



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208872

(11)

B1

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno
(21)

31 05 1979
PV 3740-79

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/00

(40) Zveřejněno 30 01 81
(45) Vydáno 16 11 83

(75)

Autor vynálezu

SKALKA BORIS doc. MVDr. CSc., BRNO

SMOLA JIŘÍ MVDr., BOSKOVICE

(54)

Způsob výroby prepurifikované sfingomyelinázy D.

Anotace

Způsob výroby prepurifikované sfingomyelinázy D. Vynález je z oboru mikrobiologie, zejména veterinární a lékařské. Účelem vynálezu je jednoduchá metoda pro získání sfingomyelinázy D kultivací kmene producenta v bujonovém filmu na agarovém podkladu a následná extrakce účinné látky acetonem. Odstředěním získaný koncentrát představuje prepurifikovanou formu sfingomyelinázy D, kterou po zjištění aktivity lze ředěním upravit do požadované koncentrace. Biopreparát je použitelný k diagnostickým účelům v lékařské a veterinární mikrobiologii.

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

Exolátka *Corynebacterium pseudotuberculosis* je definována jako sfingomyelináza D s toxickým účinkem PETRIE, G. F. - McCLEAN, D.: Interrelations of *Corynebacterium ovis*, *Corynebacterium diphtheriae* and certain diphtheroid strains derived from the human nasopharynx. J. Pathol. Bacteriol., 39, 1934, s. 635-639. PATOČKA, F. - SOUČEK, A. - MÁRA, M.: New observations on biological properties and toxinogenesis of atypical haemolytic corynebacteria isolated from humans. J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 4, 1960, s. 307-308. SOUČEK, A. - SOUČKOVÁ, A. - MÁRA, M. - PATOČKA, F.: Observations on the biological properties of atypical haemolytic corynebacteria isolated from man as compared with *Cor. haemolyticum*, *Cor. pyogenes bovis* and *Cor. ovis*. II. In vitro investigations. J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 6, 1962, s. 13-23. DOTY, R. B. - DUNNE, H. W. - HOKANSEN, J. F. - REID, J. J.: A comparison of toxins produced by various isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the development of a diagnostic skin test for cases of lymphadenitis of sheep and goats, Am. J. Vet. Res., 25, 1964, s. 1679-1685. SOUČKOVÁ, A. - SOUČEK, A.: Inhibition of the hemolytic action of alpha and beta lysins of *Staphylococcus pyogenes* by *Corynebacterium hemolyticum*, *C. ovis* and *C. ulcerans*. Toxicon, 10, 1972, s. 501-509. SOUČEK, A. - SOUČKOVÁ, A.: Toxicity of bacterial sphingomyelinases D. J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 18, 1974, s. 327-335. Uvedení autoři používali pro izolaci této exolátky precipitaci amonijsulfátem a metylalkoholem. Podobně jako FRASER, G.: The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria, J. Pathol. Bacteriol., 88, 1964, s. 43-53, se zaměřili na interakci získané látky s hemolysin stafylokoků. Nezaměřili se na precizaci její produkce, na expiraci ani na jiné diagnostické využití. Uvedenými autory použitá precipitace je dvoustupňová, metodicky i časově náročná. Z uvedených důvodů je tato metoda nevýhodná pro produkci větších množství prepurifikované sfingomyelinázy D.

Uvedené nevýhody jsou odstraněny způsobem výroby prepurifikované sfingomyelinázy D podle vynálezu, jehož podstatu spočívá v tom, že na agarový podklad se navrství bujonový film s inokulem *Corynebacterium pseudotuberculosis* a nechá se pomnožit 24 až 48 hod. 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., rychle a dokonale se odstraní supernatant a sediment, který je prepurifikovanou formou sfingomyelinázy D, se rehydratuje ve sterilní destilované vodě.

Způsob extrakce a prepurifikace sfingomyelinázy D acetonem je relativně snadný a nejrychlejší z dosud známých metod získávání analogických bakteriálních exolátek. Při použití metody dle vynálezu je výtěžnost ve srovnání s dosud popisovaným způsobem několikanásobná a nad to dochází k bezpečné likvidaci zbytku bakterií. Expirace takto získané sfingomyelinázy D převyšuje jeden rok, zatímco citovaní autoři se o expiraci svých preparátů

nezmiňují. Biopreparát získaný podle vynálezu lze výhodně použít jak v detekci stafylokokových hemolysinů, tak i v novém způsobu určování streptokoků skupiny B.

Příklad

Výroba prepurifikované formy sfingomyelinázy D je následující (příklad je uveden na 1000 ml surového produktu):

