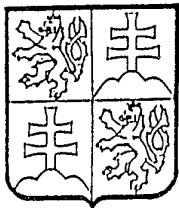


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277170

(11) Číslo dokumentu :

(21) Číslo přihlášky : 2042-91

(22) Přihlášeno : 03.07.91

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 Q 1/20

(40) Zveřejněno : 18.11.92

(47) Uděleno : 30.09.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

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

(72) Původce vynálezu : Nikš Milan doc. MUDr. CSc., Bratislava, CS

(54) Název vynálezu : Spůsob kvantitativního "in vitro" stanovování citlivosti
bakterií a kvasiniek na antimikrobiální látky

(57) Anotace :

Riešenie sa týka spôsobu kvantitatívneho "in vitro" stanovovania citlivosti baktérií a kvasiniek v kultivačných pôdach a biologickom materiáli na antimikrobiálne látky indikáciou zmeny rastu definovanej koncentrácie a objemu suspenzie mikroorganizmov v tekutom kultivačnom médiu. Kultivácia mikroorganizmov sa uskutočňuje na savom podklade vo forme jedného alebo viacerých mikroterčikov v obmedzenom uzavretom priestore, pričom mikroterčíky sú vzájomne oddelené, aby nedošlo k zmiešavaniu jednotlivých vzoriek. Indikácia rastu sa uskutočňuje rôznymi spôsobmi, napr. pomocou redox indikátora. Mikroterčíky sa pred použitím napustia roztokom antimikrobiálnej látky a rozpúšťadlo sa po napustení odstráni.

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu kvantitatívneho "in vitro" stanovovania citlivosti baktérií a kvasiniek v kultivačných pôdach a biologickom materiáli na antimikrobiálne látky.

Doterajší stav techniky

Na "in vitro" stanovovanie citlivosti mikroorganizmov na antimikrobiálne látky sa v praxi používajú "difúzne" alebo "dilučné" metódy. Pri difúznej metóde sa v pevnej pôde v Petriho miske s naočkovanými mikroorganizmami vytvorí jamka, do ktorej sa napipetuje roztok s presným množstvom antimikrobiálnej látky. Antimikrobiálna látka difunduje počas inkubácie do pôdy a vytvorí v okolí disku koncentračný gradient. Antimikrobiálny účinok testovanej látky sa hodnotí na základe vzniku "zóny zábrany rastu" mikroorganizmov v okolí jamky. Pri alternatívnom postupe sa na povrch pôdy prikladajú zásobné disky z inertnej savej hmoty, zvyčajne filtračného papiera, impregnované presným množstvom antimikrobiálnej látky, ktorá z disku difunduje do pôdy v okolí disku. Kontakt medzi mikroorganizmom a antimikrobiálnou látkou prebieha v kultivačnom médiu, mimo disku. Nevýhody difúznej metódy sú predovšetkým v tom, že aj pri kvantifikovaní priemeru inhibičnej zóny hodnotenie poskytuje len kvalitatívny výsledok. Na hodnotenie je potrebné dosiahnuť makroskopicky zistiteľný rast mikroorganizmov na pôde, preto sa test hodnotí po 24 hodinách. Okrem toho táto metóda vyžaduje veľkú spotrebu kultivačných médií a reagensí.

Pri kvantitatívnych dilučných metódach sa definované množstvo antimikrobiálnej látky najskôr rozpustí v pôde v osobitnej reakčnej nádobke. Okrem priameho pridania antimikrobiálnej látky sa ako jej zdroj môžu použiť aj zásobné disky zo saveho materiálu impregnované požadovaným množstvom antimikrobiálnej látky, ktoré sa pred testom vložia do reakčných nádobiek s kultivačnou pôdou. Po elúcii antimikrobiálnej látky z disku do pôdy sa musí disk z pôdy odstrániť, alebo sa kultivačná pôda premiestni do inej, meracej nádobky. Nutnosť odstraňovať disky z kultivačnej pôdy eliminuje riešenie podľa patentu GB 1057000, pri ktorom sa používajú disky z materiálu rozpustného v kultivačnom médiu. Potom sa do nádobiek pridá testovaný mikroorganizmus, kultivuje sa a rast sa vyhodnotí.

