuje expresi bakteriálního reporterového genového produktu pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk.

Bakteriální reporterový genový produkt je polypeptid, jehož strukturní a funkční vlastnosti je možno měřit. V případě vynálezu slouží bakteriální reporterový genový produkt pro identifikaci buněk, které aktivně rostou. Tak například, pokud je bakteriální reporterový genový

produkt tvořen enzymem, je možno expresi bakteriálního reporterového genového produktu detegovat měřením aktivity enzymu. Alternativně je možno bakteriální reporterový genový produkt stanovit na základě změny vlastností buňky, jako je barva kolonie. Bakteriální reporterový genový produkt přednostně není přítomen v hostitelské buňce, do níž se bakteriální reporterový genový produkt integruje. Kromě toho je bakteriální reporterový genový produkt přednostně netoxický vůči bakteriálním hostitelským buňkám.

Jako vhodné enzymy, které mohou tvořit bakteriální reporterový genový produkt je možno uvést amylasu, β -galaktosidasu, chloramfenikol-acetyl transferasu a luciferasu. Jako přednostní bakteriální reporterový genový produkt pro kmen *S. gordonii* Challis ATCC č. 35105 je možno uvést amylasu, poněvadž tento kmen neobsahuje endogenní amylasovou aktivitu.

Sekvence DNA kódující bakteriální reporterové geny je možno získat standardními metodami, které jsou například popsány v Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience (1987). Sekvence DNA kódující specifické reporterové geny jsou obchodně dostupné v plasmidech nebo je možno je získat publikovanými metodami. Tak například sekvence DNA kódující bakteriální amylasu byla získána v plasmidu označeném šifrou pRQ200 od dr. Rona Yasbina z Marylandské university v Baltimore, Maryland, USA. Tento plasmid byl sestrojen způsobem popsaným v Lane et al., Gene, 100: 225 až 229 (1991). Sekvence DNA kódující bakteriální reporterový genový produkt nejsou přednostně přítomny v genomu bakteriální hostitelské buňky, a proto se přednostně jedná o heterologické sekvence DNA získané z jiných druhů nebo rodů bakterií.

Sekvence DNA kódující bakteriální reporterový gen je možno amplifikovat za použití vhodných primerů pomocí polymerasové reakce (PCR) nebo subklonováním do plasmidu, který lze amplifikovat v bakteriální buňce. Po amplifikaci je možno sekvenci DNA kódující bakteriální reporterový gen spojit s druhou sekvencí DNA, jež se hybridizuje s genem nebo částí genu, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky, za vzniku expresní kazety. První sekvence DNA se spojuje s druhou sekvencí DNA tak, aby integrace první sekvence DNA do bakteriálního chromosomu proběhla s vhodnou orientací pro expresi. 5' konec první sekvence DNA se spojuje s 3' koncem druhé sekvence DNA. Spojení první sekvence DNA s druhou sekvencí DNA je možno provést způsoby známými v tomto oboru, jako například způsobem popsáním v příkladu 10.

Genetická kazeta podle vynálezu také zahrnuje druhou sekvenci DNA, která je připojena k první sekvenci DNA. Druhá sekvence DNA se hybridizuje ke genu nebo jeho části, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky a který je umístěn v bakteriálním chromosomu. Úlohou druhé sekvence DNA je zajišťovat rekombinaci a integraci genetické kazety nebo její části do bakteriálního chromozomu. Bakteriální buňky přednostně obsahují genetickou kazetu integrovanou do chromosomu v místě, které je pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky. Druhá sekvence DNA může být zvolena tak, aby zaměřovala integraci genetické kazety nebo její části na specifické místo v chromozomu. Volba se provádí na základě hybridizace druhé sekvence DNA ke genu nebo k jeho části, o jehož expresi je známo, že je koordinovaně regulována růstem buňky. Přitom je 5' konec první sekvence DNA, kódující bakteriální reporterový gen, připojen k 3' konci druhé sekvence DNA.

Druhá sekvence DNA se hybridizuje ke genu nebo jeho části, o jehož expresi je známo, že je koordinovaně regulována růstem buňky, nebo k neuspořádané sekvenci DNA v bakteriálním chromosomu zvoleného kmene bakterií. Přednostní bakteriální kmeny zahrnují streptokokové kmeny, jako je *S. gordonii* Challis přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105. Geny, o jejichž expresi je známo, že je koordinovaně regulována zvoleným bakteriálním kmenem, jsou známy odborníkům v tomto oboru. Jedná se například o geny ribosomální RNA a geny kódující ribosomální proteiny. Tyto geny jsou přednostně také přítomny v několika kopiích v bakteriálním chromosomu, aby integrace genetické kazety nebo její části do genu nenarušila základní funkci bakterie a/nebo nezpůsobila úhyn transformovaných buněk. Sekvence DNA genů nebo částí genu, jejich exprese je koordinovaně regulována růstem buněk nebo sekvence DNA neuspořádaných segmentů bakteriálního chromosomu zvoleného bakteriálního kmene je možno určit za použití vědeckých publikací nebo na základě rešerše v databázi genetických sekvencí, jako je databáze Genbank, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA nebo databáze RNA, University of Illinois/Champaign/Urbana, Champaign, Illinois, USA.

Druhá sekvence DNA by měla být v dostatečné míře totožná s komplementárním řetězcem části genu nebo neuspořádaného segmentu bakteriálního chromosomu, aby mohla proběhnout rekombinace a integrace celé genetické kazety nebo její části do genu nebo do neuspořádaného místa bakteriálního chromosomu. Dostatečná míra totožnosti DNA pro rekombinaci a integraci je dána 80 až 100 % totožností asi 100 až 5 000 nukleotidů průběžné sekvence DNA s komplementárním řetězcem části zvoleného genu nebo neuspořádané sekvence DNA bakteriálního chromosomu. Přednostně vykazuje druhá sekvence DNA dostačující podobnost s komplementárním řetězcem genu nebo jeho části, aby došlo k integraci s dostatečně vysokou

četností, že lze snadno detegovat produkty této integrace (integranty). Taková četnost leží přednostně v rozmezí od asi 10^{-6} do asi 10^{-8} .

Přednostní částí genu je vnitřní fragment streptokokového genu 16S rRNA, který je popsán v příkladu 10. Druhá sekvence DNA také přednostně obsahuje přídavné sekvence DNA o délce asi 4 až 8 nukleotidů na obou koncích. Tyto sekvence zajišťují místa pro štěpení restriční endonukleasou. Sekvence míst pro štěpení restriční endonukleasou je známa odborníkům v tomto oboru. Jednotlivé sekvence na koncích, které jsou rozpoznatelné restriční endonukleasou, mohou být stejné nebo odlišné. Tyto sekvence umožňují odborníkovi zvolit vhodná restriční místa pro klonování do zvoleného místa vektoru, aby se zajistilo, že první sekvence DNA bude připojena k 3' konci druhé sekvence DNA.

Zvolenou druhou sekvencí DNA je možno připravit jakýmkoliv známým způsobem. Tak například je možno vyrobit primery, které jsou komplementární k částem druhé sekvence DNA (tento způsob je popsán v příkladu 10) a těchto primerů se pak může použít pro amplifikaci chromosomální sekvence DNA kódující gen nebo jeho část, jehož exprese je koordinovaně regulována rychlostí růstu buňky. Přitom se může použít polymerasové řetězové reakce (PCR). Alternativně se mohou části zvoleného genu subklonovat standardními metodami, jako za použití štěpení restriční endonukleasou a ligace do vektoru, který lze amplifikovat. Zvolené sekvence neuspořádané DNA je možno syntetizovat automatizovaným způsobem syntézy DNA a jejich amplifikace se může provést pomocí PCR nebo subklonování.

Próba DNA nebo primer pro PCR má délku asi 15 až 50 nukleotidů a sekvenci, která je komplementární ke genu nebo části genu nebo neuspořádanému segmentu v bakteriálním chro-

mosomu. Primer nebo próbu je možno vyrobit automatizovaným způsobem syntézy DNA. Jako příklady takových primerů je možno uvést primery, které jsou komplementární k sekvenci DNA kódující 16S ribosomální RNA v streptokokových kmenech, jak je to uvedeno v příkladu 10. Jiné primery nebo próby je možno zkonstruovat na základě zkoušení sekvence DNA části genu nebo neuspořádané sekvence DNA. Přednostně se primery a/nebo próby navrhuje tak, aby byly komplementární k části genu, jehož sekvence DNA je konzervována v jiných kmenech bakterií. Tak například primery, které jsou komplementární k části ribosomální RNA sekvence byly zvoleny na základě srovnání sekvence několika 16S rRNA genů, v nichž byly identifikovány konzervované oblasti sekvence DNA. Konzervovaná oblast sekvence DNA přednostně vykazuje totožnost asi z 90 až 100%.

Genetická kazeta obsahuje dále selektovatelný markerový gen. Selektovatelný markerový gen se připojuje k první a druhé sekvenci DNA obvykle subklonováním těchto sekvencí do vektoru nesoucího selektovatelný markerový gen. Selektovatelnými markerovými geny jsou přednostně geny resistance vůči antibiotikům a takové geny jsou dostupné v mnoha obchodně dostupných vektorech.

Po volbě a získání druhé sekvence DNA se tato druhá sekvence DNA spojí s první sekvencí DNA tak, aby byl 5' konec první sekvence DNA připojen ke 3' konci druhé sekvence DNA. Takového spojení sekvencí DNA se může dosáhnout standardními metodami subklonování do vektoru, jako je plasmid. Druhou sekvencí DNA je možno vyrobit tak, že na obou koncích obsahuje místa rozpoznatelná zvolenou restriční endonukleasou, čímž se usnadní klonování do plasmidu. První sekvence DNA kódující reporterový gen již může být v plasmidu přítomna nebo je možno ji subklonovat za druhou sekvenci DNA.

Jako vektory, které se hodí pro účely tohoto vynálezu, je možno uvést vektory, jichž lze použít pro zavádění genetické kazety do bakteriálních buněk a pro zajištění rekombinace a integrace genetické kazety nebo její části do bakteriálního chromosomu. Vhodné vektory zahrnují plasmidy a viry. Plasmidy se volí tak, aby nedocházelo k jejich replikaci ve zvolené bakteriální hostitelské buňce a aby tak byla favorizována integrace genetické kazety. Mnohé vektory jsou obchodně dostupné nebo je lze zkonstruovat publikovanými metodami. Vektor přednostně obsahuje selektovatelný markerový gen. Přednostním plasmidem je plasmid pRQ200, který je popsán v příkladu 10.

Kmeny bakterií obsahující stabilně integrovanou genetickou kazetu

Po vytvoření genetické kazety způsobem podle vynálezu se tato kazeta zavádí do hostitelské buňky. Přednostně se jako hostitelské buňky používá streptokokového kmene. Vhodnými hostitelskými buňkami mohou však být i jiné bakterie. Genetická kazeta se do buňky přednostně zavádí ve formě vektoru. Jako vektor se přednostně volí takový vektor, který se nereplikuje v bakteriální hostitelské buňce, aby byla favorizována integrace genetické kazety.

Genetickou kazetu je možno zavádět do hostitelské bakteriální buňky standardními metodami, jako je metoda s použitím srážení fosforečnanu vápenatého a elektroporace. Pokud jsou bakteriální buňky kompetentní pro transformaci (jako je tomu v případě kmene *Streptococcus gordonii* Challis, přírůstkové číslo ATCC 35105), může se DNA přímo smíchat s buňkami. Po zavedení genetické kazety do buněk bakteriálního hostitele se provede selekce na transformované buňky.

Selekce na transformované buňky se může nejprve provést prostřednictvím selekce na přítomnost selektovatelného markerového genu, který je obsažen v transformačním vektoru. Pokud se vektor v hostitelské buňce nereplikuje, obsahují transformované buňky nesoucí selektovatelný markerový gen celé množství nebo část vektoru integrovaného do chromosomu. Mechanismus rekombinace u mnohých bakterií je odborníkům v tomto oboru znám. Rekombinace může probíhat jako jediný nebo dvojnásobný pochod crossover, takže množství vektoru integrovaného do chromosomu se může měnit. Transformované buňky minimálně obsahují integrovaný selektovatelný markerový gen a funkční bakteriální reporterový gen. Transformované buňky také přednostně obsahují selektovatelný markerový gen.

U transformovaných buněk je možno provést screening na expresi produktu bakteriálního reporterového genu. Různá stanovení produktů bakteriálního reporterového genu jsou známa odborníkům v tomto oboru. U transformovaných buněk je dále možno provést selekci na expresi produktu bakteriálního reporterového genu koordinovaně regulovanou růstem buněk.

Expresi produktu reporterového genu v aktivně rostoucích transformovaných buňkách je možno měřit za přítomnosti nebo nepřítomnosti faktorů mikrobiálního růstu, přičemž se používá standardních metod. Koordinovaně regulovanou expresi produktu reporterového genu je možno stanovit měřením nárůstu produktu reporterového genu, vztaženého na jednu buňku a jednotku času, za přítomnosti nebo nepřítomnosti faktorů mikrobiálního růstu.

Specifické příklady selekčních metod a bakteriálních kmenů jsou uvedeny v příkladech 10 a 11. Z 20 transformantů byly vybrány dva pro další charakterizaci. U jednoho kmene bylo prokázáno, že produkuje faktor mikrobiální

replikace. Tímto kmenem je *Streptococcus gordonii* Challis MSP812. Kmen *Streptococcus gordonii* Challis MSP812 byl uložen ve sbírce ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 6. ledna 1994 a obdržel přírůstkové číslo 69 528. Jiným kmenem produkujícím více amylasy za jednotku času v aktivně rostoucích buňkách je *Streptococcus gordonii* Challis B2B MSP818. Kmen *Streptococcus gordonii* Challis B2B MSP818 byl uložen ve sbírce ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 6. ledna 1994 a obdržel přírůstkové číslo 69 529.

Způsoby měření mikrobiálního růstu

Bakteriálních kmenů, které obsahují stabilně integrovanou expresní kazetu, jež je pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky, je možno použít pro měření mikrobiálního růstu. Mikrobiální růst je možno stimulovat zaočkováním média splňujícího všechny požadavky na růst konkrétně zvoleného bakteriálního kmene buňkami tohoto bakteriálního kmene. Média a podmínky růstu, které jsou vhodné pro různé kmeny bakterií, jsou známy odborníkům v tomto oboru. Růst populace je možno monitorovat měřením množství reporterového genu produkovaného za jednotku času.

