



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 197 867

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13 05 78
(21) PV 3090-78

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 Q 1/04

(40) Zveřejněno 31 08 79

(45) Vydáno 01 7 82

(75)

Autor vynálezu

SCHINDLER JIŘÍ MUDr. CSc., PRAHA

PAUČKOVÁ VĚRA RNDr., OSTRAVICE

DUBEN JOSEF MUDr. CSc., HAVLÍČKŮV BROD

(54)

Způsob identifikace bakterií pro diagnostické účely

1

Vynález se týká způsobu identifikace bakterií pro diagnostické účely v mikrobiologii. V současné době se diagnostika provádí v nestandardních skleněných zkumavkách nestandardní sestavou testů s nestandardním hodnocením, podle volby příslušného pracoviště.

Kromě toho je známo několik druhů identifikace gramnegativních fermentujících tyčinek. PathoTec System (General Diagnostic Division, Warner-Lambert Company, New York, USA) spočívá v použití 12 proužků filtračního papíru impregnovaných reagensy pro tyto testy: Oxidáza, beta-D.galaktosidáza, fenylalanin-desamináza, produkce indolu, redukce nitrátu na nitrit, Voges-Proskauerova reakce (produkce acetoinu), utilizace malonátu, dekarboxyláza lysinu, produkce ureázy, produkce sirovodíku a štěpení eskulinu. Způsob, pojmenovaný Enterotube (Roche Diagnostics, Nutley, New Jersey, USA a Hoffmann-La Roche a Cie, Basle, Švýcarsko), používá speciální vícekomůrkové nádoby, naplněné tuhými půdami pro biochemické účely, a ocelového drátu, který slouží k naočkování těchto půd jedním protažením otvory v přepážkách komůrek. Hlavní nevýhodou jsou vysoké náklady při používání tohoto systému, vyplývající ze složitosti nádoby a použití agarových půd.

Další způsob, zvaný RB-System (Diagnostic Research, Roslyn, New York, USA), používá ze dvou zkumavek, z nichž větší obsahuje šikmo vylitou půdu, menší sloupec agarové půdy. Větší se očkuje bakteriologickou kličkou vpichem a na povrch plochy. Druhá zkumavka se

197 887

očkuje vpichem. Obsahují testy na dezaminaci fenylaalaninu, štěpení laktózy, štěpení glukózy, produkce sirovodíku, dekarboxylaci lysinu, pohyb a dekarboxylaci ornitinu. Relativní nevýhoda je kombinace půd a testů, a z toho resultující citlivost na přísné dodržování technologického postupu. Systém API 20 (Analytab Products, Carle Place, New York, USA) využívá tvarovaného pruhu fólie speciálně modelovaných komůrek, obsahujících lyofilizované substráty pro 20 testů. Komůrky se očkují pasteuovou pipetou suspenzí bakterií, některé se převrství parafinovým olejem, uloží do plastických pouzder, zvlhčených destilovanou vodou. Odečítá se za 18 hodin srovnáním s tabulkou nebo diagnostickým seznamem. Konečně Minitek System (BBL, Cockeysville, Maryland, USA) využívá plastického panelu s deseti jamkami, do nichž se vkládají papírové disky nasycené substráty. Očkuje se suspenzí ve speciálním bujónu mechanickou mikropipetou s hroty pro jedno použití. Sestavu testů lze volit.

Nevýhody známých způsobů spočívají především v zatěžování pomocného personálu při mytí, sterilizaci, kompletaci a přísunu skleněných zkumavek, čištění stojánek a při plnění zkumavek. Velké objemy médií zatěžují rozpočet laboratoří, metody provádění testů jsou neekonomické. Zkumavky ve stojáncích zabírají prostor na stole a v termostatech a spotřeba energie na prohřátí zkumavek a kovových stojánek při inkubaci je značně vysoká. Diagnostický postup není standardizován, interpretace je možná v širokém rozmezí. Tím není zajištěna návaznost na další postupy, zejména přesné zařazení kmenů pro zpracování dat o rezistenci na antibiotika.

Uvedené nedostatky odstraňuje podle vynálezu způsob identifikace bakterií pro diagnostické účely v mikrobiologii pomocí mikrotestů.

Jeho podstata spočívá v tom, že se určované bakterie naočkují do oddělených jamek z umělé hmoty, v nichž jsou uloženy sušené substráty pro biochemické testy, načež se inkubují při teplotě od 30 do 37 °C po dobu 18 až 42 hodin a poté se výsledky jednotlivých reakcí porovnávají s pevnou sadou výsledků mikrotestů.

