



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251396

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 M 1/22

(22) Přihlášeno 19 11 85
(21) PV 8336-85

(40) Zveřejněno 13 11 86

(45) Vydáno 15 03 88

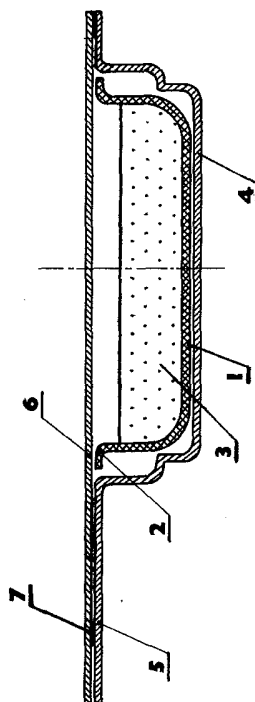
(75)

Autor vynálezu

ČADERSKÝ IVAN ing. CSc., ZOUHAROVÁ ALŽBĚTA ing., BURIÁNKOVÁ EVA RNDr.,
BRNO, KYBAL JAN RNDr. CSc., CHROMÍK JINDŘICH ing. CSc., SCHINDLER
JIRÍ MUDr. doc. CSc., ŠIMEK PETR ing., MATOUŠ ZDENĚK ing., PRAHA

(54) Pohotovostní bakteriologická kultivační souprava

Předmětem řešení je pohotovostní bakteriologická kultivační souprava k balení, distribuci, skladování, přípravě a jednorázovému použití pevných mikrobiologických půd, která sestává z průhledné misky s osazením na svém horním obvodu, ze sterilní kultivační půdy uvnitř misky, z průhledného víčka s úchytkou, do něž miska se sterilní kultivační půdou volně zapadá a zcela je vyplňuje a z vícevrstvé krycí fólie, uzavírající víčko s miskou se sterilní kultivační půdou uvnitř hermetickým, s výhodou peelovým sverem. Půdy v kultivačních miskách si zachovávají kvalitu a vysokou citlivost pro mikroorganismy po dlouhou dobu skladování. Manipulace s miskami při práci je velmi jednoduchá. Kultivační souprava má široký okruh použití v humánní i veterinární medicíně, v potravinářství, v odvětví zemědělství a farmaci.



Předmětem vynálezu je pohotovostní bakteriologická kultivační souprava, obsahující sterilní pevnou mikrobiologickou půdu, určená k balení, distribuci, skladování, přepravě a jednorázovému použití pevných mikrobiologických půd.

Pro mikrobiologické hodnocení kvalitativního i kvantitativního charakteru se využívá růstových vlastností mikroorganismů na mikrobiologických živných půdách o různém složení, závislém na vlastnostech mikroorganismů.

Mikrobiologické půdy jsou citlivým biologickým materiálem, u něhož dochází snadno ke znehodnocení. Půdy připravované a skladované běžným způsobem rychle vysychají a snadno se během skladování kontaminují. Proto se hledá řešení jak zajistit jejich standardní kvalitu při skladování, přepravě a manipulaci.

V mikrobiologické praxi je velice rozšířené používání tzv. pevných mikrobiologických živných půd různého složení, tj. půd, které po zchladnutí ztuhnou do gélovitého stavu v důsledku přidavku určitého množství agaru do živné půdy.

Příprava těchto pevných mikrobiologických živných půd se provádí rozveřením určitého množství suché půdy obvykle v práškovém nebo granulovaném stavu ve vodě, sterilizací takto získaného roztoku a jeho rozlitím do předem vysterilizovaných, nejčastěji skleněných, ale i plastových - polystyrenových či polyetylenových Petriho misek za aseptických podmínek. Po ochlazení a ztuhnutí roztoku živné půdy v Petriho misce a jejím zakrytí volně loženým víčkem je pevná mikrobiologická živná půda připravena k využití při mikrobiologickém hodnocení.