Alternativně se může kmenů bakterií používat pro měření aktivity faktoru začátku mikrobiální replikace (tento způsob je ilustrován v příkladu 11). Kmeny bakterií se uvedou do styku s faktorem začátku mikrobiální replikace a inkubují v jeho přítomnosti po dobu, která růstovému faktoru postačuje pro stimulaci zvýšení poměru aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci. Je možno měřit zvýšení obsahu produktu bakteriálního reporterového genu v populaci bakterií, vztažené na jednotku času, v

odpovědi na faktor začátku mikrobiální replikace ve srovnání s neošetřenou populací bakterií.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady, které obsahují specifická provedení tohoto vynálezu, mají výhradně ilustrativní charakter a v žádném směru neomezují rozsah připojených nároků.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Stanovení aktivně rostoucí populace na implantované zubní sklovině

Bakteriální kolonizace zubů v ústech 20 dospělých lidí je studována za použití modelu in vivo. Přitom je zkoumán plak u zdravých dospělých lidí, kteří pokračují v přijímání své normální stravy. [Kritéria, na základě kterých se zkušební osoby vybírají, zahrnují nepřítomnost systemické choroby, těhotenství nebo značný rozsah dostaveb. Zkušební osoby jsou instruovány v tom smyslu, aby pokračovaly v normálních stravovacích návycích a návycích orální hygieny, ale aby vyloučily čištění kartáčkem připojených zkoušených materiálů (viz dále) a aby si nevyplachovaly ústa žádnou obchodně dostupnou ústní vodou.]

Kousky zubní skloviny hovězího skotu o ploše asi 10 mm² se přímo upevní k šesti kontralaterálním horním premolárům a prvním molárům (zuby č. 1.4, 1.5, 1.6, 2.4, 2.5 a 2.6) za použití obvyklých rámečků tak, aby bylo možno zavedenými metodami kousky skloviny snadno vložit a vyjmout. Použité kousky zubní skloviny a konstrukce rámečků pro zkoušky in vivo jsou podrobně popsány dále. Kousky zubní skloviny,

kterými se pokryje u každé zkušební osoby 6 zubů, se ponechají v ústech zkušebních osob různou dobu, aby se na nich nahromadil dentální plak. Potom se (po 2, 4, 8 nebo 24 hodinách) kousky zubní skloviny pokryté bakteriálním plakem z úst vyjmou a stanoví se na nich složení životaschopné mikrobiální populace, tj. celkový počet životaschopných bakterií a podíl aktivně rostoucí populace za použití způsobů podrobně popsanych dále.

Získaná data poskytují informaci o počtu životaschopných buněk, složení druhů mikrobů v populaci životaschopných buněk a podílu této populace, který aktivně roste. Kolonizace implantovaných povrchů či tvorba biofilmu, je definována jako specifická adherence + dělení buněk. Mechanismy, o nichž se předpokládá, že jsou významné pro bakteriální biomasu vzniklého plaku, zahrnují

- 1) adherenci indigenních bakterií ke specifickým receptorům na pelikulárních površích zubní skloviny;

- 2) koagregaci nebo adherenci mezi bakteriemi, které již k zubní sklovině přilnuly (předběžný plak) a jinými indigenními bakteriemi (interbakteriální adherence či koagregace) a

- 3) růst či dělení buněk přirozeným způsobem přilnutých bakterií. Pouze první z výše uvedených mechanismů je přímo studován in vivo.

Na základě dat získaných z těchto studií je možno vyhodnotit přírodní adherenci dvěma způsoby. Střední počet životaschopných bakterií na mm^2 byl publikován v práci Liljemark et al., Oral Micro. & Immun. 8:5-15 (1993). Po 4 hodinách v ústech se zjistí asi 1 až 2 miliony životaschopných buněk na 1 mm^2 . Druhá metoda vyhodnocování příspěvku adherence ke vzniku biomasy plaku je ilustrována na obr. 1B. Zkoušením každého zubního místa u 18 zkušebních osob je

možno dospět k hodnotám nasycení vazebných míst na pelikulárních površích. Výše uvedená grafická reprezentace ukazuje, že pelikulární místa jsou nasycena životaschopnými buňkami v počtu 200 000 až 630 000 ($10^{5,3}$ až $10^{5,8}$) na 1 mm^2 . To odpovídá in vitro měřením dostupných slinných vazebných míst pro orální streptokoky.

Na základě dat z podobných studií byla měřena in vivo rychlost interbakteriální adherence tak, že byly do úst vloženy implantáty zubní skloviny pokryté souvislým povlakem streptokoků (což je kmen, o němž je známo, že obsahuje většinu známých koagregačních povrchových adhesinů způsobujících in vitro mezidruhovú bakteriální shlukování v pufru) (Skopek et al., Oral Micro. and Immun., 8:16-23 (1993)). Podobně byla měřena in vivo rychlost adherence k implantátům (Liljemark et al., výše uvedená citace).

Z informace, že za 24 hodin je biomasa plaku tvořena asi 33 miliony bakterií/ mm^2 , je zřejmé, že dělení buněk představuje hlavní příspěvek ke tvorbě biomasy plaku první den tvorby plaku. Adherence odpovídající nasycení specifických míst na pelikulárních površích se po 24 hodinách podílí na biomase plaku pouze z 1,5 %. Adherence k zubní sklovině nebo interbakteriální adherence se po 24 hodinách v ústech podílí na biomase plaku z 10 až 20 %.

Tato měření akumulace indigenních bakterií nepředstavují měření, zda se bakterie v plaku skutečně dělí. Růst bakterií může být studován a je zřejmý, když se graficky znázorní vztah mezi aktivně rostoucím podílem populace plaku a hustotou životaschopných buněk v jednotlivých místech (viz obr. 1A). Při hustotě, která se přibližuje hodnotě 2 500 000 do 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/ mm^2 , bez ohledu na to, za jakou dobu se této hustoty dosáhne, dojde k podstatnému nárůstu počtu aktivně rostoucích buněk. Z tohoto velkého

zvýšení počtu aktivně rostoucích bakteriálních buněk při výše uvedené hustotě populace vyplývá, že přilnuté bakterie se nedělí nebo nerostou pomalu, nýbrž vstupují do období rychlého růstu.

Pro úpravu vhodných kousků skloviny a pro upevnění implantátů zubní skloviny do rámečků in vivo se použije následujícího způsobu. Kousky skloviny z extrahovaných zubů hovězího skotu se rozřežou na čtverečky o rozměrech asi 3 x 3 x 1 mm, jehož stěny se rozbíhají v úhlu 45°C. Jednotlivé kousky se proměří pomocí digitálního měřidla SHERE-TUMICA (Shere-Tumica, St. James, MN, USA) a skladují se v destilované vodě o teplotě 4°C až do doby použití. Běžné rámečky se zhotoví na sádrovém modelu alginátového otisku maxilárního oblouku každé zkušební osoby. Kousky zubní skloviny se vtlačí do zformované kuličky z kompozitu VISIO-FIL (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA), která byla nanesena na faciální povrch maxilárního premolárního a molárního zubu. Kompozit je rozprostřen tak, aby byl hladký a souvisle pokrýval sklovinu zubu, přičemž ukládaný kousek zubní skloviny se do kompozitu uloží tak, aby byl obnažen jen jeho povrch. Do vzniklých rámečků se vyjímately umístí kousky zubní skloviny za použití špičky ostrého nástroje na vyšetřování zubů (exploreru) prostřednictvím malého vrubu vytvořeného při výrobě rámečku. Kousky zubní skloviny jsou těsně upevněny v rámečcích, což zabraňuje tvorbě plaku jinde, než na obnaženém povrchu. Vzniklé rámečky se potom připevní k příslušným zubům pomocí lepicího systému CONCISE orthodontics bonding system (3M, St. Paul, MN, USA).

Pro měření mikrobiálního složení a celkového počtu životaschopných buněk se použije následujících metod. Kousky zubní skloviny se umístí do 1,0 ml předredukovaného anaerobně sterilizovaného (PRAS) ředidla (L. V. Holdman a W. E. C. Moore, Eds. Anaerobic Laboratory Manual, Virginia Polytech-

nic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA, 124-127, 1973) v anaerobní komoře (Coy Anaerobic Chamber, Ann Arbor, MI, USA) a podrobí se 20sekundové sonikaci za mírných podmínek (Kontes Cell Disruptor, Kontes, Vineland, NJ, USA). Alikvot vzorku plaku se sériově zředí a zředěné vzorky se nanesou na médium v miskách (Spiral Systems, Inc. Cincinnati, OH, USA). Kultivace různých druhů bakterií se provádí na různých elektivních a selektivních médiích. Kultivovatelná anaerobní mikrobiální flóra, celkem, se stanoví za použití doplněného krevního agaru (SBA), média obsahujícího tryptikasový sojový agar (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA), 5% defibrinované ovčí krve, 0,00005% menadionu, 0,0005% heminu a 0,001% NAD (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) a inkubuje se za anaerobních podmínek 7 dnů při teplotě 37°C. Na médiu SBA se zjistí tmavě zbarvené anaerobní tyčinky zahrnující druhy *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* a *Prevotella melaninogenica*. *Fusobacterium* spp. se na médiu SBA identifikují jako kulaté neporušené hladké iridescentní kolonie. *Streptococcus* spp. se stanoví na agaru *Mitis salivarius* (MS) (Difco Labs., Detroit, MI, USA) s 0,1% telluričitanem draselným (Difco Labs., Detroit, MI, USA). Tyto misky se inkubují za anaerobních podmínek v atmosféře obsahující 10 % vodíku, 10 % oxidu uhličitého a 80 % dusíku 2 dny při 30°C a potom 24 hodin za aerobních podmínek při teplotě místnosti. Adherentní tvrdé kolonie zahrnující druhy *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii* a *Streptococcus oralis*, které jsou označovány jako streptokoky *sanguis*, se identifikují vizuálně známým způsobem za použití stereomikroskopu a nepřímého osvětlení na základě morfologie kolonií. Streptokoky *mitis* jsou kulaté, hladké a krémovité a zahrnují druhy *Streptococcus mitis* a neadherentní kolonie *Streptococcus oralis*.

Streptokoky mutans se identifikují na agaru MS a na médiu MS-bacitracin dobře známými metodami. Zjištěné počty kolonií streptokoků *mutans* jsou nejvyšší na obou použitých médiích. *Veillonella* spp. se identifikují na modifikovaném médiu Rogosa-SL agar (Difco Labs., Detroit, MI, USA) na základě morfologie kolonií a Gramova barvení. *Haemophilus* spp. se identifikují na modifikovaném čokoládovém agaru (MC) po inkubaci v 10% oxidu uhličitém 3 dny při 37°C pomocí známých metod (Liljemark et al., Infect Immun. 46: 778, 1984). *Actinomyces* spp. se identifikují na agaru CFAT (Zylber and Jordan, J. Clin. Microbiology, 15: 253-259, 1982). Reprezentativní typy kolonií od každého subjektu se nejprve zkoušejí pomocí reakce na katalasu. Potom se tyto kmeny nechají reagovat s antiséry (které laskavě poskytl dr. George Bowden z Winnipegské university, Winnipeg, Kanada). Za použití tohoto systému byly *Actinomyces* spp. identifikovány jako *Actinomyces viscosus* (který se podobá *Actinomyces naeslundii* II), *Actinomyces naeslundii* I a *Actinomyces odontolyticus*. Vypočítá se celková kultivovatelná anaerobní mikrobiální flóra (životaschopné buňky a celkový počet jednotek tvořících kolonie u různých druhů na 1 mm² povrchu).

Skutečný počet aktivně rostoucích bakterií na pelikulárním povrchu se stanoví za použití zavedení (inkorporace) radioisotopem značeného [methyl-³H]-thymidinu a [¹⁴C]-adeninu. Přitom se postupuje tak, že se vzorky plaku 30 minut inkubují a potom se z nich extrahují a spočítají radioizotopem značené cílové molekuly DNA a/nebo RNA. Vzhledem k tomu, že k syntéze DNA dochází v průběhu životního cyklu bakteriální populace, značí tyto nukleotidy všechny aktivně rostoucí buňky. Značení DNA je užitečné též z toho důvodu, že nezahrnuje reversi a že k syntéze nedochází u nerostoucích buněk. Pomocí výpočtu množství inkorporovaného [methyl-³H]-thymidinu a dělením této hodnoty celkovým

počtem životaschopných buněk se může zjistit hodnota počtu radioaktivních impulsů za minutu (cpm), vztaženo na bakterii a tento poměr bude odrážet změnu počtu aktivně rostoucích buněk, jakožto podíl z celkového počtu životaschopných buněk. Inkorporace radioizotopem značeného nukleotidu do látek nerozpustných v kyselině trichloroctové (TCA-nerozpustné látky) zajišťuje, že se měří skutečná syntéza DNA a nikoliv metabolismus radioizotopem značených nukleotidů. Použití krátké periody (ve srovnání s minimální dobou dělení buněk), použití nadbytku [methyl-³H]-thymidinu a [C¹⁴]-adeninu a opakované vzorkování v průběhu času takovým způsobem, že nedojde k narušení tvorby plaku jsou charakteristické znaky postupu, který představuje nový způsob stanovení rostoucí populace bakterií.