Výhody způsobu podle vynálezu spočívají především v možnosti použití miniaturizovaných testů, vybraných podle obsahu informace v dané soustavě a jednoduše proveditelných, formulovaných pro tekuté půdy a podle míry reprodukovatelnosti. Tyto testy jsou rozděleny do dvou kroků, ne však více než do tří, prováděných sekvenčně. Při sestavování byly vzaty v úvahu vyváženě všechny faktory, přičemž nebyl preferován obsah informace. Další výhoda spočívá v tom, že média jsou připravena ve vysušeném stavu a při provádění jsou rozpuštěna inokulem. Testy se provádějí v plastických sérologických destičkách, které dovolují pracovat v malém objemu. Sérologické destičky mají zpravidla osm řad jamek po 12 v jedné řadě. Pro jedno vyšetření se používá 12ti nebo 6ti jamek. Jamky se plní tekutým médiem, které se suší buď ve zmrazeném stavu, nebo za zvýšené teploty ve vakuu, nebo za normálního atmosférického tlaku. Naplněné destičky se balí do plastické termoplastické fólie, nebo do plastického transportního sáčku. Ke každé destičce je přiloženo celkem 8 plastických pipetek z polotuhé plastické hmoty, na konci zatavených. Tyto pipetky mají kalibro-

vané ústí tak, aby deponovaly kapky v objemu buď 0,025 ml, nebo 0,050 ml. Kontrola kvality se provádí sadou testovacích kmenů. Po inokulaci se destička inkubuje ve vlhké atmosféře (v plastické krabici) v normálním laboratorním termostatu. Odečítá se jednoduchým zařízením za 24 hodin proti zdroji difúzního světla. Sestava testů umožňuje napojit interpretaci výsledků na počítač, nebo sestavit identifikační seznam poskytující pro možné kombinace znaků pravděpodobnost identifikace a pokyn k provedení dalších testů pro druhý krok.

Způsob podle vynálezu je v dalším blíže vysvětlen na příkladu provedení.

Příklad

Pomocí bakteriologické platinové kličky se připravila suspenze ze dvou nebo jedné kolonie do fyziologického roztoku ve zkumavce nebo nádobce o malém objemu. Koncentrace mikrobů v suspenzi činila od 10^4 do 10^6 buněk v 1 ml. Pipetkou se přeneslo po 0,1 ml suspenze do každé z dvanácti jamek, obsahujících sušené substráty. (Na jedné destičce je umístěno osm řad po 12 jamkách, takže lze očkovat osm kmenů současně.) Destička s naočkovanými jamkami se uložila do krabice s atmosférou, nasycenou vodními parami a inkubovalo se při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté se do čtvrté jamky káplo asi 10 ul Kovacsova činidla pro detekci indolu a do deváté Barritovo reagens I a II pro detekci acetoinu. Prohlíželo se proti bílé ploše v dostatečném osvětlení a bylo zjištěno následující:

- a) je-li první jamka beze změny (sirovoďík -), druhá sytě žlutá (mannit +), třetí fialová (lysin +), čtvrtá s červeným prstencem, případně sytě červená (indol +), pátá žlutá (ornitin -), šestá a sedmá beze změny (urea -, citrát -), osmá sytě žlutá (ONPG +), devátá, desátá beze změny (VPT -, inosit -), jedenáctá beze změny (lipáza -) a dvanáctá žlutá (glukóza +), určí se srovnáním s diagnostickou tabulkou bakterie *Escherichia coli*;
- b) je-li první jamka zakalena sytě černou sraženinou, druhá zbarvena žlutě, třetí, čtvrtá, pátá beze změny, šestá sytě modrá, sedmá beze změny, osmá sytě žlutá, devátá, desátá, jedenáctá beze změny, dvanáctá sytě žlutá, určí se bakterie *Citrobacter freundii*;
- c) je-li první jamka zakalena sytě černou sraženinou, druhá a třetí beze změny, čtvrtá s červeným prstencem nebo sytě červená, pátá a šestá beze změny, sedmá sytě červená nebo růžová, osmá, devátá, desátá a jedenáctá beze změny a dvanáctá žlutá, diagnostikuje se bakterie *Proteus vulgaris*.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob identifikace bakterií pro diagnostické účely v mikrobiologii pomocí mikrotěstů, vyznačující se tím, že se určované bakterie naočkují do oddělených jamek v destičce z umělé hmoty, v nichž jsou uloženy sušené substráty pro biochemické testy, načež se inkubují při teplotě od 30 do 37 °C po dobu 18 až 42 hodin, a poté se výsledky jednotlivých reakcí porovnávají s pevnou sadou výsledků mikrotěstů.