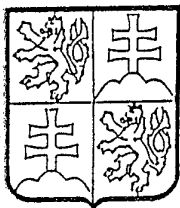


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277248

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 4549-90

(22) Přihlášeno : 19.09.90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 Q 1/04

(40) Zveřejněno : 15.04.92

(47) Uděleno : 26.10.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 16.12.92

(73) Majitel patentu : Nikš Milan doc. MUDr. CSc., Bratislava, CS

(72) Původce vynálezu : Nikš Milan doc. MUDr. CSc., Bratislava, CS;
Otto Matthias RNDr. CSc., Bratislava, CS

(54) Název vynálezu : Spôsob kvantitatívneho hodnotenia účinku
antibakteriálnych látok "in vitro"

(57) Anotace :

Za vhodných rastových podmienok sa paralelne porovnáva rast a rozmnožovanie kontrolnej a rôznymi koncentraciami antimikrobiálnej látky ovplyvnených bakteriálnych kultúr. Na kvantitatívne hodnotenie životnosti a rastových vlastností baktérií sa do kultivačného prostredia pridá vo vode rozpustná soľ tetrazóliového farbiva, výhodne 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid v konečnej koncentrácii 0,005 až 5,0 g/l, výhodne 0,25 g/l, redukcia pridaného tetrazóliového farbiva prebieha vo všetkých kultúrach paralelne a presne ohraničenú dobu, výhodne 15 minút, po ktorej sa reakcia ukončí a vo vode rozpustný farebný produkt sa solubilizuje pridaním zmesi detergentu a organického rozpúšťadla, množstvo vytvoreného farebného produktu sa kvantitatívne určí spektrofotometricky, výhodne v oblasti jeho absorpčného maxima, a podľa množstva vytvoreného farebného produktu sa určí koncentrácia a antimikrobiálnej látky potrebná pre dosiahnutie požadovaného bakteriostatického, alebo bakteriocídneho účinku na vyšetrovanú kultúru mikroorganizmov.

Vynález sa týka postupu na "in vitro" hodnotenie účinku antibakteriálnych látok na základe merania kvantitatívnych zmien rastu a rozmnožovania baktérií pomocou spektrofotometrickej metódy, pri ktorej množstvo za určitý čas živými organizmami vytvorené farebného produktu priamo závisí od ich počtu a metabolickej aktivity.

Hodnotenie počtu, rastu a rozmnožovania baktérií "in vitro" sa v praxi často využíva pri posudzovaní účinnosti antimikrobiálnych látok. Jednou zo základných požiadaviek kladených na takéto stanovenie je popri presnosti a jednoduchosti aj jeho rýchlosť.

Pre rýchle stanovenie počtu, rastu a rozmnožovania baktérií sa doposiaľ vyvinulo niekoľko postupov:

1. Priame mechanické, alebo elektronické počítanie častíc (Pringle, J.R. Mor, J.R.: Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem. Methods Cell. Biol., XI, 1975, 153-168).
2. Fotometrické meranie zmien zákalu (turbidimetria), alebo rozptylu svetla (nephelometria) prechádzajúceho suspenziou baktérií (Koch, A.L.: Theory of the angular dependence of light scattered by bacteria and similar-sized biological objects. J. Theor. Biol., 18, 1968, 133-156).
3. Meranie zmien elektrickej impedancie v kultúre rastúcich mikroorganizmov (Ur. A., Brown, D.F.J.: Rapid detection of bacterial activity using impedance measurement. J. Biomed. Eng., 9, 1974, 18-20, patent US 4528270).
4. Mikrokalorické meranie v kultúre rastúcich mikroorganizmov (Binford, J.S., Binford, L.S., Adler, P.: A semiautomated microcalorimetric method of antibiotic sensitivity testing. Am. J. Clin. Pathol., 59, 1973, 86-94).
5. Meranie zmeny pH spôsobenej skvasovaním glukózy v nepufrovanom kultivačnom médiu (čs. patent 215861),
6. Meranie množstva živými baktériami vytvoreného ATP (Karl, D.M.: Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology, Microbiol. Rev., 44, 1980, 739-796).
7. Radiometrické metódy (De Blanc, J.J., Charache, P., Wagner, H.N.: Automatic radiometric measurement of antibiotic effect on bacterial growth. Antimicrob. Agents Chemother., 2, 1972, 360-366).
8. Kvantitatívne meranie množstva enzýmov uvoľnených rastúcimi baktériami do kultivačného prostredia pomocou fluorogénnych substrátov (Philips, I., Waren, C., Waterworth, P.M.: Determination of antibiotic sensitivities by Sensititre system. J. Clin. Pathol., 31, 1978, 531-535).