Nevýhodou tejto metódy je, že vyžaduje technologicky náročnú prípravu viacerých pôd s rôznymi riedeniami antimikrobiálnej látky a skladovanie vopred pripravených kultivačných pôd s antimikrobiálnymi látkami je problematické; pokiaľ roztok antimikrobiálnej látky v kultivačnej pôde nie je pred skladovaním lyofylozovaný, jeho stabilita je obmedzená, a to aj pri skladovaní v zmrazenom stave. Pred vlastným testovaním sú nutné ďalšie operácie, napr. rozpúšťanie a vytemperovanie zmrazených súprav resp. rozpustenie lyofylozovaných pôd pred testovaním, alebo miešanie vzoriek počas rozpúšťania.

V prípade dávkovania antimikrobiálnej látky pomocou nosičov (tablety, disky) do základnej kultivačnej pôdy v reakčných nádobkách tesne pred testom pribúda manipulácia s veľkým počtom rôz-

nych nosičov. Postup je časovo náročný, málo efektívny a zvyšuje sa riziko kontaminácie pôd.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsob kvantitatívneho "in vitro" stanovovania citlivosti baktérií a kvasiniek na antimikrobiálne látky podľa vynálezu, indikáciou rastu definovanej koncentrácie a objemu suspenzie mikroorganizmov v tekutom kultivačnom médiu pri rôznych koncentráciách antimikrobiálnych látok nanesených na savom podklade. Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultivácia mikroorganizmov sa uskutočňuje na savom podklade vo forme jedného alebo viacerých mikroterčikov umiestnených v obmedzenom uzavretom priestore, pričom mikroterčíky sú vzájomne oddelené tak, aby nedošlo k zmiešaniu jednotlivých vzoriek. Rast mikroorganizmov prebieha jednak na povrchu mikroterčíka a jednak v jeho póroch. Indikácia rastu sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, s výhodou pomocou redox indikátora (napríklad soľ tetrazóliového farbiva). Mikroterčíky sa pred použitím napustia roztokom s definovaným množstvom antimikrobiálnej látky a rozpúšťadla sa odstráni (napr. sušením).

Výhodou spôsobu podľa vynálezu je predovšetkým jeho jednoduchosť spočívajúca v nenáročnej príprave testovacích súprav s veľkým počtom rôznych riedení antimikrobiálnych látok. Skladovateľnosť pripravených súprav je jednoduchá (menšie nároky na skladovaciu teplotu); skladovanie samotných antimikrobiálnych látok v suchom stave umožňuje predĺžiť dobu použitia a rozšíriť výber antimikrobiálnych látok. Pripravené testovacie súpravy možno použiť priamo bez ďalších operácií (rozmrazovanie, rozpúšťanie lyofylizátu). Okrem toho je tu možnosť voľby kultivačnej pôdy priamo pri príprave suspenzie testovaných mikroorganizmov.

Vzhľadom na skutočnosť, že rast prebieha v minimálnom reakčnom objeme (mikroterčík), odpadá nutnosť používania osobitných reakčných nádobiek a možno pracovať s extrémne malým množstvom reagensov. S tým súvisí najmä zníženie nárokov na likvidáciu infekčného biologického odpadového materiálu.

Príklad uskutočnenia vynálezu

Príklad

Kvantitatívne stanovenie citlivosti G-baktérií na antibiotiká netilmycín, cefalotín, ofloxacilín a tetracyklín.