Uvedený způsob ukládání a přechovávání mikrobiologických půd ve skleněných nebo plastových Petriho miskách má některé závažné nedostatky. Pevné mikrobiologické živné půdy v Petriho miskách vyžadují časově a materiálově náročnou přípravu, projevující se negativně zejména tam, kde se neprovádí hromadně mikrobiologická vyšetření, jejich uchování je časově omezené na dobu jednoho až dvou týdnů zpravidla při snížené teplotě a při jejich skladování a transportu na místo očkování vzniká reálné nebezpečí jejich kontaminace případným oddělením víčka od Petriho misky s půdou.

Ve snaze zabránit zejména posledně uvedenému nedostatku se Petriho misky naplněné půdou balí do ebalů z plastických hmot. Tím se sice zabráni nežádoucímu oddělení spodní části a víčka, ale nezamezí se unikání vlhkosti, která podporuje růst mikroorganismů a plísni vně misky. Tím je ohrožena i sterilita vnitřního obsahu misky.

Další vývoj se ubíral k použití plastických misek, jejichž víčko je se spodní částí pevně spojeno pojídlem. I v tomto případě dochází k dehydrataci a po několika týdnech skladování i ke kontaminaci.

Další možností je přechovávání půd v několika nádobkách se šroubovacím víčkem či v sestavených skleněných ampulích. Nevýhodou tohoto řešení jsou v prvním případě relativně zvýšené náklady řešení a ve druhém případě snadná rozbitelnost ampulí.

Pojení misek lepicími páskami se ukázalo rovněž jako nedostatečné. Pásky časem křehnou, přestávají lepit a tím i bránit dehydrataci půdy.

Dalším z možných řešení, popsaným v ÚSP 3 532 604, je potahování hotových naplněných misek nebo zkumavek s půdami filmem kopolymeru. Tento způsob uchovávání půd se jeví jako velmi pracný a ekonomicky náročný.

Příbuzná řešení problému, popisovaná rovněž zejména v US - patentové literatuře, zahrnují fyzikální nebo chemické změny biologického materiálu, jako je například lyofilizace, hluboké zmrazení nebo přidavek chemikálií. Tyto postupy však mění povahu biologického materiálu a navíc vyžadují drahého vybavení.

K odstranění shora uvedených nedostatků směruje pohotovostní bakteriologická kultivační souprava, obsahující sterilní pevnou mikrobiologickou pádu, určená k balení, distribuci, skladování, přípravě a jednorázovému použití pevných mikrobiologických pód, podle vynálezu, jehož podstatu spočívá v tom, že souprava sestává z průhledné, ploché, například kulaté misky s osazením na svém horním obvodu, ze sterilní kultivační pády uvnitř misky, z průhledného víčka s úchytkou, do něžž miska se sterilní kultivační pádou volně zapadá a zcela je vyplňuje a z vícevrstvé krycí folie, uzavírající víčko s miskou se sterilní kultivační pádou uvnitř hermetickým, s výhodou peelovým svařem.

Ve výhodném provedení vynálezu jsou miska i víčko vytvořeny z průhledného, neměkčeného, hlubokotažného plastu o tloušťce 0,20 až 0,50 mm, například z neměkčeného polyvinylchloridu, vhodného pro blistrová balení.

Konstrukce a materiálové složení vícevrstvé krycí folie, volené s hlavním aspektem k jejím funkčním vlastnostem, mohou být různé. V ověřovací praxi výhodně obstály zejména folie z vrstvy viskózy nebo biaxiálně orientovaného polypropylénu, opatřené ze své vnější strany polyvinylidenchloridovým lakem, vrstvy polyetylénu nebo polyvinylidenchloridu, folie hliníku o tloušťce 0,01 až 0,04 mm a peelové vrstvy v uvedeném pořadí a folie z vrstvy papíru o plošné hmotnosti 45 až 100 g.m⁻², vrstvy polyetylenu o tloušťce 0,03 až 0,09 mm a hustotě v rozmezí 918 až 923 kg.m⁻³, folie hliníku a tloušťce 0,01 až 0,04 mm a peelové vrstvy v uvedeném pořadí.