Měření aktivně rostoucí populace se provádí dále popsaným způsobem. Inkorporace [methyl-³H]-thymidinu a [C¹⁴]-adeninu do TCA-nerozpustných látek v bakteriálních placích získaných po výše uvedené době se provádí tak, že se alikvot sonikovaného plaku (0,3 ml) smíchá s 0,1 ml směsi [methyl-³H]-thymidinu (14 000 mCi/mmol, Research Products International Corp., Mt. Prospect, IL., USA) a [C¹⁴]-adeninu (270 mCi/mmol, Amersham Research Products, Arlington Heights, IL, USA). Konečná koncentrace nukleosidů po smíchání se vzorky plaku je 150 mCi/ml (100 až 200 nmol) [methyl-³H]-thymidinu a 65 mCi/ml (200 až 250 nmol) [C¹⁴]-adeninu. Plak se smíchá s radioizotopem značenými nukleosidy v anaerobní komoře a inkubace se provádí tamtéž po dobu 30 minut. Potom se vzorky radioizotopem značeného plaku vyjmou z komory a inkubace se přeruší přidávkem 2,0 ml chladné (4°C) kyseliny trichloroctové o koncentraci 100 g/litr. Následuje 30minutová extrakce při 4°C. Vzniklá sraženina se oddělí na celulosovém filtru Gelman GN-6 (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) a promyje třikrát vždy 5,0 ml chladné 10% kyseliny trichloroctové. Filtr se umístí do lahvičky,

vysuší a přidá se scintilační koktejl pro počítání radioaktivních impulsů. Inkorporace radioizotopu se vyjádří jako počet radioaktivních rozpadů [^3H] nebo [C^{14}] za minutu (cpm) na 1 mm^2 povrchu zubní skloviny nebo na jednu bakterii (podle stanovení celkového počtu jednotek tvořících kolonie, CFU). Radioizotopové značky se používá v nadbytku. Tak například v případě buněk *Escherichia coli* s obsahem 9×10^{-15} g DNA/buňka, při obsahu zbytků thymidinu v DNA 25 %, se ke každé reakční směsi přidá více než jednomilionový násobek genomového ekvivalentu thymidinu v $10^{6,0}$ bakteriích. Přidává se také milionový nadbytek genomového ekvivalentu adeninu. Pulsní značení není zatíženo obtížemi, které jsou charakteristické pro stanovení intracelulární specifické aktivity a pro ekvilibraci izotopu, poněvadž každý vzorek se pulsně zpracovává stejnou krátkou dobu.

Inkorporace [methyl- ^3H]-thymidinu do bakteriálních buněk, jejichž hustota odpovídá nasycení pelikulárních vazebných míst (asi 200 000 až 630 000 ($10^{5,3}$ až $10^{5,8}$) bakterií/ mm^2) činí asi $3,7 \times 10^{-4}$ cpm/bakterie. Celkový počet cpm [methyl- ^3H]-thymidinu na životaschopnou buňku v této době aktivního růstu je průměrně asi 20×10^{-4} cpm/bakterie. Když se bakteriálním buňkám ve vzorku plaku poskytne ustálený zdroj energie pro růst, jako například když se provádí oplachování roztokem sacharosy, dosáhne se při hustotě, která se blíží asi 2 500 000 až 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/ mm^2 , hodnoty cpm/bakterie 160×10^{-4} (viz příklad 2).

T a b u l k a 1

Porovnání inkorporace ^3H -thymidinu, jakožto měřítko syntézy DNA v streptokokcích in vivo a in vitro

	Hustota na mm ²	(³ H-thymidin cpm/ bakterie) x 10 ⁻⁴
Noční kultura na Todd-Hewittově médiu	[10 ⁹ bakterií/ml kapaliny]	2,5
Převážně strepto- koky přilnuté k zubní sklovině při nasycení ^a	200 000 až 630 000	3,7
Bakterie v den- tálním plaku ^b na zubní sklovi- ně, SILUX nebo VISIO-DISPERS	2 500 000 až 3 900 000	20 (160 při opla- chování roztokem sacharosy)
Bakterie imobili- zované k miskám a médiím pomocí maleinanhydridu ^c	625 000	5,4
Bakterie imobili- zované k miskám a START ^c pomocí maleinanhydridu ^c	625 000	80

^a data in vivo, střední hodnota (80 %) z 16 míst

^b data in vivo, střední hodnota (80 %) ze 22 míst

^c stanovení in vitro, střední hodnota (80 %) z 35 pokusů

P ř í k l a d 2

Zkoumání účinků oplachování roztokem sacharosy nebo glukosy
nebo vodou na růst buněk

Každé zkoušky se zúčastní 8 zdravých dospělých lidí, 4 ženy a 4 muži. Těmto dobrovolníkům se způsobem popsaným v příkladu 1 upevní na maxilární první moláry a první a druhé premoláry kousky zubní skloviny hovězího skotu.

Pokusy se provádějí po dobu 6 hodin u všech 8 subjektů, z nichž každý má v ústech 6 kousků skloviny. Každý subjekt si proplachuje ústa jednou za 15 minut po dobu 1 minuty 10 ml vody, roztokem glukosy o koncentraci 100 g/litr (glukosa bez obsahu sacharosy) nebo roztokem sacharosy o koncentraci 100 g/litr (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Experiment trvá celkem 6 hodin. V den 1 si zkušební subjekty proplachují ústa roztokem glukosy, v den 2 vodou a v den 3 roztokem sacharosy. Po 2 hodinách in vivo se z rámečků vyjmou 2 náhodně zvolené vzorky zubní skloviny. Po 4 hodinách se vyjmou další 2 vzorky zubní skloviny a po 6 hodinách se vyjmou zbývající 2 kousky zubní skloviny. Ze všech kousků zubní skloviny se ihned po vyjmutí odeberou vzorky plaku, v nichž se způsobem popsaným v příkladu 1 stanoví složení životaschopných buněk.

Sacharosa představuje známou látku podporující adherenci a bakteriální růst. Bylo očekáváno, že za přítomnosti nadbytku sacharosy bude populace indigenních bakterií okamžitě vykazovat vysokou úroveň aktivního růstu, poněvadž je přilnuta k implantované zubní sklovině. Zjištění, že podobně jako je tomu u indigenních plaků popsaných v příkladu 1, dochází za podmínek normálního stravování ke zvýšení úrovně aktivního růstu u životaschopných adherentních bakterií v době, kdy se jejich hustota přiblíží hodnotě 2 500 000 až 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm², je překvapující. Není překvapující, že úroveň aktivního růstu je vyšší než u neoplachované implantované zubní skloviny, neočekávané je, že k tomuto nárůstu dochází v okamžiku, kdy se

hustota životaschopných buněk přiblíží hodnotě 2 500 000 až 3 200 000 ($10^{6,4-6,5}$) bakterií/mm². Neočekávané také je, že jak oplachování glukosou, tak oplachování vodou, má za následek zvýšení počtu aktivně rostoucích buněk.

P ř í k l a d 3

Regulace hustoty populace za použití činidla potlačujícího adherenci

Způsobem popsaným v příkladu 1 se na zuby upevní kousky zubní skloviny hovězího skotu. Za použití deionizované vody a navážených množství okta decylsulfátu sodného (SOS) se při 60°C vyrobí roztoky okta decylsulfátu sodného o koncentraci 5×10^{-3} M. Skutečná koncentrace může být trochu nižší než 5×10^{-3} vzhledem k rozpustnosti SOS ve vodě při teplotě místnosti. Používá se pouze čirého supernatantu.

Kousky zubní skloviny se inkubují s čirým supernatantem SOS po dobu 30 minut a potom se 5 minut oplachují vodou, aby se odstranil nadbytek roztoku, takže na povrchu skloviny zůstane pouze orientovaná monomolekulární vrstva okta decylsulfátu sodného. Vzorky zubní skloviny s vázaným SOS jsou označovány názvem SOS-sklovina.

Od 2 osob se shromažďují úplné sliny (stimulace parafilmem), které se potom vyčeří 10minutovým odstředováním při 10 000 x g. Vyčeřené a promísené sliny (1 ml) se potom inkubují s kousky zubní skloviny nebo s kousky SOS-skloviny 45 minut při teplotě místnosti za mírného protřepávání. Kontrolní vzorky se inkubují s fosfátovým pufrem (Gibbons a Etherden, Infect. Immun. 36: 52 až 58 (1982)). Kousky skloviny potažené slinami (SC-sklovina) a kousky SOS-skloviny potažené slinami (SC-SOS-sklovina) se také

omyjí fosfátovým pufrem (Gibbons a Etherden, výše uvedená citace).

Vzorky skloviny, SOS-skloviny, SC-skloviny a SC-SOS-skloviny se potom zkoušejí na hydrofobicitu v zařízení Wilhelmy Balance model DCA-332, což je obchodně dostupný výrobek firmy Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA). Obvod kousku je 17,84 mm. Interval máčení je 1 sekunda. Rychlost platformy je 148,39 $\mu\text{m/s}$. Hodnoty dynamického styčného úhlu pro sklovinu, sklovinu ošetřenou SOS a SC-SOS-sklovinu jsou uvedeny v tabulce 2.

Vliv ošetření skloviny SOS na tvorbu plaku in vivo ve srovnání s tvorbou plaku na neošetřené sklovině se porovnává u dvou subjektů, kterým se náhodným způsobem umístí 3 kousky neošetřené skloviny a 3 kousky SOS-skloviny do běžných rámečků, které jsou popsány v příkladu 1. Každý subjekt se dvakrát vyšetřuje na tvorbu plaku po 2, 4, 8 a 24 hodinách. Způsobem popsaným v příkladu 1 se stanoví se celkový počet životaschopných bakterií na sklovině a SOS-sklovině. Jak je zřejmé z obr. 3, po 2, 4, 8 a 24 hodinách se na sklovině ošetřené SOS zjistí podstatně nižší počet životaschopných bakterií (geometrický střed) ve srovnání s neošetřenou sklovinou.

T a b u l k a 2

Sklovina

Úhel	Cyklus		
	1	2	3
postupující	40	0	0
ustupující	0	0	0
postupující	64	35	29
ustupující	0	0	0

SOS-sklovina

Úhel	1	Cyklus 2	3
postupující	103	71	56
ustupující	13	19	22
postupující	103	60	60
ustupující	28	33	34

SC-SOS-sklovina

Úhel	1	Cyklus 2	3
postupující	57	0	0
ustupující	0	0	0
postupující	68	51	49
ustupující	33	34	36

P ř í k l a d 4

Regulace hustoty populace za použití hydrofobních materiálů

Za použití podobného modelu in vivo se také zkouší bakteriální kolonizace zubů v ústech 8 dospělých lidí. Osm dospělých subjektů, kteří se zúčastňují této studie jsou studenti zubního lékařství nebo profesionální mikrobiologové. Kousky zubní skloviny hovězího skotu, dostavbového materiálu SILUX (3M, St. Paul, MN, USA), VISIO-DISPERS (světlem tvrditelná kompozitní dentální dostavbová hmota (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA) o ploše vždy asi 10 mm² se přímo a současně upevní k šesti kontralaterálním premolárům a prvním molárům za použití obvyklých rámečků a nechají se v ústech různou dobu, aby se na nich akumulovaly bakterie dentálního plaku.

Kousky zubní skloviny hovězího skotu v podobě čtverečků se způsobem popsaným v příkladu 1 vyříznou z extrahovaných zubů hovězího skotu. Kousky kompozitní pryskyřice VISIO-DISPERS (tj. světlem tvrditelná kompozitní dentální dostavbová hmota (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA)) a dostavbového materiálu SILUX (3M, St. Paul, MN, USA) se vyrobí tvářením ve formě zhotovené z vinylpolysiloxanového registračního materiálu EXPRESS (3M, St. Paul, MN, USA), do něhož byl otisknut předem upravený kousek skloviny hovězího skotu. Kompozitní materiál se umístí do takto vytvořené formy a forma se zakryje proužkem materiálu Mylar, který se svrchu přitlačí, aby se získal hladký a rovný povrch. Kompozit se potom 40 sekund vytvrzuje světlem. Kousky kompozitní pryskyřice se vyjmou z formy, upraví se jejich okraje a změří se povrchová plocha. Vnější povrch kousků se vyleští pomocí leštících kotoučů SOF-LEX (o hrubosti medium až fine) (3M, St. Paul, MN, USA). Tak se simuluje kompozitní materiál používaný v klinické praxi a odstraní se přitom vrstva bohatá na pryskyřici.

Způsobem popsaným v příkladu 1 se zhotoví rámečky pro kousky zkoušených materiálů. Kultivace různých druhů bakterií na různých elektivních a selektivních médiích se provádí způsobem popsaným v příkladu 1. V předem určených intervalech se kousky skloviny vyjmou a umístí do 1,0 ml ředidla PRAS (viz příklad 1), v němž se podrobí sonikaci. Způsobem popsaným v příkladu 1 se také provede inkorporace [methyl-³H]-thymidinu a [¹⁴C]-adeninu do látky nerozpustné v kyselině trichloroctové z bakteriálních plaků odebraných v příslušných časových intervalech (viz příklad 1).

Obr. 4 ilustruje, že rychlý nárůst aktivně rostoucích bakterií vykazuje menší počet kousků VISIO-DISPERS (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA) a SILUX (3M, St. Paul, MN, USA), poněvadž na menším počtu těchto kousků se popula-

ce přiblíží hustotě, která je spojována se stimulovaným nebo aktivním bakteriálním růstem. Tyto povrchy jsou hydrofobnější než zubní sklovina při měření relativní hydrofobicity za použití zařízení Wilhelmy Balance. Také vzorky VISIO-DISPERS (ESPE-Premier, Norristown, PA, USA) a SILUX (3M, St. Paul, MN, USA), které jsou potaženy slinami jsou hydrofobnější než vzorky zubní skloviny potažené slinami. Konkrétně se zjistí následující střední hodnoty ($\pm$ střední chyba) ustupujícího úhlu při měření s 8 replikacemi: sklovina 16,1 ($\pm 2,3$), SC-sklovina 4,99 ($\pm 2,6$), kompozit VISIO-DISPERS 23,5 ($\pm 0,64$), kompozit SC-VISIO-DISPERS 14,1 ($\pm 2,3$), dostavbová hmota SILUX 29,2 ($\pm 2,7$) a dostavbová hmota SC-SILUX 14,6 ($\pm 8,89$). Slinný povlak na všech površích je podstatně méně hydrofobní než neošetřený původní povlak (zdvojený t-test). Kromě toho, částice dostavbového materiálu SC-SILUX jsou podstatně hydrofobnější ve srovnání se vzorky SC-sklovina (opakované měření ANOVA, Sheffe f test). Toto "prosvítání hydrofobicity" je neočekávané a lze je vysvětlit tím, že slinná blanka je pravděpodobně modifikována tak, že může nechat proniknout značnou část hydrofobicity podložního povrchu.