Na platničku z nezmáčavej umelej hmoty s hydrofóbnym povrchom sa pripevnia mikroterčíky z bieleho filtračného papiera, ktorý bol vopred premytý najprv 1krát v 0.1 NHCl a potom 2krát v deionizovanej vode. Rozmery mikroterčíkov sa volia tak, aby na platničke vznikli 4 rady po 10 mikroterčíkov, každý s plochou cca $0,8 \text{ cm}^2$, oddelených priestormi bez filtračného papiera o šírke 1,5 mm. Pomocou lepiacej pásky sa na platničku upevní rovné viečko z umelej hmoty s hydrofóbnym povrchom. Platnička sa sterilizuje etylénoxidom.

Po vysterylizovaní platničky sa za sterilných podmienok do každého mikroterčíka mikropipetou pridá 4 μl roztoku vyšetrova-

ných antibiotík v destilovanej vode tak, aby jednotlivé mikroterčičky obsahovali 0,64, 0,32, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005 a 0,000 µg antibiotika. Do posledného mikroterčička v rade sa ako kontrola zábrany rastu pridá vhodný roztok azidu sodného (výsledný obsah v mikroterčičku je 100 µg). Platnička sa po pridaní roztokov umiestni do sušičky a pri 37 °C sa suší 30 minút. Potom sa viečko uzavrie a platnička sa zataví do plastického nepriedušného vrecúška.

Pri vykonaní spôsobu stanovenia citlivosti podľa vynálezu sa pripraví suspenzia vyšetrovaného kmeňa baktérií (napríklad *Escherichia coli* v Mueller-Hintonovej bujóne) a koncentrácia mikroorganizmov sa upraví na 1×10^6 /ml. Rúrkovým aplikátorom sa preniesie do každého mikroterčička 10 µl pripravenej suspenzie, platnička sa prikryje viečkom a hermeticky uzavrie do tesného plastického sáčku, aby sa zabránilo odparovaniu vody z mikroterčičkov. Platnička sa inkubuje pri 37 °C 4 až 6 hodín. Potom sa do každého mikroterčička rúrkovým aplikátorom pridá 2 µl farebného indikátora - roztoku MTT (5 mg/ml 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2, 5-difenylyl-tetrazolium bromid vo fyziologickom roztoku), platnička sa opäť uzavrie do plastického vrecúška a inkubuje 30 minút pri 37 °C.

Po inkubácii sa platnička vyberie z vrecúška a podľa zmeny farby indikátora sa hodnotí rast mikroorganizmov v jednotlivých mikroterčičkoch. Zmodranie mikroterčička indikuje rast baktérií (nedošlo k ovplyvneniu antimikrobiálnou látkou), nezmenená farba znamená antibakteriálny účinok vyšetrovanej látky pri danej koncentrácii. Podľa prvého mikroterčička s nezmenenou farbou v rade klesajúcich koncentrácií testovaného antibiotika sa určí jeho minimálna inhibičná koncentrácia.

Oblasť priemyselnej využiteľnosti

Vynález je možné využiť v mikrobiologickej diagnostike (zdravotníckej, veterinárnej, priemyselnej a potravinárskej).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob kvantitatívneho "in vitro" stanovovania citlivosti baktérií a kvasiniek v kultivačných pôdach a biologickom materiáli na antimikrobiálne látky indikáciou zmeny rastu definovanej koncentrácie a objemu suspenzie mikroorganizmov v tekutom kultivačnom médiu pri rôznych koncentráciách antimikrobiálnych látok nanesených na savom podklade, vyznačujúci sa tým, že kultivácia mikroorganizmov sa uskutočňuje na savom podklade vo forme jedného alebo viacerých mikroterčíkov v obmedzenom uzavretom priestore, pričom mikroterčíky sú navzájom oddelené tak, aby nedošlo k zmiešavaniu jednotlivých vzoriek.
2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že po napustení mikroterčíkov roztokom antimikrobiálnej látky sa rozpúšťadlo odstráni.

Konec dokumentu