Chemické složení peelové vrstvy, umožňující hermetické uzavření jednotlivých částí soupravy se sterilní pádou v jeden celek, může být také různé. K danému účelu vyhovuje zejména nitrocelulóza nebo kopolymer typu etylen - vinylkarboxylová kyselina, etylen - vinylacetát, vinylchlorid - vinylacetát.

Materiály, z nichž jsou vytvořeny miska s víčkem a vícevrstvá krycí folie, vynikají vedle vlastností, vyplývajících již z jejich výše uvedené charakteristiky, zvláště nízkou propustností pro vodní páru. Zhlediska požadavků kladených na pohotovostní bakteriologickou kultivační soupravu a vytýčeného cíle vynálezu, tj. zamezení unikání vlhkosti z pády a vzniku nežádoucí kontaminace, je tato vlastnost materiálu prvořadou.

Materiál, z něhož je miska s víčkem vytvořena, je pevný, lehký, snadno tvarovatelný, lze jej sterilizovat běžnými metodami, je nepropustný pro mikroorganismy, nebrání však růstu žádoucích mikroorganismů. Jeho použití je praktické i z toho důvodu, že jej lze popisovat laboratorní tužkou na skle.

Z výrobních důvodů je výhodné, aby miska i víčko byly zhotoveny z téhož materiálu. Není to však podmínkou. Důležité je, aby víčko bylo transparentní a umožňovalo vizuálně sledovat a vyhodnocovat chování studovaného mikroorganismu a průběh kultivace na masečované půdě, aniž by bylo z misky snímáno. Neměkčený hlubokotažný polyvinylchlorid tuto podmínku splňuje. Je-li také miska zhotovena z transparentního materiálu, pak je možné sledování i hodnocení provádět též v pohledu ze spodu misky.

Pohotovostní bakteriologická kultivační souprava podle vynálezu uspokojuje komplexně všechny vysoké nároky, které souvisejí jednak s jejím praktickým využitím, jednak s vlastním řešením technického problému. Řadí se k nim zejména nepropustnost pro mikroorganismy, minimální propustnost pro vodní páru, inertnost vůči pevné mikrobiologické půdě, sterilizovatelnost gama nebo UV zářením, tepelná odolnost při kultivačních teplotách, možnost vizuální kontroly sterility pády a průběhu kultivace při využití soupravy, schopnost uchovávat funkční vlastnosti pády v průběhu dlouhodobého skladování - alespoň jeden rok, operativní použitelnost - souprava obsahuje všechny nezbytné funkční součásti včetně mikrobiologické pády k přímému použití, snadná manipulovatelnost při funkčním využití, materiálová dostupnost a ekonomická výhodnost ve srovnání s dosud používanými systémy miska-víčko.

Zavedením pohotovostní bakteriologické kultivační soupravy pro jednorázové použití pevných mikrobiologických pód podle vynálezu na specializovaném precovišti, zabývající se mikrobiologickou diagnostikou, odpadá řada úkonů spojených se separátní přípravou živné pody bezprostředně před použitím. Jsou jím odstraněny operace navážování příslušných složek pody, jejich rozpouštění a rozvařování, sterilizace pody a laboratorního skla - Petriho misek pipet, rozliti sterilní pody do misek a podobně. Uvedené operace jsou nejen časově náročné, ale vyžadují i investičně a energeticky náročné přístroje, zejména horkovzdušné sušárny a sterilizační autoklávy.

Tělesné vytvoření a uspořádání jednotlivých částí pohotovostní bakteriologické kultivační soupravy podle vynálezu v adjustovaném stavu je znázorněno na obr. 1 v pohledu shora a na obr. 2 v řezu. Obr. 3 představuje detail jednoho z možných provedení uspořádání a složení vícevrstvé, v daném případě čtyřvrstvé krycí folie podle vynálezu.