P ř í k l a d 5

Výroba přípravků obsahujících faktor SMR

Přípravky obsahující faktor SMR se izolují jak ze suspenzí, tak z agarových kultur kmene *Streptococcus gordonii*, Challis, přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105. V krátkosti lze vhodný postup popsat takto: inokulační stěr z misky s SBA s obsahem kmene Challis (porost buněk získaný kultivací přes noc na BSA) se přidá do Klettovy baňky (objem 300 ml, stěr z 1 misky na 20 ml média TH) a inokulum (Klett asi 25) se kultivuje v Todd-Hewittově médiu (TH medium, Difco Labs., Detroit, MI, USA) při 37°C. Když se

začne hustota buněk zvyšovat (Klett asi 26 až 28), v různých stádiích růstu se odebírají bezbuněčné supernatanty: v časně fázi růstu (po asi 10 minutách), střední logaritmické fázi růstu (po asi 60 minutách) a stacionární fázi růstu (po asi 160 minutách).

Potom se porost buněk kmene Challis na miskách s BSA setře z povrchu agaru a inkubuje 1 hodinu při teplotě místnosti v médiu TH (stěr z jedné misky na 10 ml média TH). Buňky se oddělí z média centrifugací. Po odstranění kultivovaných buněk se navíc otřený agar SBA 1 hodinu inkubuje v 10 ml média TH a zbývající buňky se z média odstraní centrifugací (10 minut při 10 000 x g).

Vyčerené úplné sliny odebrané dobrovolníkům a chlazené na asi 0°C se fosfátovým pufrem zředí v objemovém poměru 1 : 1 (Gibbons a Etherden, Infect. Immun. 36: 52 až 58 (1982)) a sterilizují filtrací. Za použití výše uvedených postupů se získají následující inkubační kapaliny: fosfátový pufr (kontrolní), medium TH (kontrolní), sliny ve fosfátovém pufru, supernatant z časně fáze růstu, supernatant ze střední logaritmické fáze růstu, buňky z otěru SBA, agar SBA po otěru.

P ř í k l a d 6

In vitro iniciace růstu bakterií za použití přípravků

Z kousků zubní skloviny hovězího skotu získaných způsobem popsáným v příkladu 1 se připraví kousky pokryté bakteriálními buňkami. Rámečky pro kousky zubní skloviny se vyrobí ve sterilních mikrocentrifugačních zkumavkách s plochým vedením (1,5 ml, Fischer Scientific, Itasca, IL, USA) v Koflexově kaučukové bázi (Coe Labs., Chicago, IL, USA). Dvěma až čtyřem dobrovolníkům se odeberou sliny, které se

ochladí na teplotu asi 0°C, vyčeří centrifugací při 10 000 x g (10 minut) a sterilizují filtrací. Zafixované kousky zubní skloviny se inkubují se sterilními slinami 30 až 45 minut, sliny se dekantují a pro odstranění nepřipojených slin se použije oplachu sterilním fosfátovým pufrem (2 x).

Potom se kousky zubní skloviny potažené slinami potáhnou S. gordonii kmen, Challis, přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105. V krátkosti lze použitý postup popsat takto. Bakterie se pěstují přes noc v Todd-Hewittově médiu (TH medium, Difco Labs., Detroit, MI, USA). Bakterie se přímo odeberou z inkubátoru, smíchají se supernatantem kultury a 1,0 ml vzniklé směsi se umístí do mikrocentrifugační zkumavky obsahující kousek zubní skloviny potažený slinami. Mikrocentrifugační zkumavky obsahující bakteriální kulturu se 10 minut centrifugují při zrychlení 10 000 x g. Po centrifugaci se nepřilnuté bakterie dekantují od adherentních buněk Streptococcus gordonii kmen, Challis, přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105 a zkumavky obsahující adherentní buňky se umístí do anaerobní komory.

Kousky zubní skloviny potažené bakteriemi se potom inkubují za přítomnosti inkubačních kapalin z obsahem faktoru SMR příkladu 5.

Pro vyhodnocení bakteriálního růstu se kousky přenesou do 24 jamkové komory s plochým dnem (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) za účelem následné inkubace za přítomnosti kapalin inhibujících nebo povzbuzujících bakteriální růst. Při každém experimentu se 12 kousků zubní skloviny vloží do obvyklých rámečků. Zkušební vzorky těsně přiléhají ke kaučukovému podkladu a neumožňují bakteriím přilnout ke vzorkům ze zadní části nebo zboku.

Vyhodnocení růstu zahrnuje dvouhodinovou inkubaci s různými kapalinami uvedenými v tabulce III za použití 12 kousků skloviny. U každého kousku se stanoví počet životaschopných bakterií (počet životaschopných buněk na 1 mm² povrchu) (viz příklad 1 a 2).

Pro stanovení životaschopných buněk se kousky vyjmou a umístí do 1,0 ml předredukovaného anaerobně sterilizovaného (PRAS) ředidla v anaerobní komoře (Coy Anaerobic Chamber, Ann Arbor, MI, USA) a podrobí se 20-sekundové sonikaci (Kontes Cell Disruptor, Kontes, Vineland, NJ, USA). Vzorky plaku se sériově zředí a zředěné vzorky se nanesou na misky (Spiral Systems, Inc., Cincinnati, OH, USA) s doplněným krevním agarem a Mittis-salivarius (Difco Labs. Detroit, MI, USA).

T a b u l k a 3

Inkubační kapalina	CFU/mm ² po 2 hodinové inkubaci	% vztažená na pufr
Fosfátový pufr (kontrolní)	16 000	100
TH medium (kontrolní)	16 800	105
Sliny/fosfátový pufr	40 000	250
Supernatant z časně logarit- mické fáze růstu	78 000	488
Supernatant ze střední logarit- mické fáze růstu	41 000	256
Stěr buněk s SBA	98 800	618
SBA po stěru	34 000	213

P ř í k l a d 7

Zkoušení aktivity SMR in vitro

Pro vyhodnocení SMR aktivity byl vyvinut další test in vitro.

Bakterie ($0,01$ až $2,5 \times 10^7$) se přednostně vážou k polystyrenovým stripovacím miskám aktivovaným maleinanhydridem (Reacti-Bind^(R), Pierce, Rockford, ILL, USA) při přednostní koncentraci 1×10^8 ml ($200 \mu\text{l}$ na jamku či 2×10^7 na jamku) podle předpisů výrobce, načež se provede centrifugace po dobu 10 minut při teplotě 30 až 35°C a frekvenci otáčení $3\,000 \text{ min}^{-1}$ (PR-6 000 International). Alternativně se bakterie odstředí (za podobných podmínek, přednostně 2×10^7 na jamku) do 96-jamkové misky Immulon (Dynatech Laboratories) nebo do stripovací misky Corning Brand Easy Wash ELISA Strip Wells. Přednostními bakteriemi jsou bakterie *Streptococcus gordonii*, kmene Challis, přírůstkové číslo sbírky ATCC 35105 a jako misek se přednostně použije 96-jamkových misek aktivovaných maleinanhydridem. Jako přednostní koncentrace bakterií se používá koncentrace, pomocí které lze pokrýt asi 20 až 40 % povrchové plochy jamky. Po centrifugaci se nenavázané bakterie odstraní.

Zahřáté (35 až 37°C) supernatanty s obsahem SMR a kontrolní supernatanty nebo izolované přípravky na bázi SMR se potom přidají do jamek a provede se 30-minutová inkubace při 37°C . Po 30 minutách inkubace se přidají radioisotopem značené nukleosidy (viz příklad 1) a buňky se inkubují dalších 30 minut. Po inkubaci za přítomnosti radioizotopem značených nukleosidů se jamky opláchnou a jejich obsah se převede do scintilačních zkumavek za účelem spočívání radioaktivních impulsů. Čas od času se volné buňky v radioizoto-

pem značené inkubační kapalině s obsahem SMR také zachytí před promytím na celulosových filtrech a po inkubaci s nukleosidy. Čas od času se bakterie odstraní z misek, provede se srážení kyselinou trichloroctovou a látka nerozpustná v kyselině trichloroctové se analyzuje na obsah radioaktivity. Ve většině případů je množství radioaktivity zavedené do látky nerozpustné v kyselině trichloroctové stejné, jako množství radioaktivity detegované v miskách bez srážení kyselinou trichloroctovou. Čas od času se také misky inkubují delší dobu.

Imobilizace bakterií k miskám za použití maleinanhydridu se analyzuje v závislosti na množství bakterií přidaných k 1 mm² jamky. Vázané bakterie se stanoví na základě vazby buněk předem označených 10 µCi/ml [methyl-³H]-thymidinu (Liljemark a Bloomquist, Infect. Immunol., 34: 935 až 941 (1981)). Zjištěné výsledky jsou uvedeny na obr. 5A. Tyto výsledky ukazují, že počet bakterií navázaných na 1 mm² pomocí maleinanhydridu se lineárně zvyšuje s počtem bakterií přidaným do jamky. Vazba bakterií k miskám modifikovaným maleinanhydridem, miskám Immulon a miskám Easy Wash Strip Plates se také provádí popsáním způsobem. Výsledky ukazují, že počet bakterií lineárně stoupá s počtem bakterií přidaných do jamky (viz obr. 5B).

Inkorporace [methyl-³H]-thymidinu do buněk kmene *Streptococcus gordonii* Challis vázaných k maleinanhydridu v závislosti na čase za přítomnosti nebo nepřítomnosti izolovaného faktoru SMR (viz příklad 8) je znázorněna na obr. 6. Výsledky ukazují, že po 60 minutách inkubace s purifikovaným přípravkem obsahujícím SMR dojde k asi 15-násobnému zvýšení inkorporace [methyl-³H]-thymidinu do buněk exponovaných faktoru SMR ve srovnání s kontrolními buňkami (viz šipka).

Inkorporace [methyl-³H]-thymidinu do vázaných buněk kmene *Streptococcus gordonii* Challis exponovaných faktoru SMR in vitro se porovná s inkorporací [methyl-³H]-thymidinu do in vivo adherentní plakové populace (viz příklad 1) v závislosti na hustotě. Výsledky jsou zřejmé z tabulky 1 v příkladu 1.

Tyto výsledky ukazují, že inkorporace [methyl-³H]-thymidinu do bakterií plaku in vivo při hustotě 2 500 000 až 3 900 000 ($2 \cdot 10^6$ – $3,9 \cdot 10^6$) je asi 20×10^{-4} cpm/bakterie a inkorporace do bakterií adherentních k maleinanhydridu při hustotě asi 630 000 bakterií/mm² je 80×10^{-4} cpm/bakterie. Do bakterií z plaku in vivo o hustotě 200 000 až 630 000 byl [methyl-³H]-thymidin inkorporován přibližně ve stejném rozsahu jako do bakterií in vitro o hustotě 625 000 bez faktoru SMR.

P ř í k l a d 8

Izolace a charakterizace faktoru SMR

Faktor SMR je možno získat z rostoucích kultur streptokokových kmenů, jakož i z *Escherichia coli* ATCC č. 55535. Přednostním produkčním kmenem je *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105.

Způsoby získávání SMR z bakteriálních kultur jsou popsány v příkladu 5. V alternativním provedení je možno použít následujících způsobů produkce SMR. Inokulum se připraví pěstováním bakterie v Todd-Hewittově médiu (TH) 16 až 24 hodin při 37°C (za anaerobních podmínek v případě streptokoků a za anaerobních podmínek nebo aerobních podmínek v případě *E. coli*). Vyrobí se směs 100 µl inokula a 2 ml média TH a tato směs se umístí na povrch misky s agarovým médiem. Jako agarového média se přednostně před-

nostně používá doplněného krevního agaru popsaného v příkladu 1. Alternativně se může použít agaru TH nebo půdy RMPI-1640 (JRH Biologicals Inc., Lenexa, Kansas, USA) ve směsi s 1,5 % agarem (Difco). Přednostně se s inokulem smíchá médium TH. Alternativně se použije RPMI-1640 nebo půdy FMC (Terlecky et al., Infect. Immunol. 11: 649 až 655 (1975); Terlecky a Shockmann, Infect. Immunol. 11: 656 až 664 (1975)). Misky s médiem a rozhraním bakterie-agar se inkubují ve svislé poloze 16 až 24 hodin za anaerobních podmínek při 37°C.

Po inkubaci se do každé misky přidá 5 ml média. Přednostním médiem je TH nebo půda FMC. Alternativně se také může použít RMPI-1640. Buňky se setřou z navlhčeného povrchu a smíchají s přidanou kapalinou. Po asi 20 minutách při teplotě místnosti se kapalná směs odstředí (10 minut při 10 000 x g) za vzniku úplného média s faktorem nebo faktory SMR. Po centrifugaci se supernatant neobsahující buňky zpracovává odstředováním v koncentračním zařízení Centriprep (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) s vylučovací mezí molekulové hmotnosti asi 3 000. Pracuje se podle instrukcí výrobce. Získají se faktory SMR obsahující látky s molekulovou hmotností nižší než asi 3 000.

Za použití stejných metod (inkubace, stěry, centrifugace a zpracování pomocí zařízení Centriprep) se vyrobí SMR z *Escherichia coli* ATCC 55535. Podobně lze vyrobí i SMR z jiných bakteriálních kmenů.

Za použití stejných metod (inkubace, stěry, centrifugace a zpracování pomocí zařízení Centriprep) se vyrobí kontrolní přípravky bez bakteriálního inokula pro výrobu kontrolních kapalin, které jsou pojmenovány podle médií použitých pro inokulaci a/nebo přidaných k miskám po inkubaci, například názvem TH-kontrolní.