Metódy podľa uvedených príkladov majú viaceré nedostatky, ktoré spočívajú najmä v nutnosti používať suspenziu mikroorganizmov o hustote až $3 \times 10^8/\text{ml}$ (postupy 2,4), zložitosti postupu a prácnosti metódy (1, 4, 6), požiadavke na zložité vyhodnocova-

cie zariadenie (3, 4,, 6, 7, 8), nutnosti pracovať s radioaktívnymi látkami (7) a komplikovanom rozlíšení medzi stupňom meranej aktívnej odpovede od pozadia a nešpecifických artefaktov (8).

Uvedené nedostatky odstraňuje postup kvantitatívneho hodnotenia účinku antibakteriálnych látok "in vitro" podľa vynálezu, ktorý spočíva v kvantitatívnom hodnotení zmien počtu, rastu a rozmnožovania živých, metabolicky aktívnych bakteriálnych buniek na základe nimi spôsobenej redukcie soli tetrazóliového farbiva. Pri reakcii, ktorá prebieha výlučne v živých bunkách, dochádza k interakcii medzi tetrazóliovou soľou a cytochrómovým systémom bakteriálnej bunky, pričom sa tetrazóliová soľ redukuje za vzniku farebného produktu, ktorého množstvo je úmerné počtu a metabolickej aktivity prítomných bakteriálnych buniek.

K výhodám postupu podľa vynálezu v porovnaní s doterajšími prístupmi patrí vysoká citlivosť (na stanovenie stačí už hustota bakteriálnej suspenzie $2 \times 10^4/\text{ml}$), reakcie prebieha výlučne v živých bunkách, minimálny potrebný reakčný čas sa podľa metabolickej aktivity pre väčšinu baktérií pohybuje v rozmedzí 1 až 30 minút. Metodický postup je jednoduchý a nevyžaduje žiadne separačné kroky, čo spolu so spektrofotometrickým spôsobom vyhodnocovania vytvára vhodné podmienky pre jednoduchú automatizáciu. Finančné náklady na stanovenie sú nižšie než pri porovnateľných metódach.

Možnosti použitia postupu podľa vynálezu sú objasnené na príkladoch rýchleho stanovenia citlivosti baktérie *Escherichia coli* na rôzne koncentrácie bakteriostatického antibiotika tetracyklínu (A) a bakteriocídneho antibiotika s rýchlym nástupom účinkom kolicínu (B).

Príklad A. Hodnotenie antibakteriálneho účinku tetracyklínu.

Do jednotlivých jamiek mikrotestovej platničky s 96 jamkami s plochým dnom sa napipetuje 100 ul bojárny podľa Mueller-Hintonovej, s klesajúcimi koncentraciami tetracyklínu (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 a 0 ug/ml). V tomto bujárne sa pripraví suspenzia z 18 hodinovej kultúry baktérie *Escherichia coli* o hustote 1×10^6 baktérií/ml. Do jamiek s antibiotikom sa pridá 100 ul bakteriálnej suspenzie, čím sa dosiahnu výsledné koncentrácie antibiotika 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 0,25 a 0 ug/ml. Kontrolná jamka obsahuje namiesto bakteriálnej suspenzie len čistý Mueller-Hintonovej bujárny. Platnička sa umiestni do termostatu a inkubuje pri 35 °C 120 minút. Po inkubácii sa do všetkých jamiek pridá 20 ul 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyl tetrazolium bromidu vo fyziologickom roztoku, koncentrácia 2,5 mg/ml) a inkubuje sa ďalších 15 minút v termostate pri 35 °C. Potom sa do všetkých jamiek pridá 50 ul solubilizačného roztoku (20% SDS v 50% vodnom roztoku N,N-dimetylformamidu, pH upravené HCl a kyselinou octovou na 4,7). Obsah jamiek sa premieša a platničky sa inkubujú ďalších 5 minút pri 35 °C. Absorbancia v jednotlivých jamkách sa zmeria pomocou spektrofotometra (ELISA reader) pri 550 nm (špecifická absorbancia) a pri 630 nm (nešpe-

cifická absorbanca). Namerané korigované hodnoty absorbancie (E_{550} - E_{630}) sa vynesú v lineárnom zobrazení oproti koncentrácii antibiotika a zostrojí sa príslušná krivka (obr. 1). Účinnosť antibiotika na testovaný bakteriálny kmeň sa posúdi z priebehu získanej krivky.