Plochá, v daném případě kulatá miska 1, opatřená osazením 2 na svém horním obvodu a obsahující sterilní kultivační podu 3 uvnitř je uložena v průhledném víčku 4 s úchyt-kou 5. Miska 1 s osazením 2 a víčko 4 jsou vytvářeny tak, aby miska do víčka při adjustaci soupravy volně zapadla a současně, aby při použití soupravy, po otevření soupravy odloupnutím krycí folie 6 navoňování pody 3, vyjmutí resp. vysunutí misky 1 z víčka 4 nejlépe jeho nakloněním, a zakrytí misky víčko 4 k misce 1 dobře přiléhalo a tím plnilo při kultivaci svou funkci. Úchytka 5 slouží k snadšímu odloupnutí krycí folie 6.

Vyšrafovaná plocha na obr. 1 a plná čára na obr. 2 znázorňují peelový svar 7, který hermeticky spojuje vícevrstvou krycí folii 6 s obvodovou plochou víčka 4. Aby se při otvírání soupravy bezprostředně před jejím použitím působením tahové síly ne volnou, nepřivařenou část krycí folie 6 při vnějším okraji úchytky 5 dosáhlo snadného, plynulého a úplného odloupnutí krycí folie 6, zasahuje peelový svar 7 svým postupně se zužujícím výběžkem z kruhového obvodu do úchytky 5.

Obr. 3 znázorňuje uspořádání a složení vícevrstvé krycí folie, popsané v bodě 5 předmětu vynálezu.

Podle charakteru laboratorních testů, prováděných rutinně k diagnostickým a kontrolním účelům při sledování sterility a nezávadnosti a založených na hodnocení mikroflory, kultivované na definovaných diagnostických živných pódách, používají se v praxi různé živné pody, sestavené s ohledem na specifčnost zkoušky a na očekávanou odpověď, například zkoušení vody, mléka a mléčných výrobků, potravin, reziduí toxických látek, obalového materiálu, filtrační technika, lékařská diagnostika, stanovení aktivit antibiotik, zkoušky sterility, zkoušení farmaceutických surovin a produktů, biochemické testy a podobně.

Z živných pód tuzemské proveniencce přicházejí v úvahu zejména živný agar č. 1 a č. 2, Endova poda, MacConkey agar a Sabouraudův agar známého standardního složení. Živný agar č. 1 je mírně alkalická živná poda, určená pro všeobecné laboratorní použití ke kultivaci růstově nenáročných bakterií, hlavně pro bakteriologické vyšetření pitných a odpadních vod.

Živný agar č. 2 se hodí rovněž ku všeobecnému použití v bakteriologii. Dále je určený pro subkultury různých bakterií a na jejich krátkodobé uchovávání ve sbírce. Endova poda je určená k rozlišení laktózu zkvašujících a nezakvašujících mikroorganismů, pocházejících převážně ze zažívacího traktu. Používá se především v diagnostické humánní či veterinární bakteriologii, ale též v hygienické bakteriologii k izolaci *E. coli* z vody, potravin či jiného prostředí.

MacConkey agar je určen k izolaci a diferenciaci gramnegativních červených tyčinek. Velmi dobře se hodí k důkazu přítomnosti a počtu *E. coli*, jakož i důkazu a izolaci salmonel a shogel.

Sabouraudův agar je určen k izolaci a kultivaci kvasinek a kožních patogenních plísní.

Ze shora uvedeného je zřejmé, že pohotovostní bakteriologická kultivační souprava podle vynálezu má široký okruh použití nejen v humánní a veterinární medicíně, ale i v potravinářství, vodohospodářství, zemědělství a farmacii. Sortiment takto připravovaných pevných živných půd lze dle potřeby obměňovat a centrálně distribuovat. Výrobek je vhodný i pro práci v terénu bez nákladného laboratorního vybavení. Pády v kultivačních miskách si zachovávají kvalitu a vysokou citlivost pro mikroorganismy po dlouhou dobu skladování. Manipulace s miskami při práci je velmi jednoduchá.