Schopnost faktorů SMR z různých zdrojů a z různých médií stimulovat mikrobiální růst tří různých kmenů bakterií se zkouší pomocí inkorporace [methyl-³H]-thymidinu do bakterií způsobem popsaným výše. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

T a b u l k a 4

Inkorporace [methyl-³H]-thymidinu [cpm x 10⁻⁴/bakterie]

Bakteriální zdroj pro faktor SMR	Médium použité pro produkci SMR	Imobilizovaný kmen		
		S.gordonii Challis ^a	S. gordonii S7 ^d	E.coli ^b
S. gordonii	TH	80	1,1	39
Challis ^a	RPMI-1640	48	--	--
	FMC	58	--	--
E. coli ^b	TH	41	1,4	14
Kontrolní ^c	TH	5,8	1,4	6,5
	RPMI-1640	10	--	--
	FMC	12	--	--

^a S. gordonii Challis přírůstkové číslo ATCC 35105

^b E. coli kmen 149 přírůstkové číslo ATCC 55535

^c kontrolní inkubace a izolace jako v případě faktoru(ů) SMR

^d S. gordonii kmen S7 (SK8)

-- data nejsou k dispozici

Výsledky ukazují, že SMR z Streptococcus gordonii Challis ATCC č. 35105 a Escherichia coli ATCC č. 55535 produkované ve třech půdách účinné stimulují mikrobiální

růst jak Challis, tak E. coli. Výsledky těchto studií ukazují, že jak gram-negativní, tak gram-pozitivní bakterie produkují faktor či faktory SMR a jak gram-pozitivní, tak gram-negativní bakterie mohou odpovídat faktor SMR z kteréhokoliv zdroje. Faktor či faktory SMR z Challis vykazují nejvyšší účinnost.

Úplné médium s faktorem SMR produkované v půdě TH před oddělením podílů s molekulovou hmotností nad 3 000 filtrací přes membránu se zpracuje různými činidly a exponuje různým podmínkám a potom analyzuje na aktivitu SMR. Také kontrolní médium TH se podobným způsobem zpracuje či exponuje. Na úplné médium SMR se působí proteínasou K, trypsinem, DNAasou a RNAasou (Sigma) za standardních podmínek pro každý enzym. SMR ošetřený enzymem si zachovává biologickou účinnost. Úplné médium SMR a izolované faktory SMR podrobené zpracování varem, zmrazováním a zpracováním v autoklávu si zachovávají svou biologickou účinnost. Tyto výsledky ukazují, že SMR v médiu TH je možno charakterizovat jako odolný proti trypsinu, proteinase K, DNAase, RNAase a také proti zahřívání a zmrazování.

P ř í k l a d 9

Schopnost faktoru SMR stimulovat inkorporaci [methyl-³H]-thymidinu do různých druhů bakterií

Různé druhy a rody bakterií se imobilizují na 96-jamkové misce aktivované maleinanhydridem, za účelem zjištění, zda izolovaný faktor SMR může stimulovat mikrobiální růst měřený prostřednictvím příjmu [methyl-³H]-thymidinu. Bakterie se inkubují s faktorem SMR nebo kontrolními přípravky způsobem popsáním výše (viz příklad 7). Faktor SMR byl získán z Streptococcus gordonii kmene Challis

ATCC č. 35105 a izolován způsobem popsáním v příkladu 6.
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Násobek zvýšení inkorporace [methyl-³H]-thymidinu se zjistí dělením hodnoty cpm/jamka pro tyto bakterie inkubované s faktorem SMR hodnotou cpm/jamka pro stejný bakteriální kmen inkubovaný s TH-kontrolním přípravkem.

T a b u l k a 5

Bakterie	Násobek vyjadřující zvýšení inkorporace [methyl- ³ H]-thymidinu ve srovnání s kontrolním pokusem
----------	---

Streptococcus gordonii S7	0,8
Streptococcus gordonii Blackburn	12,8
Streptococcus gordonii 12NA	7,6
Streptococcus parasanguis FW213	8,5
Streptococcus mutans IB1600	18,2
Streptococcus sanguis 133-79	1,6
Streptococcus pneumoniae	7,4
Streptococcus pyogenes	10,5
Streptococcus faecalis ATCC 29212	9,4
Streptococcus faecalis ATCC 19433	7,5
Staphylococcus aureus	7,4
Staphylococcus epidermidis	7,4
Pseudomonas aeruginosa	11,1
E. coli ATCC 55535	9,1
E. coli kmen TL	6,3
Haemophilus parainfluenza HP-28	7,4

Tyto výsledky ukazují, že faktor SMR z *S. gordonii* Challis ATCC č. 35105 může stimulovat mikrobiální růst jak gram-pozitivních, tak gram-negativních kmenů bakterií.

P ř í k l a d 1 0

Příprava *Streptococcus gordonii* kmen Challis s reporterovým genem pro signalizaci mikrobiálního růstu za použití metod genového inženýrství

Bakteriální kmen exprimující amylasu vykazuje stimulaci růstu prostřednictvím růstového faktoru SMR. Amylasový gen se vloží do 16S ribosomálního RNA genu (16S rDNA) *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105, poněvadž je pravděpodobné, že transkripce ribosomálních genů se významně zvýší během propuknutí růstu indukovaného SMR. Inserce jiných reporterových genů do 16S rDNA nebo inserce reporterových genů do jiných SMR-indukovatelných bakteriálních operonů může podobně usnadnit vývoj zlepšených stanovení SMR. *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105 neobsahuje endogenní amylasový gen ani nevykazuje aktivitu tohoto enzymu. Přednostně se volí takové reporterové geny a takové genové produkty, které nejsou přítomny v hostitelské bakteriální buňce.

Bakteriální kmeny použité při zkouškách se zkonstruují takto: Polymerasové řetězové reakce (PCR) se použije pro enzymatickou amplifikaci interního fragmentu 16S rDNA streptokokového kmene Challis dostupného pod č. ATCC 35105. Genomová DNA se purifikuje z tohoto kmene způsobem popsáním v Bensing et al., J. Bacteriol. 175: 7 421 (1993). Na základě kontroly konzervovaných sekvencí streptokokových rDNA uložených v databázi ribosomálních DNA (Ribosomal Data Base, Dept. of Microbiol., Univ. of Illinois, Urbana/Champaign USA) byla vybrána 20bp a 18bp sekvence v předvídaných vysoce

konzervovaných oblastech genu. Za použití automatizovaného sekvenovacího zařízení Applied Biosystems 391 Automated Sequencer se podle instrukcí výrobce zhotoví syntetické oligonukleotidové primery. Těchto sekvencí, tj. sekvence

5'-TCAGGAATTCGGCTAACTACGTGCCAGCAG-3'

(SEQ ID NO:1) a

5'-GAGCGGATCCCCCGGGAACGTATTCAGC-3'

(SEQ ID NO: 2),

které přibližně odpovídají předvídané sekvenci bází 554 až 573 a komplementární sekvenci bází 1462 až 1479 16S rRNA genu *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105 (s místem štěpení pro restriční enzym EcoRI přidaným k 5' konci a BamHI přidaným k 3' konci) se použije jako primerů pro reakci PCR. Reakce PCR se provádí na templátu, který se skládá z 75 ng chromosomální DNA z *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105, 1 μ M každého z primerů, 300 μ M každého z dNTP s 10 % dimethylsulfoxidu a 4 mM chloridu hořečnatého (F. M. Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987).

Amplifikace se provádí v Hybaidově tepelném cyklovači za použití Vent DNA polymerasy z New England Biolabs. Po PCR se amplifikovaný fragment DNA o předem určené velikosti (900 bp) deteguje jako hlavní produkt PCR elektroforézou na agarosovém gelu. Tento fragment se rozštěpí EcoRI a BamHI (v důsledku přítomnosti vnitřního místa EcoRI v amplifikované DNA se vypustí asi 100 bp od 5' konce fragmentu), liguje do místa vektoru pRQ200 za vzniku plasmidu pMSP16Samy (viz obr. 7) za použití standardní metodologie rekombinace DNA. Plasmid pRQ200 byl zkonstruován způsobem popsaným v Lane et al., výše uvedená citace, a získán od dr.

Yasbina z Marylandské University v Baltimore, Maryland, USA. Tento plasmid se transformuje do *E. coli* DH5 α MCR (BRL/Gibco). Transformanty se selektují na resistenci vůči erythromycinu.

Je dobré si všimnout polohy sekvence rDNA v sousedství bezpromotorového amylasového genu (obr. 7). Potom se přidá plasmid pMSP16Samy ke kompetentním buňkám kmene *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105, čímž se umožní, aby byly kompetentní buňky transformovány přijetím plasmidu pMSP16Samy (tento způsob je popsán v Macrina et al., Gene, 19:345 (1982)). Jak popisují Lane et al. ve výše citované publikaci, tento plasmid se nemůže autonomně replikovat, a proto mohou transformanty exprimující marker resistance vůči erythromycinu pRQ200 vzniknout pouze integrací plasmidu do chromosomu prostřednictvím rekombinace mezi sekvencemi klonované rDNA a sekvencemi v genomu. Předvídaná struktura takového rekombinantu je znázorněna na obr. 8. Jelikož se předpokládá, že v bakterii, jako je *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105, je asi 7 opakování genů rDNA, může k integraci dojít u různých transformantů na různých místech. Proto se zachytí asi 20 různých transformantů, které se purifikují a zkouší na amylasovou aktivitu. Při zkouškách popsanych dále byly vybrány pro další použití při tomto stanovení dva kmeny získané tímto způsobem, tj. MSP812 (ATCC č. 69528) a MSP818 (ATCC č. 69529) exprimující amylasu.

Kmen MSP812 je kmen *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105, který produkuje během mikrobiálního růstu amylasovou aktivitu. Tento kmen byl uložen ve sbírce ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 6. ledna 1994 a obdržel přírůstkové číslo 69 528. Kmen MSP818 je kmen *Streptococcus gordonii* Challis přírůstkové číslo ATCC 35105, který exprimuje amylasovou aktivitu v závislosti

na mikrobiálním růstu. Tento kmen byl uložen ve sbírce ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 6. ledna 1994 a obdržel přírůstkové číslo 69 529. Jako jiné relevantní charakteristiky těchto organismů je možno uvést, že se jedná o gram-pozitivní koky rostoucí v řetězcích, které jsou resistantní vůči erythromycinu.

P ř í k l a d 1 1

In vitro stanovení mikrobiálního růstu bakteriálních kmenů s reporterovým genem pro růst, které byly sestrojeny metodami genového inženýrství

Bakteriálních kmenů zkonstruovaných způsobem popsaným v příkladu 10 se použije pro stanovení faktoru SMR. Produkce amylasy v bakteriích se monitoruje v bakteriích, které se inkubují za přítomnosti nebo za nepřítomnosti izolovaného faktoru SMR za použití stanovení amylasy v půdě se škrobem. Kultury bakterií se pěstují přes noc za anaerobních podmínek při 37°C (asi 10^9 buněk/ml). Přitom se používá *S. gordonii* Challis ATCC č. 35105 (negativní kontrola), *S. gordonii* Challis ATCC č. 65928 nebo *S. gordonii* Challis ATCC č. 65929 v Todd-Hewittově médiu (TH, Difco). Bakterie se sklídí centrifugací, promyjí stejným objemem TH a resuspendují ve stejném objemu TH. Resuspendované bakterie se desetinásobně zředí TH, který obsahuje buď zkoušený přípravek s faktorem SMR nebo kontrolní extrakty. Vždy 5 µl každé suspenze se inokuluje na povrch Todd-Hewittova agaru s obsahem 0,2 % škrobu. Připraví se série misek se stejným inokulem a tyto misky se inkubují při 37°C v anaerobní komoře. V 30-minutových intervalech se misky vyjímají z inkubátoru a zaplavují Lugolovým roztokem (0,5 % jodu, 1 % jodidu draselného).

Výsledky zkoušky na miskách se škrobovým agarem jsou uvedeny v tabulce 6. Oblasti agaru, kde amylasová aktivita degradovala škrob jsou světlé, což je zřejmé na tmavém pozadí okolo oblastí, kde bakterie rostly. V případě, že je přítomna aktivita faktoru SMR, se vyskytuje jeden nebo dva okamžiky (obvykle v rozmezí od 2. do 3. hodiny), kdy bakterie ošetřené SMR produkují více amylasy, a tedy vykazují intenzivnější halo-efekt, tj. zesvětlení okolo oblasti bakteriálního růstu ve srovnání s bakteriemi, které byly ošetřeny kontrolními činidly, pěstovanými ve stejné misce. Získaná data jsou uvedena v tabulce 6.

T a b u l k a 6

Kmen	Zóna zesvětlení po době (h)					
	1	1,5	2	2,5	3	4
Challis ATCC č. 35105	0	0	0	0	0	0
pMSP812 (kontrolní)	0	0	0	0	1	3
pMSP812 (START) ATCC 69528	0	0	2	3	3	3
pMSP818 (kontrolní)	0	0	0	1	2	3
pMSP818 (START) ATCC 69529	0	1	2	3	3	3

- 0 = žádná zóna zesvětlení okolo bakteriální kolonie
1 = zóna zesvětlení obklopující okraj bakteriální kolonie
2 = pozorovatelná zóna zesvětlení užší než 1 mm
3 = dobře definovaná zóna zesvětlení okolo bakteriální kolonie

Transformované a netransformované kmeny Challis se také podrobí zkoušení na schopnost odpovídat na faktor SMR

při zkoušce in vitro. Při tom se *Streptococcus gordonii* Challis ATCC přírůstkové číslo 35105, *Streptococcus gordonii* Challis ATCC přírůstkové číslo 65928 nebo *Streptococcus gordonii* Challis ATCC přírůstkové číslo 65929 navážou na misky aktivované maleinanhydridem způsobem popsáným v příkladu 7.