Príklad B. Hodnotenie antibakteriálneho účinku kolistínu.

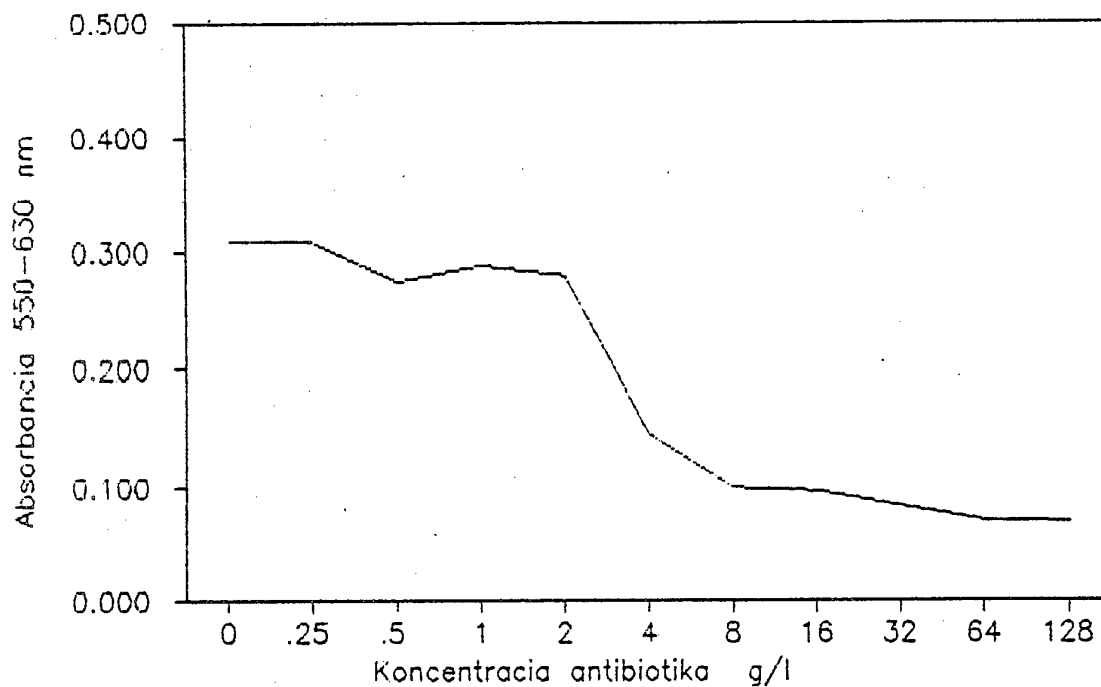
Postupuje sa zhodne ako v príklade A, len antibiotikum tetracyklín sa nahradí antibiotikom kolistín. Hodnotenie výsledkov je rovnaké ako v príklade A, pričom pokles absorbancie na "nulovú hodnotu (obr. 2) znamená usmrtenie baktérií vo vyšetrovanej suspenzii.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Spôsob kvantitatívneho hodnotenia účinku antibakteriálnych látok "in vitro", pri ktorom sa za vhodných rastových podmienok paralelne porovnáva rast a rozmnožovanie kontrolnej a rôznymi koncentráciami antimikrobiálnej látky ovplyvnený bakteriálnych kultúr, vyznačený tým, že sa kvantitatívne hodnotenie životnosti a rastových vlastností baktérií sa do kultivačného prostredia pridá vo vode rozpustná soľ tetrazóliového farbiva, výhodne 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid v konečnej koncentrácii 0,005 až 5,0 g/l, výhodne 0,25 g/l, redukcia pridaného tetrazóliového farbiva prebieha vo všetkých kultúrach paralelne a presne ohraničenú dobu, výhodne 15 minút, po ktorej sa reakcia ukončí a vo vode rozpustný farebný produkt sa solubilizuje pridaním zmesi detergentu a organického rozpúšťadla, množstvo vytvoreného farebného produktu sa kvantitatívne určí spektrofometricky, výhodne v oblasti jeho absorpčného maxima, a podľa množstva vytvoreného farebného produktu sa určí koncentrácia antimikrobiálnej látky potrebná pre dosiahnutie požadovaného bakteriostatického, alebo bakteriocídneho účinku na vyšetrovanú kultúru mikroorganizmov.

1 výkres

OBR. 1



OBR. 2