1. na pevném médiu se izoluje na růst v jednotlivých koloniích kultura *Corynebacterium pseudotuberculosis* a po 48 hodinách inkubace při 310 K se v 10 ml tekutého média suspenduje 3 až 5 kolonií.
2. Na petriho misky o $\varnothing$ 15 cm se nalezje 15 ml agarového média a nechá ztuhnout.
3. Suspenze korynebakterií (1) se přenesse do 1000 ml bujonového média, dobře se promíchá a sterilně se navrství à 25 ml na agarová média (2).
4. Takto nakultivované Petriho misky se nechají inkubovat 48 h. při 310 K nejlépe vložené do igelitových sáček a po této době se porost smyje sterilní zahnutou skleněnou tyčinkou a přenesse 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 korynebakteriální exolátky. Jeho aktivita se titruje proti prepurifikované formě stafylokokového beta-toxinu, připravované 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. Titrace surové formy (6):
 - a) ve zkumavkách se připraví geometrická řada ředění surové formy ve fyziologickém roztoku s 0,001 M (finální obsah) MgSO_4 , v objemu 0,25 ml;
 - b) ke každému ředění se přidá 0,5 ml 2 % suspenze 3 x propraných ovčích erytrocytů;
 - c) tato směs se inkubuje 1 h. při 310 K. Aby se zabránilo sedimentaci erytrocytů, je nutné směs vždy po 10 min. dobře protřepat;
 - d) po inkubaci (c) se do každé zkumavky přidá 0,25 ml stafylokokového beta-toxinu (6) s obsahem 20 jednotek aktivity v 1 ml;
 - e) zkumavky se dobře protřepou a nechají inkubovat 1 h. při 310 K. Zabránění sedimentace je stejné jako v bodě c);
 - f) po ukončení inkubace (e) se zkumavky přemístí do chladničkové teploty (cca 277 K), protřepávají se po 10 minutách po dobu nejméně jedné hodiny. Potom se reakce hodnotí;
 - g) pro možnost správného hodnocení reakce je nutné udělat tyto kontroly:
 - 1) kontrola surové formy se provádí tak, že se ve zkumavkách připraví její ředění ve fyziologickém roztoku. Do první zkumavky se dá pouze 0,25 ml surové formy, ve druhé a třetí zkumavce se připraví v objemu 0,25 ml její ředění 1:2 a 1:4. Ke každé zkumavce se přidá 0,25 ml fyziologického roztoku (a) a 0,5 ml 2 % ery-

trocytů (b). Tak vzniknou konečná ředění surové formy 1:4, 1:8 a 1:16.

ii) Kontrola erytrocytů se provede smíšením 0,5 ml fyziologického roztoku (a) s 0,5 ml 2 % erytrocytů (b).

iii) Kontrola stafylokokového beta-toxinu (6) se provádí smícháním 0,25 ml beta-toxinu, obsahujícího 20 jednotek aktivity v 1 ml, 0,25 ml fyziologického roztoku (a) a 0,5 ml 2 % erytrocytů (b).

Kontroly se inkubují stejně, jako zkumavky titrace surové formy.

8. Hodnocení titrace surové formy: při popsaném postupu je ve zkumavkách ředění surové formy 1:4, 1:8, 1:16 až 1:2040. V každé zkumavce je pět jednotek aktivity stafylokokového beta-toxinu a 1 % ovčích erytrocytů, to vše v celkovém objemu 1 ml v každé zkumavce. Za jednotku aktivity se považuje to poslední ředění surové formy, které ještě zabrání hemolýze erytrocytů, k níž dochází v důsledku H-C efektu stafylokokového beta-toxinu. Pro hodnocení je významný výsledek v kontrolách. V kontrole surové formy (i), stejně jako v kontrole erytrocytů (ii) nesmí dojít k hemolýze. V kontrole beta-toxinu (iii), musí být úplná hemolýza.

9. Extrakce a prepurifikace korynebakteriální exolátky se dělá precipitací acetonem ochlazeným na 253 K tak, že se k jednomu objemu surové formy (6) přidají dva objemy acetonu. Po dvouminutovém působení se tato směs s vytvořeným precipitátem centrifuguje při 5000 otáčkách za minutu po dobu jedné hodiny.

10. Po ukončení centrifugace se odstraní supernatant a sediment se rehydratuje red. steril. H₂O tak, aby vzhledem k výsledku titrace surové formy (8) odpovídal finální obsah cca 5000 jednotek aktivity na ml.

11. Popsaným způsobem rehydratovaná prepurifikovaná forma (10) se titruje na skutečný obsah jednotky aktivity. Připraví se její základní ředění 1:100 a z tohoto, 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.f). Finální ředění titrované prepurifikované formy jsou: 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 1:8000, 1:10.000, 1:12.000, 1:16.000 a 1:20.000. Kontrola prepurifikované formy se dělá s ředěními 1:250, 1:500 a 1:750. Další postup podle (7.g.i). Kontrola erytrocytů a kontrola beta-toxinu odpovídá (7.g.ii a 7.g.iii).

12. Hodnocení titrace prepurifikované formy je stejné, jako hodnocení titrace surové formy (8). Poslední ředění bránící hemolýze se považuje za jednu jednotku aktivity prepurifikované formy. Je tedy obsah jednotky aktivity v jednom ml rehydratovaného precipitátu (10) roven reciproční hodnotě jeho ředění v titraci.

13. Po vyhodnocení titrace prepurifikované formy se tato upraví na konečnou hodnotu jednotek aktivity v 1 ml - optimálně na 5000 - označí se jako Corex a konzervuje se zmražením na 253 K nebo lyofilizací. Před její konzervací je nutné provést kontrolu sterility získaného preparátu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby prepurifikované sfingomyelinázy D, v y z n a č u j í c í se tím, že na agarový podklad se navrství bujonový film s inokulem *Corynebacterium pseudotuberculosis* a nechá se pomnožit 24 až 48 hod. 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 a nechá se to 1,5 min. až 30 min. působit, poté se směs odstřeďuje 50 až 70 min., poté se rychle a dokonale odstraní supernatant a sediment, který je prepurifikovanou formou sfingomyelinázy D se rehydratuje ve sterilní destilované vodě.