



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208975

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/00

(22) Přihlášeno 31 05 79
(21) (PV 3741-79)

(40) Zveřejněno 30 01 81

(45) Vydáno 01 02 84

(75)

Autor vynálezu

SKALKA BORIS doc. MVDr. ČSc., BRNO a SMOLA JIŘÍ MVDr.,
BOSKOVICE

(54) Způsob výroby prepurifikovaného CAMP-faktoru

Vynález řeší problém výroby biopreparátu vhodného pro diagnostické použití ve veterinární i lékařské mikrobiologii.

Exolátka druhu *Streptococcus agalactiae* označovaná jako CAMP-faktor se dosud získávala filtrací a precipitací. Způsob izolace CAMP-faktoru filtrací bujonové kultury kmene *S. agalactiae* popsali CHRISTIE, R. – ATKINS, N. E. – MUNCH-PETERSEN, E.: A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Austr. J. exp. Biol. Med., 22, 1944, s. 197-200. Nevýhodou tohoto postupu je podle PULSFORD, M. F.: Some factors influencing the production of CAMP faktor by *Streptococcus agalactiae*. Austr. J. Exp. Biol., 32, 1954, s. 353-360, ztráta aktivity CAMP-faktoru, k níž dochází při prostupu filtrem.

Druhý způsob získávání CAMP-faktoru využívá precipitace s použitím etylalkoholu nebo síranu amonného a je popsán v publikaci ESSVELD, H. – DANIELS-BOSMAN, M. S. – LEIJNSE, B.: Some observations about the CAMP reaction and application to human haemolytic streptococci. Antonie van Leeuwenhoek, 24, 1958, s. 145-156. a používá se až dosud. BROWN, J. – FARN-SWORTH, R. – WANNAMAKER, L. W. – JOHNSON, D. W.: CAMP factor of group B streptococci: Production, assay and neutraliza-

tion by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows. Infect. Immunity, 9, 1974, s. 377-383. ESSVELD, H. – MONNIER-GOUDZWARD, C. – EIJK van, H. G. – SOESTBERGEN van, M. G.: Chemical nature of a substance isolated from a group B *Streptococcus* causing the „CAMP“ reaction. Antonie van Leeuwenhoek, 41, 1975, s. 449-454.

BERNHEIMER, A. W. – LINDER, R. – AVIGAD, L. S.: Nature and Mechanism of Action of the CAMP Protein of Group B *Streptococci*. Infection and Immunity, 23, 1979, č. 3, s. 838-844. Tento způsob má především nevýhody zejména v krátkodobé expiraci získaného CAMP-faktoru, nízké výtěžnosti a značné pracnosti výroby. Citovaní autoři nenavrhli výrobu CAMP-faktoru jako biopreparátu.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob výroby prepurifikovaného CAMP-faktoru podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na agarový podklad se navrství film bujonového média s přidanou suspenzí streptokoků skupiny B a nechá se pomnožit 24 až 48 hodin při teplotě 308 K až 311,5 K, smytý nárůst se odstředí a získaný supernatant se smíchá s 1,5 až 3 objemy acetonu ochlazeného na 258 K až 248 K. Ponechá se 1,5 min až 30 min působit, poté se rychle a dokonale odstraní supernatant a sediment, který

208975

je prepurifikovanou formou CAMP-faktoru, se rehydratuje ve sterilní destilované vodě.

Způsob extrakce acetonem je relativně snadný a nejrychlejší z dosud známých metod, což snižuje pracnost i nákladnost výroby. Výťažnost CAMP faktoru je ve srovnání se známými způsoby extrakce několikanásobná, a nadto dochází k bezpečné likvidaci zbytků bakterií. Použití prepurifikovaného CAMP faktoru ve formě biopreparátu s vytitrovaným účinkem zaručuje standardnost výsledků na různých pracovištích a nadto odpadá práce spojená s udržováním testačního kmene, jehož diagnostický efekt může být ovlivněn řadou faktorů. Expirace takto získaného CAMP faktoru převyšuje jeden rok, zatímco v citovaných metodách nepřevýšila expirace jeden měsíc. Lze jím detekovat i nepatrná množství beta-toxinu *Staphylococcus aureus*. Biopreparát umožňuje novou modifikaci metody jedné misky doporučené k detekci stafylokokových hemolysinů. Zajišťuje standardizaci pozitivní kontroly při diagnostice *Streptococcus agalactiae* pomocí exolátů jiných mikroorganismů.