Příklady provedení

Příklad 1

Sledovaná půda: Živný agar č. 1

Sterilizace obalu: vnější a vnitřní misky i krycí materiál byly ozářeny na gama zdroji dávkou 25 kGy.

Plnění půd: Živný agar byl připraven dle návodu a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Po schlazení půdy na cca 45 °C byla půda za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu rozplněna po 15 ml do vnitřních misek. Po ztuhnutí půdy cca 5 minutách - byla na víčku s miskami navažena sterilní krycí folie.

Sledování sterility a záchytnosti půd: soupravy byly skladovány po dobu 12 měsíců při pokojové teplotě 20 až 25 °C. Během této doby bylo sledováno zachování sterility a každý měsíc byla testována záchytnost půd pro organismy. Ke sledování citlivosti půdy byla používána *E. coli* CCM 185. Výsledky záchytnosti byly srovnány s výsledky získanými na čerstvě připraveném živném agaru č. 1 v Petriho miskách. Živný agar č. 1 si zachoval i po 12 měsících skladování záchytnost na stejné úrovni jako čerstvě připravená půda. Na sledovaných kultivačních miskách nebyla po celou dobu skladování zjištěna kontaminace. Všechny vzorky si uchovaly sterilitu.

Příklad 2

Sledovaná půda: Živný agar č. 2

Sterilizace obalu a plnění půdy jako v příkladu 1.

Sledování sterility a záchytnosti půd: skladování vzorků i metodika testování jako v příkladu 1, testovací mikroorganismus *Staphylococcus aureus*. Sterilita zůstala zachována u všech vzorků po dobu 1. roku sledování. Záchytnost pro *Staphylococcus aureus* zůstala po celý rok na úrovni čerstvě připravené půdy.

Příklad 3

Sledovaná půda: Endova půda

Sterilizace obalu a plnění půdy jako v příkladu 1.

Sledování sterility půdy: všechny vzorky si uchovaly sterilitu po dobu 12 měsíců.

Sledování záchytnosti půdy: skladování vzorků i metodika testování jako v příkladě 1.

Testovací mikroorganismy: směs *E. coli* a *Shigella sonnei*.

Záchytnost se v prvních dvou měsících sledování snížila, v dalších měsících až do doby 1 roku se řádově rovnala čerstvě připravené půdě.

Příklad 4

Sledovaná půda: MacConkey agar

Sterilizace obalu a plnění půdy jako v příkladu 1.

Sledování sterility půdy: všechny vzorky si uchovaly sterilitu po dobu 12 měsíců.

Sledování záchytnosti půdy: skladování vzorků i metodika testování jako v příkladě 1.

Testovací mikroorganismy: směs *E. coli* a *Shigella sonnei*.

Záchytnost pro uvedenou směs mikroorganismů zůstala po celý rok na úrovni čerstvě připravené půdy.

Příklad 5

Sledovaná půda: Saboursudův agar

Sterilizace obalů a plnění půdy jako v příkladě 1.

Sledování sterility půdy: během 12 měsíců skladování byl zjištěn jeden kontaminovaný vzorek.

Sledování záchytnosti půdy: skladování vzorků i metodika testování jako v příkladě 1.

Testovací mikroorganismus: *Candida albicans*

Záchytnost pro uvedený mikroorganismus: zůstala po celou dobu sledování na úrovni čerstvě připravené půdy.

Příklad 6

Sledovaná půda: Saboursudův agar

Sterilizace obalů: kombinace etylalkohol + UV záření

Plnění půdy: Saboursudův agar byl připraven dle návodu a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C. Po schlazení na cca 45 °C byl v bezu s laminárním prouděním vzduchu rozplněn po 15 ml do předem vysterilizovaných misek. Po zatuhnutí půdy - cca 5,5 minut - byla na víčka s miskami navržena sterilní krycí folie.