T a b u l k a 7

Inkorporace [methyl-³H]-thymidinu [cpm x 10⁻⁴/bakterie]

Kmen bakterií	SMR	TH (kontrolní)
Challis ATCC č. 35105	85	5
Challis MSP812 ATCC č. 69528	107	4
Challis MSP18 ATCC č. 69529	147	5

Tyto výsledky ukazují, že transformované geny odpovídají na faktor SMR podobně jako netransformovaný kmen. Transformovaných kmenů lze proto mj. použít pro měření mikrobiálního růstu za použití výše popsané amylasové zkoušky, při kterémžto měření se zjišťuje, zda dochází k odpovědi na faktor SMR, nebo nikoliv.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

- (i) PŘIHLAŠOVATEL: Bloomquist, Cynthia G.
Douglas, William H.
Dunny, Gary M.
Liljemark, William F.
Reilly, Bernard E.
- (ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Composition and Process to Treat
Control Bacterial Infection
(Přípravek a způsob pro léčbu
a potlačování bakteriální infekce)

(iii) POČET SEKVENCÍ: 2

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

- (A) ADRESÁT: Merchant & Gould
- (B) ULICE: 3100 Norwest Center
- (C) MĚSTO: Minneapolis
- (D) STÁT: Minnesota
- (E) ZEMĚ: USA
- (F) PSČ (ZIP): 55402

(v) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:

- (A) TYP MEDIA: disketa
- (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
- (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, verze #1.25

(vi) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K TÉTO PŘIHLÁŠCE:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:
- (B) DATUM PODÁNÍ:
- (C) ZATŘÍDĚNÍ:

(vii) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K DŘÍVĚJŠÍ PŘIHLÁŠCE:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: US 08/029,675
- (B) DATUM PODÁNÍ: 11. března 1993
- (C) ZATŘÍDĚNÍ:

(vii) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K DŘÍVĚJŠÍ PŘIHLÁŠCE:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: US 08/004,971
- (B) DATUM PODÁNÍ: 15. ledna 1993
- (C) ZATŘÍDĚNÍ:

(viii) INFORMACE O ZÁSTUPCI:

- (A) JMÉNO: Kowalchyk, Katherine M.
- (B) ČÍSLO LICENCE: 36 848
- (C) SPISOVÁ ZNAČKA: 600.289-US-01

(ix) INFORMACE O TELEKOMUNIKAČNÍM SPOJENÍ

- (A) TELEFON: 612-332-5300
- (B) TELEFAX: 612-332-9081

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

TCAGGAATTC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG

30

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 28 bázových párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:2:

GAGCGGATCC CCCGGAACG TATTCAGC

28

1790-9

č.j.	001208
DOŠLO	05.1.96
URAD	PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ	
Přil.	6

P A T E N T O V Ě - N Á R O K Y

1. Způsob předvídání, kdy budou bakterie přilnuté k povrchu vykazovat aktivní růst, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

a) stanoví hustota první populace životaschopných bakterií na povrchu,

b) hustota první populace se porovná s hustotou druhé populace obsahující stimulovaný nebo zvýšený poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím ve druhé populaci a

c) aktivní bakteriální růst se předvídá, když je hustota první populace vyšší než hustota druhé populace.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že hustota b) leží přibližně v rozmezí od 400 000 do 6 300 000 bakterií/mm².

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že k růstu bakterií dochází na povrchu, který je susceptibilní vůči bakteriálnímu zamoření.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že k růstu bakterií dochází na povrchu dentálního implantátu.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že k růstu bakterií dochází na povrchu implan-
tovaného biomateriálu.

6. Způsob předvídání aktivního růstu bakterií na povrchu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

a) stanoví hustota populace životaschopných rostoucích bakterií na povrchu,

b) stanoví se populace aktivně rostoucích bakterií na povrchu,

c) vypočítá se poměr aktivně rostoucích bakterií k životaschopným bakteriím na povrchu a

d) aktivní bakteriální růst na povrchu se předvídá, pokud poměr ze stupně c) leží v rozmezí od asi $5 \times 10^{-4} : 1$ do asi $20 \times 10^{-2} : 1$.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se populace aktivně rostoucích bakterií stanoví tak, že se nadbytek značeného nukleosidu přidá k bakteriím na dobu kratší než je minimální doba dělení buněk těchto bakterií, bakterie se nechají růst po dobu postačující pro umožnění inkorporace značeného nukleotidu do bakterií a identifikuje se množství značeného nukleotidu inkorporovaného do DNA bakterií.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se značený nukleosid volí ze souboru zahrnujícího radioizotopy značené puriny a pyrimidiny.

9. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se značený nukleosid volí ze souboru zahrnujícího [methyl- ^3H]-thymidin a [C^{14}]-adenin a jejich směsi.

10. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že poměr ve stupni c) leží v rozmezí od asi $10 \times 10^{-4} : 1$ do $40 \times 10^{-4} : 1$.

11. Způsob inhibice bakteriálního růstu na povrchu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se populace bakterií na povrchu reguluje udržováním hustoty populace bakterií pod hustotou populace spojenou se zvýšením nebo stimulací poměru rostoucích buněk k životachopným buňkám v této populaci.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hustota populace bakterií na povrchu reguluje omezením styku činidel podporujících adherenci s bakteriemi.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že činidlo podporující adherenci je zvoleno ze souboru zahrnujícího polypeptidy, glykoproteiny a uhlohydráty.

14. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hustota populace bakterií na povrchu reguluje modifikací hydrofobicity povrchu pomocí činidla potlačujícího adherenci.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že činidlem potlačujícím adherenci je natrium-oktadecylsulfát.

16. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hustota populace bakterií na povrchu reguluje volbou materiálu, jehož střední dynamický styčný postupující úhel je vyšší než asi 60° a střední dynamický styčný ustupující úhel je vyšší než asi 20° .

17. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m , že střední dynamický styčný postupující úhel je vyšší než asi 90° .

18. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že k bakteriálnímu růstu dochází za přítomnosti vodné kapaliny zvolené ze souboru zahrnujícího tělesné kapaliny, sérum, kapaliny obsahující uhlohydráty, kapaliny obsahující polypeptidy, kapaliny obsahující glykoproteiny a vodu.

19. Přípravek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje faktor začátku mikrobiální replikace produkováný bakteriemi, jehož molekulová hmotnost je nižší než asi 3 000 podle měření filtrací přes membránu vylučující molekuly podle molekulové hmotnosti.

20. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální replikace je resistentní vůči zpracování v autoklávu.

21. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální replikace je izolován ze streptokoků sanguis.

22. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální replikace je izolován z *Streptococcus gordonii* Challis ATCC č. 35105.

23. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální replikace je izolován z *Escherichia coli* 149 ATCC č. 55535.

24. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální replikace stimuluje růst bakterií.

25. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že obsahuje složky zvolené ze sou-
boru zahrnujícího kationty, anionty, enzymy, transportní
polypeptidy, koenzymy, kofaktory a polypeptidy.

26. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální re-
plikace stimuluje růst bakterií při hustotě populace nižší
než je hustota spojená se zvýšením nebo stimulací poměru
aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané
populaci.

27. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální re-
plikace stimuluje nebo zvyšuje růst bakteriálních buněk v
dané populaci za účelem dosažení poměru rostoucích buněk k
životaschopným buňkám v této populaci od asi $5 \times 10^{-4} : 1$
do asi $20 \times 10^{-2} : 1$.

28. Přípravek podle nároku 19, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální re-
plikace je izolován z bakterií rostoucích na povrchu.

29. Přípravek podle nároku 20, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že faktor začátku mikrobiální re-
plikace je izolován z bakterií rostoucích v suspenzi.

30. Způsob zvyšování účinnosti antimikrobiálního
činidla, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se
bakterie uvedou do styku s tímto antimikrobiálním činidlem
za přítomnosti faktoru začátku mikrobiální replikace podle
nároku 19, aby byl iniciován aktivní růst bakterií.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se použije antimikrobiálního činid-
la, které je specifické pro dané bakterie.

32. Způsob stanovení, zda činidlo inhibuje nebo
zvyšuje účinnosti faktoru začátku mikrobiální replikace,
v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

a) populace bakterií uvede do styku s činidlem, o
němž se předpokládá, že zvyšuje nebo inhibuje účinnost
faktoru začátku mikrobiální replikace a s faktorem začátku
mikrobiální replikace podle nároku 19 za vzniku ošetřené
populace,

b) v ošetřené populaci se stanoví podíl rostoucích
bakterií a

c) stanoví se zvýšení nebo inhibice účinnosti
faktoru začátku mikrobiální replikace na základě porovnání
podílu rostoucích bakterií v ošetřené populaci s podílem
rostoucích buněk v bakteriální populaci uvedené do styku s
faktorem začátku mikrobiální replikace.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se rozsah růstu stanoví měřením
množství inkorporovaného radioizotopem značeného nukleoti-
du vztaženého na jednu bakterii.

34. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se jako bakterie použije *Streptoco-
ccus gordonii* Challis ATCC č. 35105.

35. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že bakterie je vázána k povrchu.

36. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že činidlo, o němž se předpokládá, že
inhibuje nebo zvyšuje účinnost faktoru začátku mikrobiální
replikace, je vázán k povrchu.

37. Způsob měření účinnosti faktoru začátku mikro-
biální replikace na bakterie, v y z n a č u j í c í s e
t í m , že se

a) populace bakterií uvede do styku s faktorem za-
čátku mikrobiální replikace podle nároku 19 za vzniku ošet-
řené populace a

b) stanoví se rozsah stimulace mikrobiálního růstu
na základě porovnání mikrobiálního růstu ošetřené populace s
mikrobiálním růstem neošetřené populace bakterií.

38. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se mikrobiální růst stanoví měřením
množství inkorporovaného radioizotopem značeného nukleoti-
du vztaženého na jednu bakterii.

39. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že se jako populace bakterií použije
biologicky čisté populace *Streptococcus gordonii* Challis
ATCC č. 35105.

40. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í -
c í s e t í m , že populace bakterií je vázána k
povrchu.

41. Způsob stimulace mikrobiálního růstu, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že se populace uvede do-
styku s faktorem začátku mikrobiální replikace podle nároku
19 v množství, které je účinné pro zvýšení poměru aktivně

rostoucích buněk k životaschopným buňkám v dané populaci bakterií.

42. Způsob podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se poměr aktivně rostoucích buněk k životaschopným buňkám v populaci zvýší na hodnotu od asi $5 \times 10^{-4} : 1$ do asi $20 \times 10^{-2} : 1$.

43. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že populace bakterií je vázána k povrchu.

44. Způsob podle nároku 41, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že populace bakterií je v suspenzi.

45. Genetická kazeta, která se skládá

a) z první sekvence DNA kódující bakteriální reporterový gen připojené k 3' konci

b) druhé sekvence DNA, která se hybridizuje ke genu nebo části genu, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk a je umístěna v bakteriálním chromosomu za vzniku genetické kazety, v níž druhá sekvence DNA zajišťuje rekombinaci a integraci genetické kazety nebo její části do genu v bakteriálním chromosomu.

46. Genetická kazeta podle nároku 45, v níž první sekvence DNA kóduje bakteriální amylasu.

47. Genetická kazeta podle nároku 45, v níž druhá sekvence DNA kóduje část streptokokového 16S ribosomálního RNA genu.

48. Genetická kazeta podle nároku 45, která dále obsahuje selektovatelný markerový gen připojený k první a druhé sekvenci DNA.

49. Plasmid obsahující genetickou kazetu podle nároku 45.

50. Bakteriální kmen obsahující genetickou kazetu nebo její část podle nároku 45 stabilně integrovanou do bakteriálního chromosomu v místě, jež je pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky.

51. Bakteriální kmen podle nároku 50, kde bakteriální hostitelskou buňkou je *Streptococcus gordonii* Challis kmen MSP818, ATCC č. 69529.

52. Bakteriální kmen podle nároku 50, kde bakteriální hostitelskou buňkou je *Streptococcus gordonii* Challis kmen MSP812, ATCC č. 69528.

53. Bakteriální kmen obsahující genetickou kazetu nebo její část podle nároku 45, přičemž tento bakteriální kmen neobsahuje endogenní sekvenci DNA kódující produkt bakteriálního reporterového genu.

54. Způsob měření účinnosti faktoru začátku mikrobiální replikace, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že se

a) vytvoří populace bakterií, jež obsahuje stabilně integrovanou genetickou kazetu nebo její část pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buňky, přičemž tato kazeta obsahuje

i) první sekvenci DNA kódující produkt bakteriálního reporterového genu připojenou k 3' konci

ii) druhé sekvence DNA, která se hybridizuje ke genu nebo části genu, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk a je umístěna v bakteriálním chromosomu za vzniku genetické kazety, v níž druhá sekvence DNA vykazuje dostatečnou míru totožnosti se sekvencí tohoto genu nebo jeho části, aby došlo k rekombinaci a integraci genetické kazety nebo její části do genu v bakteriálním chromosomu,

b) populace bakterií se uvede do styku s faktorem začátku mikrobiální replikace za vzniku ošetřené populace a

c) stanoví se rozsah mikrobiálního růstu změřením množství produktu reporterového genu produkovaného za jednotku času jednou buňkou v ošetřené populaci ve srovnání s množstvím produktu reporterového genu produkovaného za jednotku času jednou buňkou v neošetřené populaci.