Výroba biopreparátu CAMP faktor je následující. Příklad je uveden na 1000 ml surového produktu.

1. Na pevném médiu se izoluje na jednu kolonii kultura *Streptococcus agalactiae*. Po 24 hodinách inkubace při 310 K se suspenduje 3 až 5 kolonií v 10 ml tekutého média.

2. Na Petriho misky o Ø 15 cm se nalije 15 ml agarového média a nechá ztuhnout.

3. Suspenze streptokoků se přenese do 1000 ml sterilního bujonového média, dobře se promíchá a sterilně se navrství cca 26 ml na agarová média.

4. Takto nakultivované Petriho misky se nechají inkubovat 40 h. při 310 K, nejlépe vložené do igelitových sáčků, a po této době se smyje porost sterilní zahnutou skleněnou tyčinkou a přenese do sterilních centrifugačních kyvet. Odstřeďuje se 1 h při otáčkách 5000 min.⁻¹.

5. Po ukončené centrifugaci se sterilně oddělí supernatant od sedimentu. Sediment se kontroluje kultivačně, izolací na jednu kolonii, na čistotu kmene.

6. Získaný supernatant se považuje za surovou formu streptokokového CAMP faktoru. Jeho aktivita se titruje prepurifikovanou formou stafylokokového beta-toxinu, připravenou známou metodou HAQUE, R. U. – BALDWIN, J. N.: Purification and properties of staphylococcal beta-hemolysin. II. Purification of beta-hemolysin. J. Bacteriol., 100, 1969, s. 751-759.

7. a) Titrace surové formy. Ve zkumavkách se připraví geometrická řada ředění surové formy ve fyziologickém roztoku s 0,001 M finálního obsahu $MgSO_4$ v objemu 0,25 ml.

b) Připraví se směs 2 % suspenze 3 × propných ovčích erytrocytů – dva díly – a stafylokokového beta-hemolysinu s obsahem 20 jednotek aktivity v jednom ml. – jeden díl – a nechá se při pokojové teplotě senzibilizovat.

c) Směs erytrocytů a beta-toxinu (b.) se přidá po 0,75 ml do každé zkumavky.

d) Zkumavky se jedna po druhé neustále protřepávají a sledují, jako pozitivní výsledek se hodnotí úplná hemolýza erytrocytů. Doba pozorování činí 30 až 60 minut.

e) Pro možnost správného hodnocení reakce je nutné provést tyto kontroly: i kontrola surové formy se provádí tak, že ve zkumavkách se připraví její ředění ve fyziologickém roztoku. Do první zkumavky se přenese 0,25 ml koncentrované surové formy CAMP faktoru a od druhé se připraví její ředění 1 : 2 a 1 : 4 v objemu 0,25 ml. Ke každé zkumavce se přidá 0,25 ml fyziologického roztoku (a.) a 0,5 ml 2 % erytrocytů (b.) tak vzniknou konečná ředění surové formy 1 : 4, 1 : 8 a 1 : 16.

ii kontrola erytrocytů se provede smísením 0,5 ml fyziologického roztoku s 0,5 ml 2 % suspenze erytrocytů (b.)

iii kontrola aktivity stafylokokového beta-toxinu se provede tak, že k 0,75 ml připravené směsi erytrocytů a beta-toxinu (b.) se přidá 0,25 ml fyziologického roztoku a inkubuje se 1 hod. při 310 K. Během inkubace se obsah zkumavky každých 10 min. intenzivně protřepe, aby se zabránilo sedimentaci erytrocytů. Po ukončení inkubace se přemísť do chladničkové teploty 277 K, každých 10 min se protřepává a sleduje nejméně 1 h.

iiii Kontrola aktivity beta-toxinu při pokojové teplotě se až na sledování při pokojové teplotě provádí shodně (iii).

f) V kontrole surové formy (i), v kontrole erytrocytů (ii) a v kontrole beta-toxinu při pokojové teplotě nesmí dojít k hemolýze, zatímco v kontrole aktivity beta-toxinu (iii) musí být úplná hemolýza jako důsledek HC efektu.