Sledování sterility a záchytnosti půdy: soupravy byly skladovány po dobu 18 měsíců při pokojové teplotě a bylo u nich sledováno zachování sterility a záchytnosti pro mikroorganismy. Testování citlivosti bylo prováděno každý měsíc kmenem *Candida albicans* a srovnáno s čerstvě připraveným Saboursudovým agarem na Petriho miskách. Sledovaná půda si zachovala po celou dobu skladování záchytnost srovnatelnou s čerstvě připravenou půdou.

U skladovaných vzorků byla v 7 % nalezena nežádoucí kontaminace, což bylo zřejmě způsobeno slabým zdrojem UV záření a tudíž nedostatečnou eliminací kontaminace na obalovém materiálu.

Příklad 7

Sledovaná půda: Endova půda

Sterilizace obalů a plnění půdy jako v příkladě 6.

Sledování sterility půdy: během 8 měsíčního skladování nebyla zjištěna kontaminace.

Sledování záchytnosti půdy: skladování vzorků i metodika testování jako v příkladě 6, testovací mikroorganismy jako v příkladě 3. V prvních dvou měsících byl zaznamenán pokles záchytnosti, v dalších měsících se záchytnost vyrovnala čerstvě připravené půdě.

Příklad 8

Sledovaná půda: Mac Conkey agar

Sterilizace obalů a plnění půdy jako v příkladě 6.

Sledování sterility půdy: během 8 měsíčního skladování byla zjištěna kontaminace u 2 % vzorků.

Sledování záchytnosti půdy: metodika i testovací mikroorganismy jako v příkladě 4. Záchytnost pro uvedený mikroorganismus zůstala po dobu 8 měsíců na úrovni čerstvě připravené půdy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Pohotovostní bakteriologická kultivační souprava, obsahující sterilní pevnou mikrobiologickou pádu, určená k balení, distribuci, skladování, přípravě a jednorázovému použití pevných mikrobiologických pód, vyznačená tím, že sestává z průhledné, ploché, například kulaté misky (1) s osezením (2) na svém horním obvodu, ze sterilní kultivační pády (3) uvnitř misky (1), z průhledného víčka (4) s úchytkou (5), do níž miska (1) se sterilní kultivační pádou (3) volně zapadá a zcela je vyplňuje a z vícevrstvé krycí folie (6), uzavírající víčko (4) a miskou (1) se sterilní kultivační pádou (3) uvnitř hermetickým, s výhodou peelovým svařem (7).

2. Souprava podle bodu 1, vyznačená tím, že miska (1) je vytvořena z průhledného, neměkčeného, hlubokotažného plastu o tloušťce 0,20 až 0,50 mm, například z neměkčeného polyvinylchloridu, vhodného pro blistrová balení.

3. Souprava podle bodů 1 a 2, vyznačená tím, že víčko (4) je vytvořeno z téhož materiálu jako miska (1).

4. Souprava podle bodů 1 až 3, vyznačená tím, že vícevrstvá krycí folie (6) sestává z vrstvy viskózy nebo biaxiálně orientovaného polypropylénu, opatřené ze své svěřší strany polyvinylidenchloridovým lakem, vrstvy polyetylenu nebo polyvinylidenchloridu, folie hliníku o tloušťce 0,01 až 0,04 mm a peelové vrstvy v uvedeném pořadí.

