



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 208873

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 31 05 79

(21) PV 258-80

(11)

B1

(51) Int. Cl.¹ C 12 Q 1/14

(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 určování streptokoků skupiny B

1

Vynález řeší problém způsobu rychlého určování hlavního infekčního původce mastitid skotu a ostatních streptokoků skupiny B, použitím sfingomyelinázy D jako biopreparátu, vhodného pro veterinární i lékařskou mikrobiologii při izolaci streptokokových kmenů z vyšetřovaného materiálu.

Snaha disponovat metodu, která by umožnila určení streptokoků skupiny B již za 24 hodin vyústila v návrh média, které jeho autoři HAUGE, S. - ELLINGSEN, J. J.: Et selektiv agar-medium (TKT mediet) beregnet til pavisning av gruppe B streptokokker i samlemelk (Leverandor-melkeprover). Nord. Vet. Med., 5, 1953, s. 539-547. KOHLER-ELLINGSEN, J. - HAUGE, S.: Pavisning av Streptococcus agalactiae i leverandormelk (samlemelk) ved hjelp av T.K.T.-mediet (thallium sulfap-krystall-violett-toxin-mediet). Nord. Vet. Med., 5, 1953, s. 653-662, označili podle obsažených složek (thallium sulfát-krystalová violeť - toxin) jako TKT médium. V principu toto médium identifikuje streptokoky skupiny B na základě hemolytického efektu se stafylokokovým beta-toxinem. Identickou hemolytickou reakci na tomto médiu však kromě streptokoků skupiny B dávají i CAMP-pozitivní kmeny S. uberis.

Na principu použití beta-toxinu je založeno i médium KTB BECHT, H.: Vorschlag zur Mastitis-Diagnostik. Schweizer, Arch. Tierheilk., 103, 1961, s. 627-630, KUHLMANN, W. - MÜLLER, G.: Über die Kongorot-Toxin-Blutplatte nach Becht. Arch. Exp. Vet. Med., 18,

1964, s. 837-843. Dosavadní metody, založené na použití stafylokokového beta-toxinu, nediferencují jednoznačně druh *Str. uberis* od patogenního druhu *Str. agalactiae* JELÍNKOVÁ, J.: Group B streptococci in the human population. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 76, 1977, s. 127-165, což je jejich podstatnou nevýhodou, neboť prodlužují možnost vyslovení závěrů nejméně o 48 hodin, což znamená zvýšení nákladů na vyšetření. Časová prodleva se negativně odráží v operativnosti při určování streptokoků skupiny B.

Výše uvedené nedostatky jsou odstraněny způsobem určování streptokoků skupiny B podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že do Edwardsova média, v němž se jako indikátor použije s výhodou 5 % propraných ruminantních erytrocytů, se přidá prepurifikovaná forma sfingomyelinasy D v množství 1 až 5 jednotek aktivity a k takto připravené živné půdě se přidá vyšetřovaný materiál a nechá se inkubovat při teplotě 308 K až 311,5 K 16 až 48 hodin a po této době se vyrostlé kolonie streptokoků skupiny B obklopí širokým dvorcem úplné hemolýzy, zatímco kolonie ostatních streptokoků jsou nehemolytické. Ruminantní erytrocyty jsou ovčí. Vyšetřovaný materiál, kterým je mléko, se v množství 0,05 až 0,1 ml zalije do média a/nebo se nanese na povrch média, stejně jako vyšetřované výtěry z tkání a orgánů.

Výhody určování streptokoků skupiny B ve srovnání se současnou situací se projeví vyloučením možnosti záměny *Str. agalactiae* za jiné streptokoky. Pouze beta hemolytické streptokoky, zejména skupiny A vyrůstají s úzkou zónou úplné hemolýzy. Závěry lze vyslovit již za 16 hodin po bakteriologickém vyšetření vzorků, což výrazně snižuje provozní náklady a spotřeby materiálu. Použití způsobu podle vynálezu zaručuje standardnost výsledků, dosahovaných na různých pracovištích. Způsobem podle vynálezu je možno zjišťovat streptokoky skupiny B v tekutém i pevném materiálu.

Příklad 1

Při určování *Streptococcus agalactiae*, který je hlavním etiologickým činitelem mastitidy skotu, v sekretu mléčné žlázy bylo postupováno tak, že do rozehrátého Edwardsova média a ochlazeného na 321 K se přidalo 5 % ovčích erytrocytů a 3 jednotky aktivity na 1 ml prepurifikované formy sfingomyelinázy D. Na dno sterilní Petriho misky se napipetuje 0,05 ml vyšetřovaného sekretu. Do misky se nalije připravené médium tak, aby výška média byla 0,5 cm a nechá se to ztuhnout. Inkubace se provede v termostatu při 310 K. Po 20 hodinách inkubace jsou kolonie *Streptococcus agalactiae* obklopeny širokou zónou úplné hemolýzy, zatímco kolonie jiných streptokokových druhů vyrůstaly bez hemolýzy. Popsaným způsobem byly zjišťovány streptokoky skupiny B v tekutém materiálu.

Příklad 2

Při určování streptokoků skupiny B ve vzorcích odebraných tamponem, byla připravena stejná živná půda obsahující sfingomyelinázu D jako v příkladě 1. Půda se nalila do Petriho misek tak, aby její výška byla 0,5 cm a nechala se v miskách ztuhnout. Kultivace se provedla nátěrem na povrch média. Inkubace a hodnocení bylo stejné, jako v příkladě 1. Popsaným způsobem byly zjišťovány streptokoky skupiny B v pevném i tekutém

materiálu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob určování streptokoků skupiny B, vyznačený tím, že do Edwardsova média se použije jako indikátor s výhodou 5 % propraných ruminantních erytrocytů a přidá se prepurifikovaná forma sfingomyelinázy D v množství 1 až 5 jednotek aktivity a k takto připravené živné půdě se přidá vyšetřovaný materiál a nechá se inkubovat při teplotě 308 K až 311,5 K 16 až 48 hodin a po této době se vyrostlé kolonie streptokoků skupiny B obklopí širokým dvorcem úplné hemolýzy, zatímco kolonie ostatních streptokoků jsou nehemolytické.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že ruminantní erytrocyty jsou ovčí.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že vyšetřovaný materiál, kterým je mléko, se v množství 0-0,5 až 0,1 ml zalije do média a/nebo se nanese na povrch média, stejně jako vyšetřované výtěry z tkání a orgánů.