8. Hodnocení titrace surové formy. Při popsaném postupu je ve zkumavkách ředění surové formy 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 až 1 : 2048. V každé zkumavce je pět jednotek aktivity stafylokokového beta-toxinu s 1 % ovčích erytrocytů, to vše v celkovém objemu 1 ml v každé zkumavce. Za jednotku aktivity, dále J. A. se považuje to poslední ředění surové formy, ve kterém došlo k úplné hemolýze erytrocytů, ke které dochází při vzájemném potencionování CAMP faktoru a stafylokokového beta-toxinu.

9. Extrakce a prepurifikace streptokokové exolátky se provádí precipitací acetonem ochlazeným na 253 K tak, že se k jednomu objemu surové formy přidají 2 objemy acetonu. Po dvouminutovém působení se směs s vytvořeným precipitátem centrifuguje při otáčkách 5000 min.⁻¹ po dobu jedné hodiny.

10. Po ukončení centrifugace se odstraní supernatant a sediment se rehydratuje destilovanou sterilní H_2O , aby vzhledem k výsledku titrace surové formy odpovídal finální obsah cca 5000 jednotek aktivity ml.

11. Popsaným způsobem rehydratovaná prepurifikovaná forma se titruje na skutečný obsah J. A. Připraví se základní ředění 1 : 100 a z něho, vždy

v objemu 0,25 ml ředění 1 : 250, 1 : 500, 1 : 750, 1 : 1000, 1 : 1250, 1 : 1500, 1 : 2000, 1 : 2500, 1 : 3000, 1 : 4000, 1 : 5000. Další postup je stejný jako při titraci surové formy (7.b. – 7.d.). Kontrola prepurifikované formy se provádí v ředění 1 : 1000, kontrola erytrocytů i beta-toxinu odpovídají (7.e.).

12. Hodnocení titrace prepurifikované formy se neliší od hodnocení titrace surové formy (8.). Poslední ředění CAMP faktoru, ve kterém došlo k úplné hemolýze erytrocytů se označuje za J. A. prepurifikované formy. Je tedy obsah J. A. prepurifikované formy v 1 ml roven reciproční hodnotě jejího ředění. V kontrole prepurifikované formy (i), kontrole erytrocytů (ii), stejně jako v kontrole beta-toxinu při pokojové teplotě (iii) nesmí dojít k hemolýze. V kontrole aktivity beta-toxinu (iii) musí být 100 % hemolýza.

13. Po titraci prepurifikované formy se tato upraví na konečnou hodnotu obsahu J. A. v 1 ml – optimálně na obsah 5000 J. A. v 1 ml – označí se jako CAMP faktor a konzervuje se zmrazením při 253 K nebo lyofilizací. Před její konzervací je nutné provést kontrolu sterility preparátu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby prepurifikovaného CAMP-faktoru, vyznačující se tím, že na agarový podklad se navrství film bujonového média s přidanou suspenzí streptokoků skupiny B a nechá se pomnožit 24 až 48 h. při teplotě 308 K až 311,5 K a smytý nárůst se odstředí a získaný supernatant se smíchá s 1,5 až

3 objemy acetonu ochlazeného na 258 K až 248 K a nechá se 1,5 min. až 30 min. působit, poté se směs odstřeďuje 50 až 70 min. pak se rychle a dokonale odstraní supernatant a sediment, který je prepurifikovanou formou CAMP-faktoru, se rehydratuje ve sterilní destilované vodě.