55. Způsob měření mikrobiálního růstu, v y -
z n a č u j í c í s e t í m , že se

a) vytvoří populace bakterií, jež obsahuje stabilně integrovanou genetickou kazetu nebo její část pod kontrolou promotoru, jehož exprese je koordinovaně regulována rychlostí růstu buněk, přičemž tato kazeta obsahuje

i) první sekvenci DNA kódující produkt bakteriálního reporterového genu připojenou k 3' konci

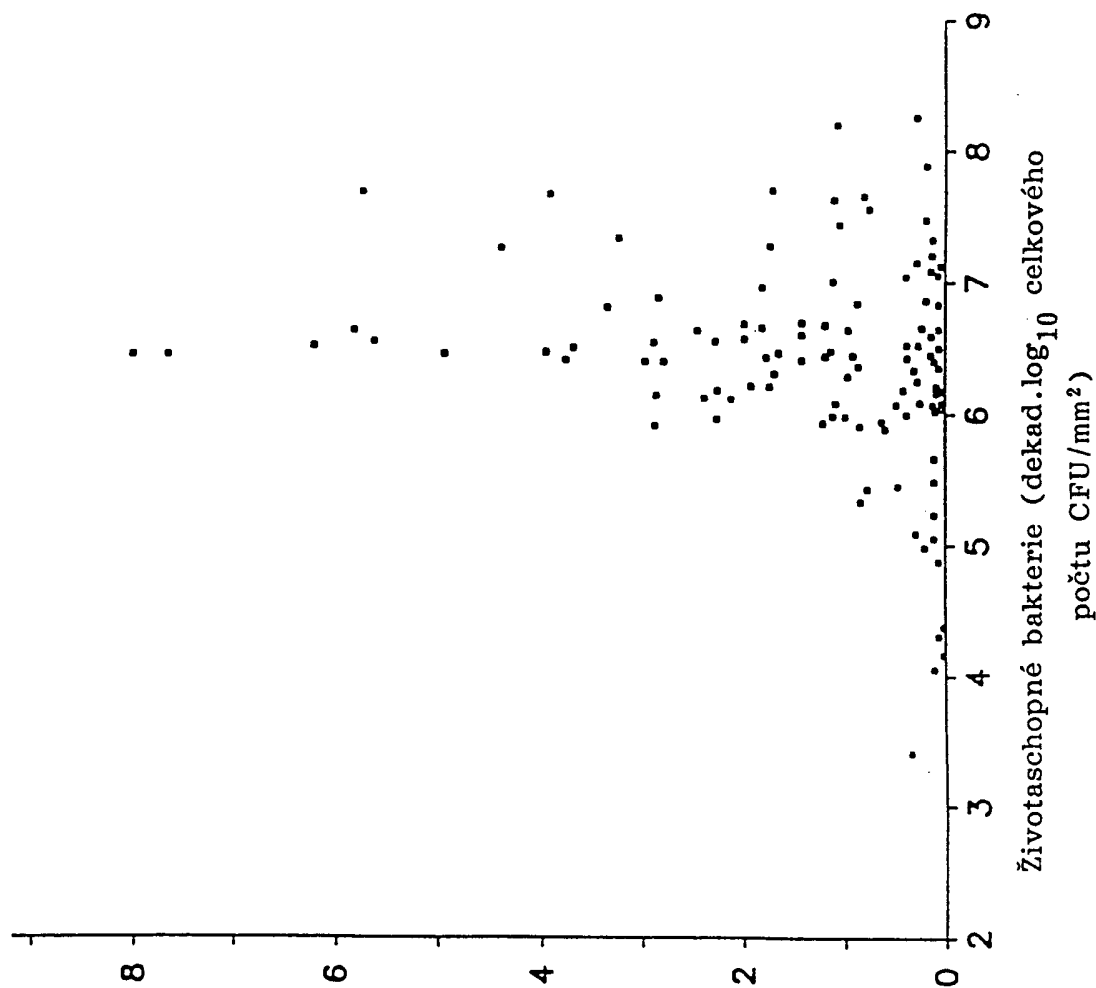
ii) druhé sekvence DNA, která se hybridizuje ke genu nebo části genu, jehož exprese je koordinovaně regulována růstem buněk a je umístěna v bakteriálním chromosomu za vzniku genetické kazety, v níž druhá sekvence DNA vykazuje

zajišťuje rekombinaci a integraci genetické kazety nebo její části do genu v bakteriálním chromosomu a

b) stanoví se množství produktu reporterového genu v populaci.

01-1219-95-Ho

h



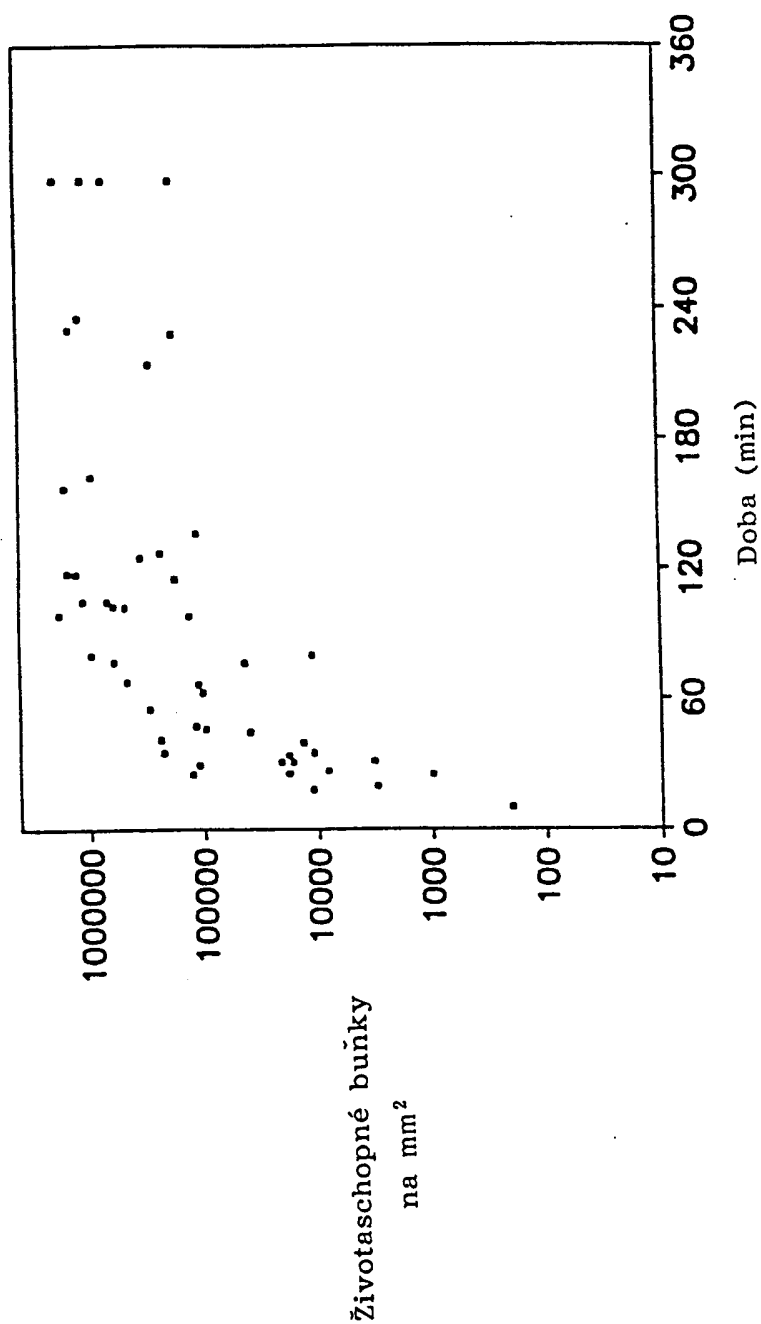
Rostoucí bakterie
(^{3}H -thymidin x 1000 cpm/mm²)

PRŮ.	URAD	96	150
PRŮ.	PRŮ.	0000	0000
PRŮ.	PRŮ.	0000	0000
PRŮ.	PRŮ.	0000	0000
PRŮ.	PRŮ.	0000	0000

Obr. 1A

12

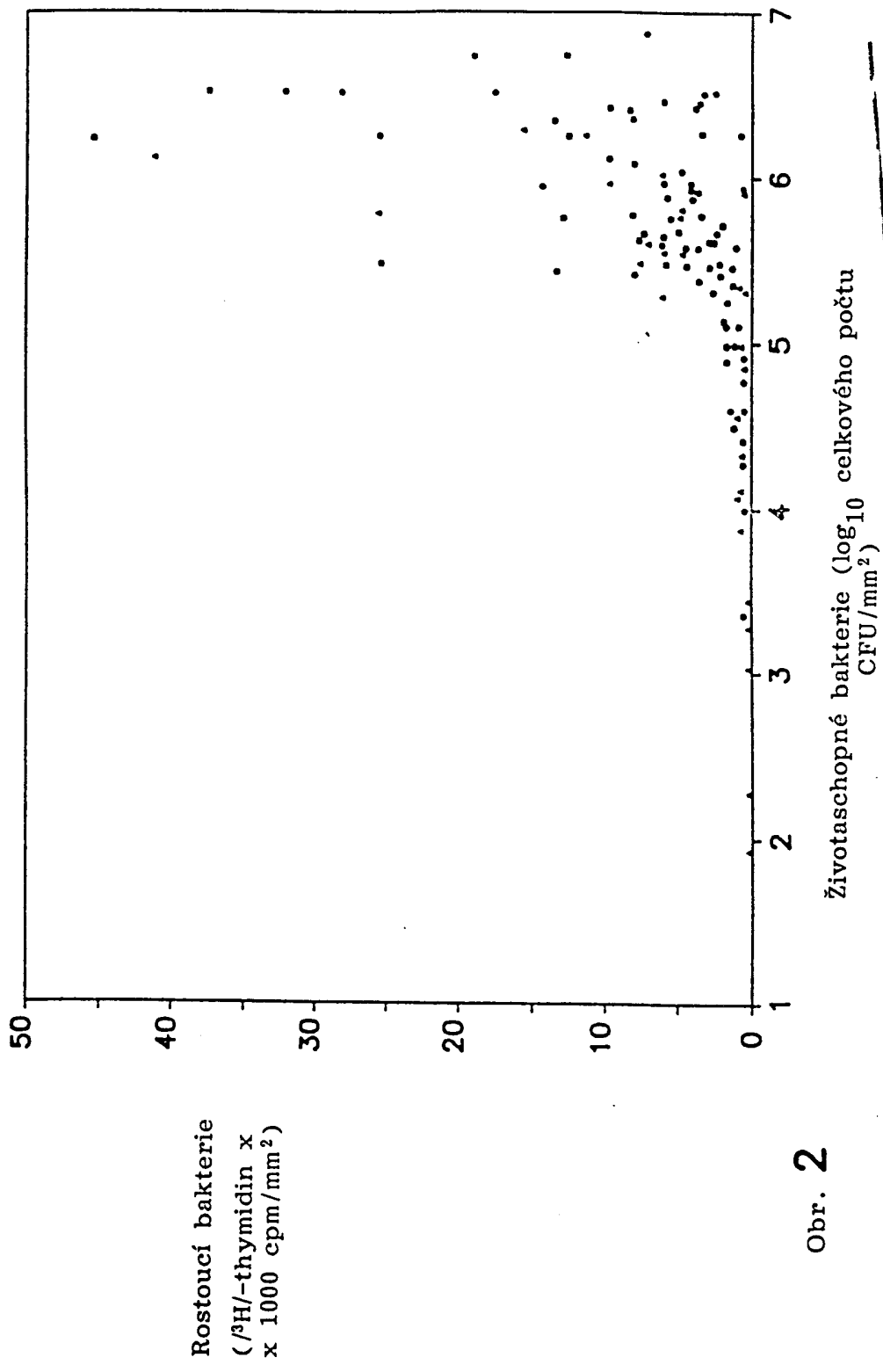
1790-95



Obr. 1B

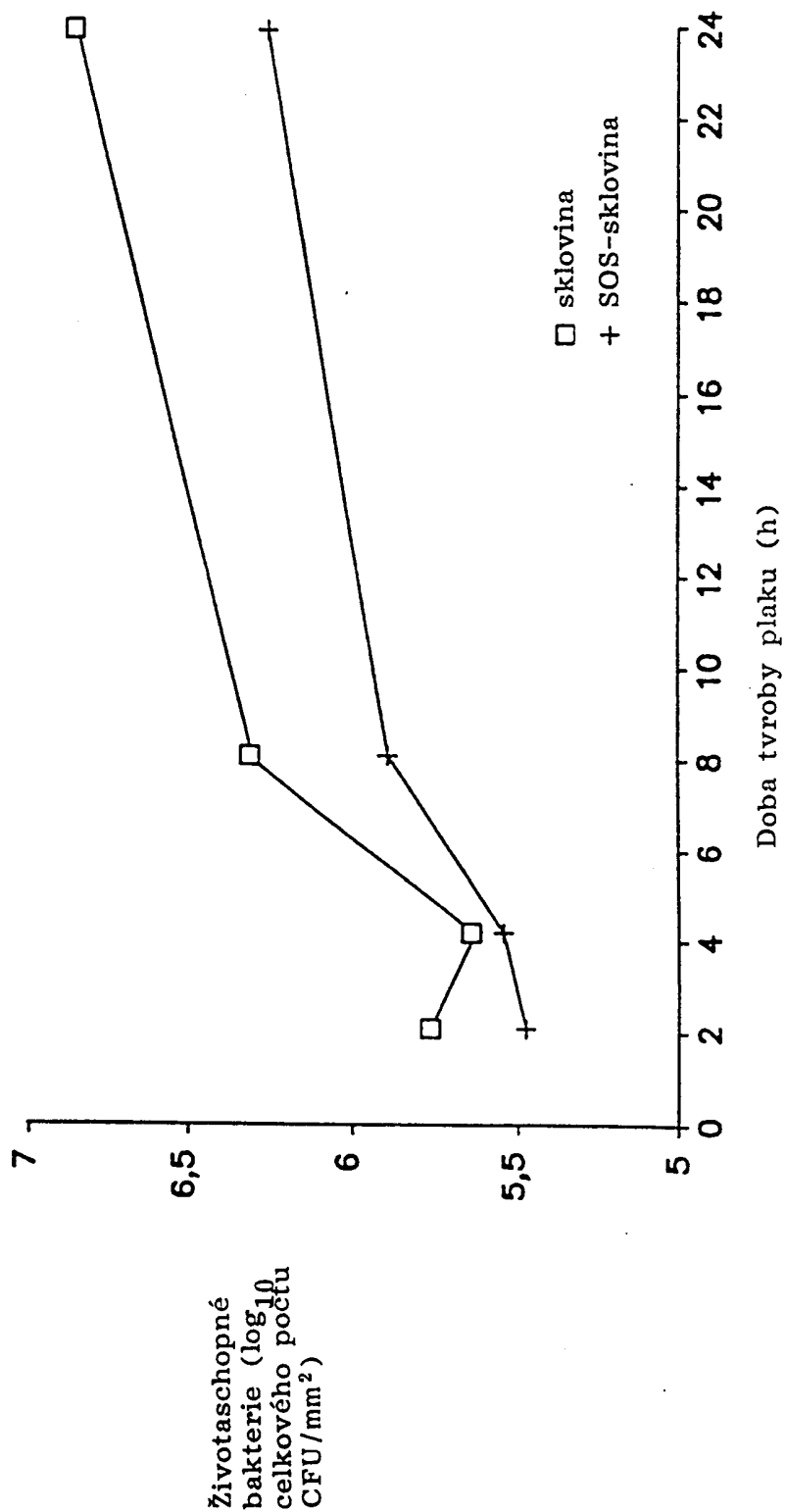
0.5196	0.01208	0.00510	0.5196
0.01208	0.00510	0.5196	0.5196
0.5196	0.00510	0.01208	0.01208
0.00510	0.01208	0.5196	0.5196