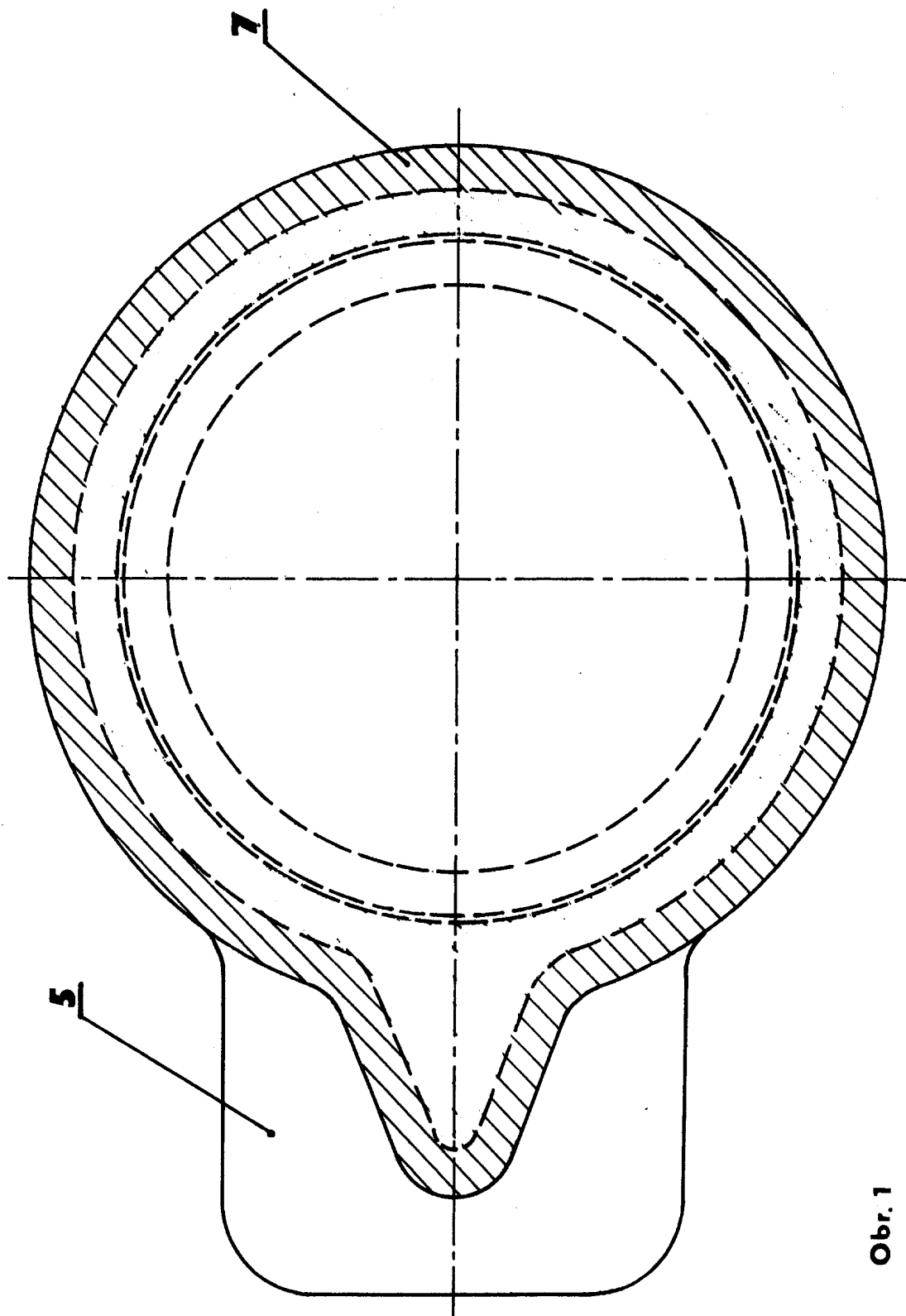
5. Souprava podle bodů 1 až 3, vyznačená tím, že vícevrstvá krycí folie (6) sestává z vrstvy papíru o plošné hmotnosti 45 až 100 g.m⁻² vrstvy polyetylenu o tloušťce 0,03 až 0,09 mm a hustotě v rozmezí 918 až 923 kg.m⁻³, folie hliníku o tloušťce 0,01 až 0,04 mm a peelové vrstvy v uvedeném pořadí.

6. Souprava podle bodů 1 až 5, vyznačená tím, že peelová vrstva sestává z nitrocelulózy nebo kopolymeru typu etylen - vinylkarboxylová kyselina, etylen - vinylacetát, vinylchlorid - vinylacetát.