11



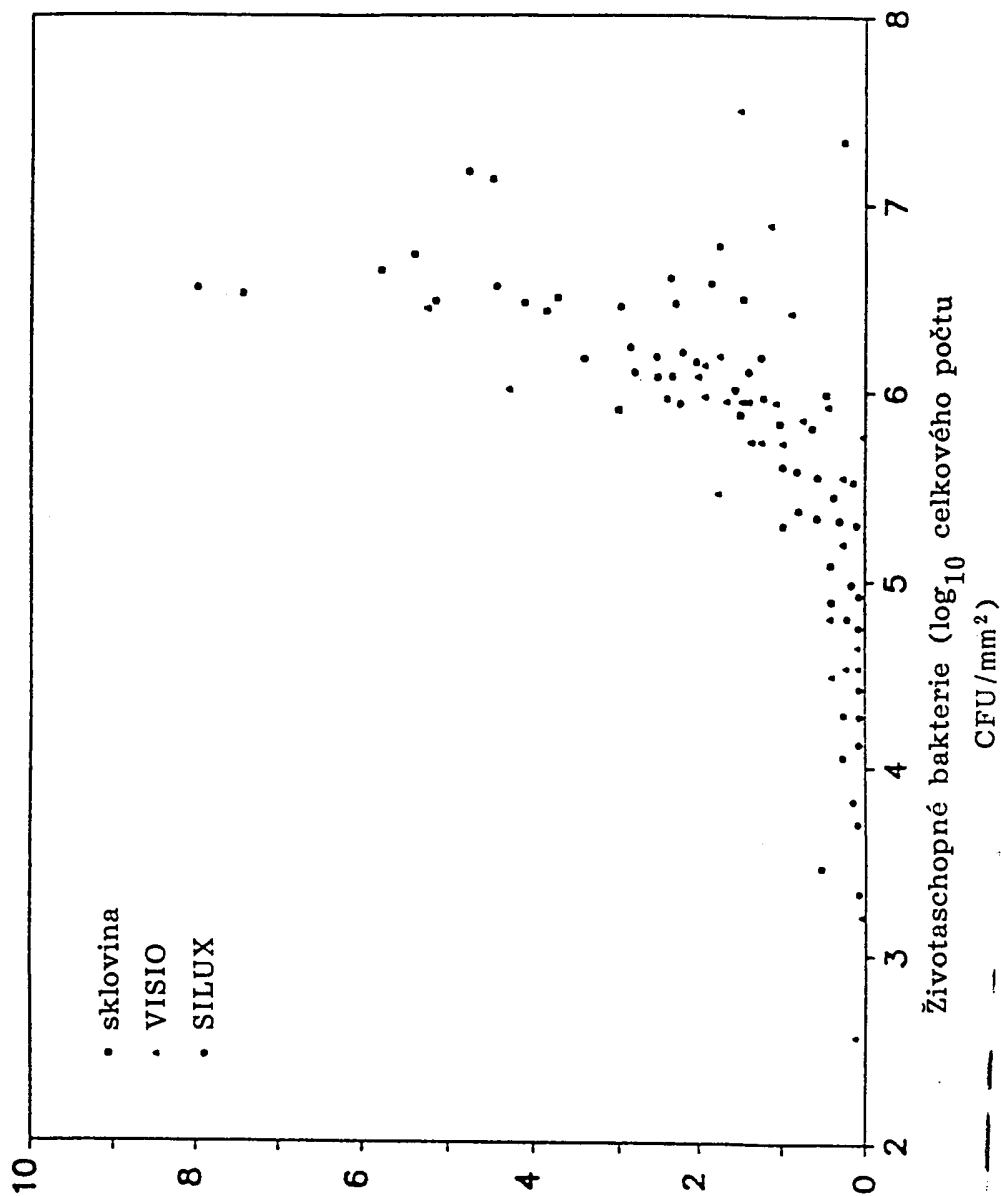
Obr. 2

Pril.
PRŮMYSLOVÉHO
VLAŠTNICTVÍ
URAD
0 0 1 2 0 8
DOŠLO
0 5 1 9 6



Obr. 3

0 0 1 2 0 8	0 5 1 9 6	URAD	PRŮMYŠLOVÉHO	VLASTNICTVÍ	PRÍL.
-------------	-----------	------	--------------	-------------	-------



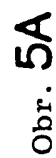
Rostoucí bakterie
(/³H/-thymidin x
x 1000 cpm/mm²)

Obr. 4

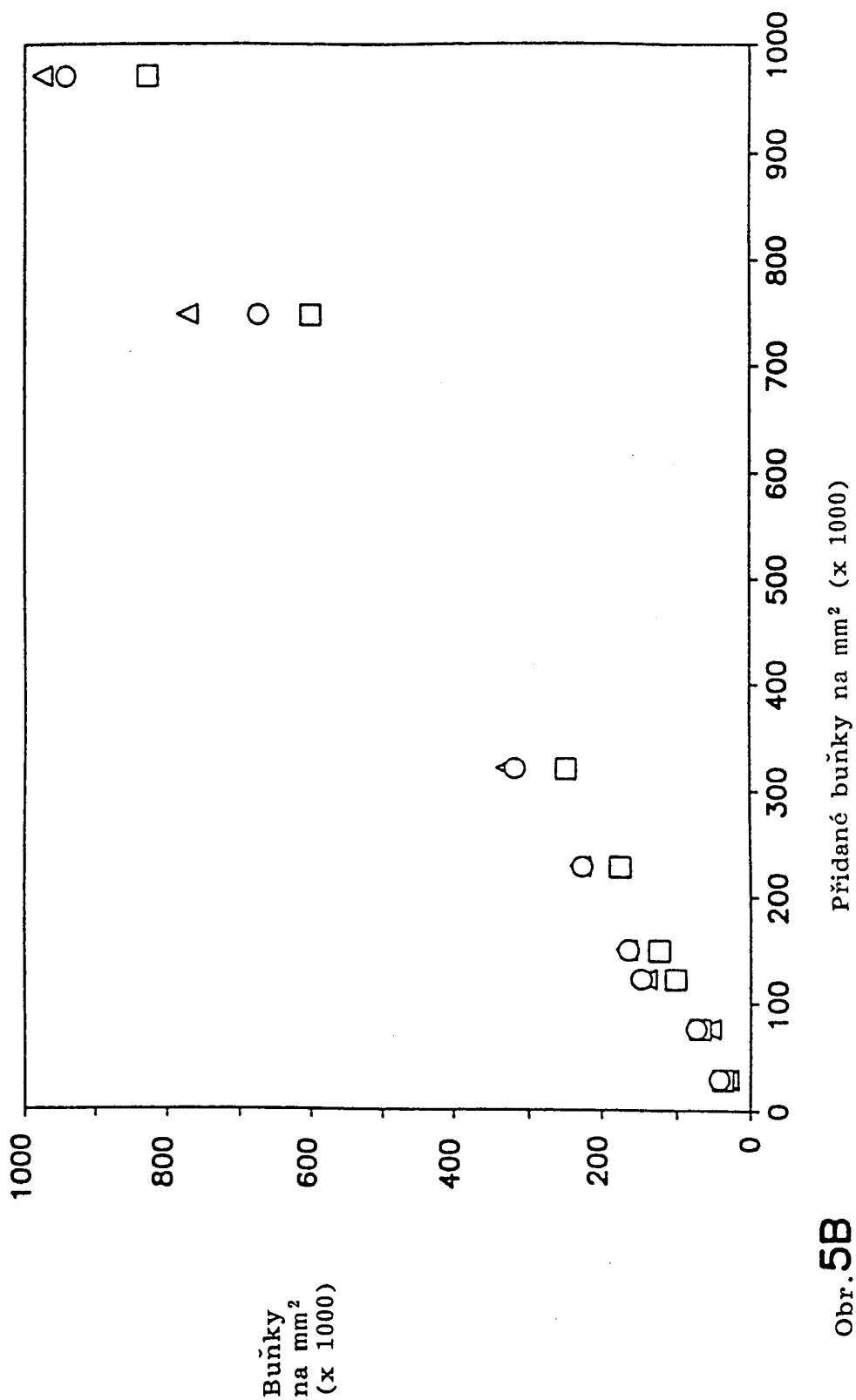
0 0 1 2 0 8	0 5 1 9 6	PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PRIL.
0. J.	DOŠLO	GRAD	

T

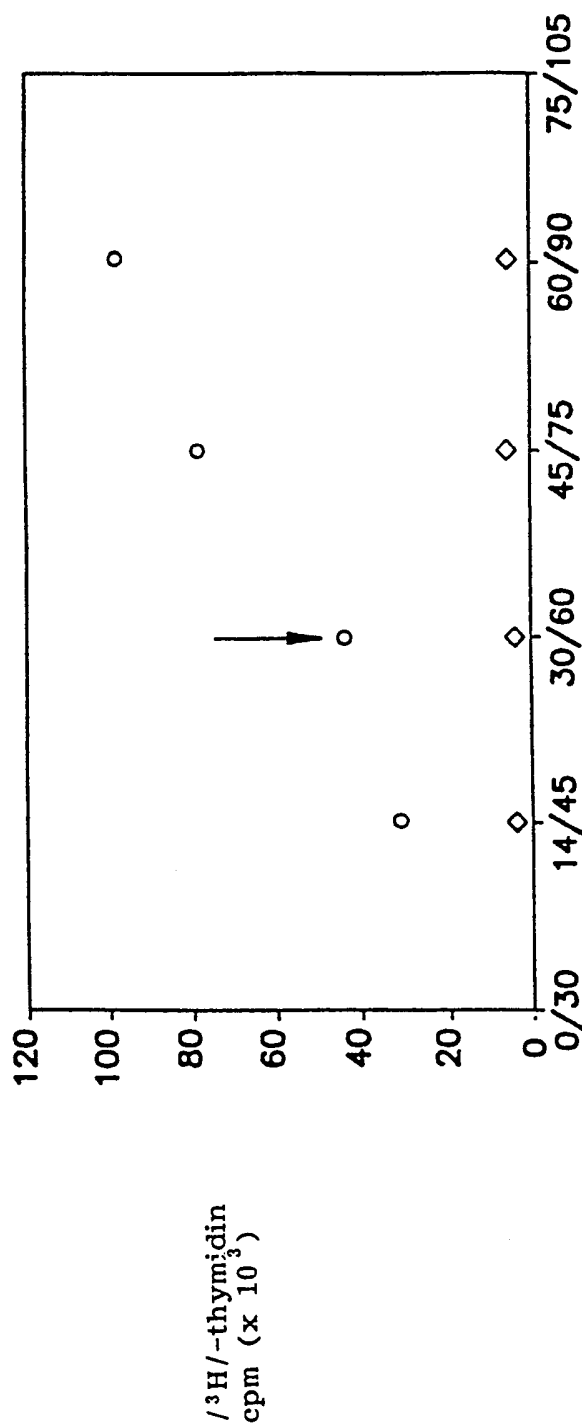
ik



PRIL. 1965
PLASTICITY
PROB. 1965
GRAD
1965
DO 1965
001208
E.J.



Pril.	05	1	96
FORMA LOVĚHO	00510		
LASTIČKOVIT	00510		
GRAD	00510		
PRIL.	05	1	96

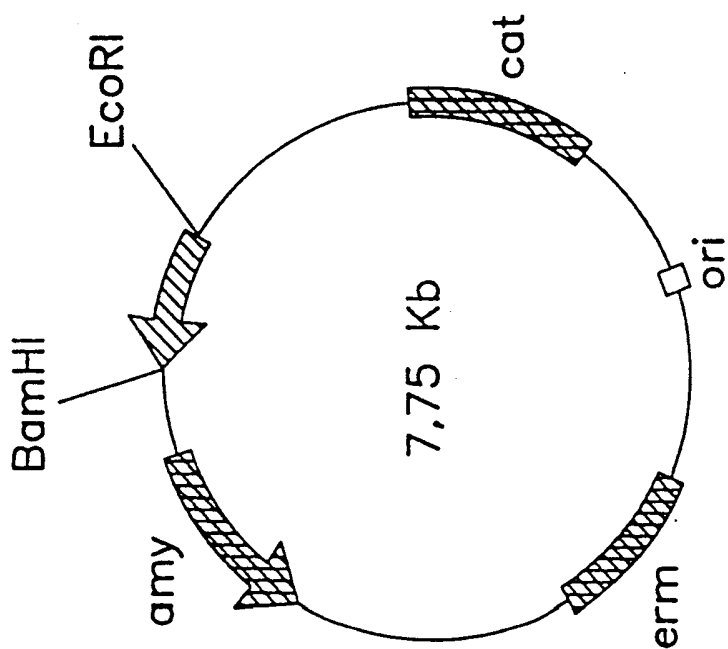


Doba (min) po přidání SMR nebo kontrolního média/
doba sklizně (30 min po přidavku radioaktivní značky)

Obr. 6

0.01208	0.5196	ÚRAD	PRŮMYSLOVÉHO	VLASTNICTVÍ	Přil.
DOŠLO					

He

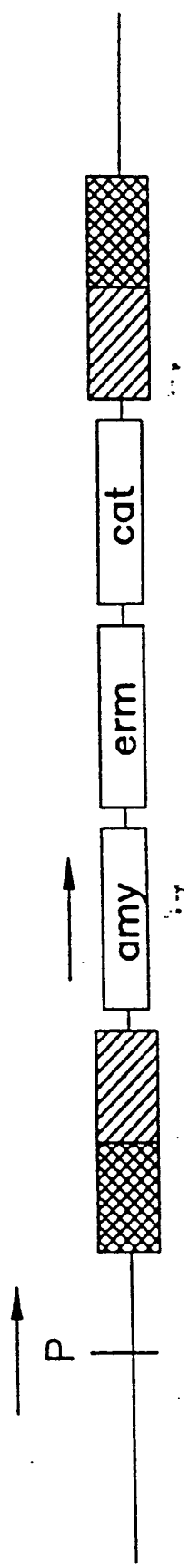


Obr. 7

0 0 1 2 0 8	0 5 1 9 6	PRIL.
DOŠLO	PRŮMYSLOVÉHO	VLASTNICTVÍ
2. J.	URAD	

16

1790-95



Obr. 8

001208	05.1.96	PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.
z.j.			

16