7. Souprava podle bodů 1 až 6, vyznačená tím, že obsahuje sterilní kultivační pádu s agarem, jako Živý agar č. 1, Živý agar č. 2, Endovu pádu, MacConkey agar nebo Sabouraudův agar.

2 výkresy

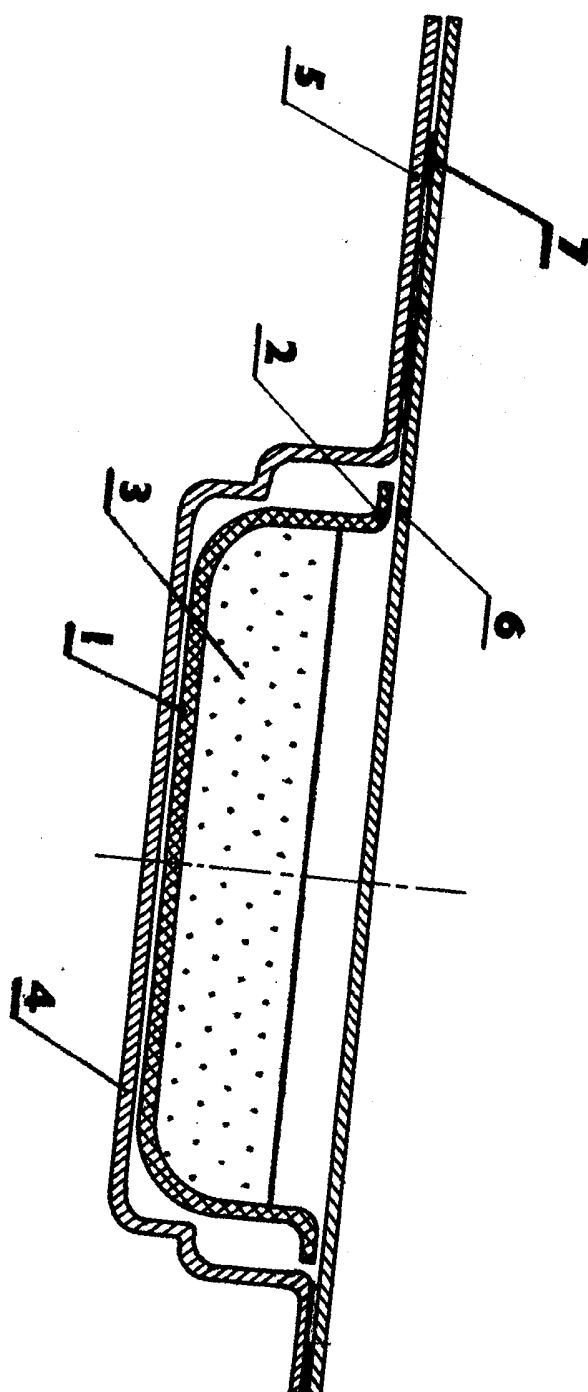
251396



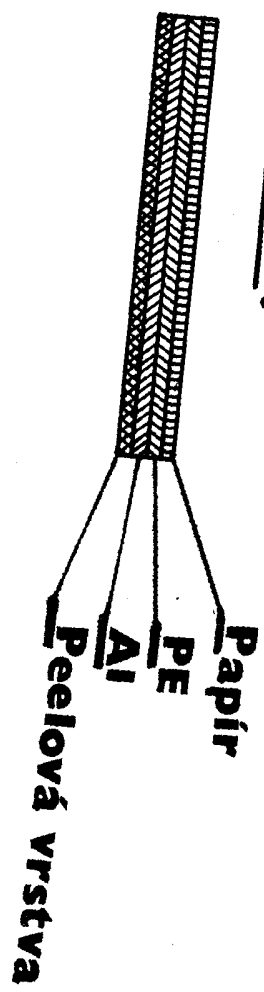
Обр. 1

251396

Obr. 2



Detail-6 Příklad:



Obr. 3