



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

233440

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
G 12 N 1/20

(22) Prihlášené 19 07 83
(21) (PV 6068-83)

(40) Zverejnené 18 06 84

(45) Vydané 15 08 86

(75)

Autor vynálezu

MELTER JÁN MVDr., NOVÁ LESNÁ, POPLUHÁR LADISLAV doc. MVDr. CSc.,
KOŠICE

(54) Agarovo-vaječná pôda pre kultiváciu mykobaktérií

Vynález sa týka agarovo-vaječnej pôdy pre kultiváciu mykobaktérií.

Agarovo vaječná pôda podľa vynálezu pozostáva z 0,25 % hmotnostných masového výťažku, 0,43 % hmotnostných peptonu, 1,28 % hmotnostných agaru, 0,33 % hmotnostných chloridu sodného, 2,57 % hmotnostných glycerolu, 81,73 % destilovanej vody, 13,08 % hmotnostných vaječného žltka, 0,33 % hmotnostných 2 %-nej malachitovej zelene.

Agarovo-vaječná pôda podľa vynálezu je rovnocenná s inými vaječnými pôdami používanými pre kultiváciu mykobaktérií a navyše nevyžaduje chemikálie z dovozu. Jej výhodou však je, že pri primokultivácii je menej citlivá ku nešpecifickej mikroflóre, čím sa zvyšuje diagnostická spoľahlivosť.

Vynález sa týka agarovo-vaječnej pôdy pre kultiváciu mykobaktérií.

Kultivačné postupy v mykobakteriológii, vrátane výberu a prípravy kultivačných pôd sú v porovnaní s inými metodikami používanými v bakteriológii veľmi náročné. Z viacerých dnes známych živných pôd pre mykobaktérie sú najvhodnejšie pevné vaječné a tekuté pôdy s obsahom natívnej bielkoviny (Šula, 1970). Z nich sa najviac uplatňuje Löwenstein-Jensenova pôda. Výber kultivačných médií závisí od metodík používaných v tom-ktorom laboratóriu. Laboratórne vyšetrovacie metodiky vo veterinárnej medicíne (1974) určujú pre kultiváciu mykobaktérií pôdu Petragnaniho, Stonebrinkovu a Šulovu. Štandardné metódy RVHP pre laboratórnu diagnostiku tuberkulózy (1980) navrhujú pre kultiváciu mykobaktérií Löwenstein-Jensenovu pôdu. Laboratórne metodiky vo veterinárnej mykobakteriológii používané v USA (1975) určujú pre kultiváciu štyri druhy pôd: Löwenstein-Jensenova, Heroldova, Middlebrookova 7 H 10, Stonebrinkova.

Snahy o zjednotenie a skvalitnenie kultivačných médií pokračujú. V našich podmienkach ide predovšetkým o hľadanie možností náhrady drahých chemikálií z dovozu. Napríklad významom asparagínu a jeho náhradou v Löwenstein-Jensenovej pôde sa zaoberal Šlosarek a kol. (1981).

V mykobakteriologickej praxi najmä pri izolácii mykobaktérií z kontaminovaného materiálu sa veľmi často vyskytujú prípady, že primokultivácia je neúspešná kvôli nešpecifickej mikroflóre, ktorá kontaminuje použité kultivačné média. V takýchto prípadoch sa používajú silnejšie dekontaminčné prostriedky pre devitalizáciu nešpecifickej mikroflóry, čím sa však usmrť 70 až 80 % mykobaktérií a teda diagnostická spoľahlivosť je nízka. Na druhej strane je možné použiť pôdy menej citlivé k nešpecifickej mikroflóre, ale umožňujúce dobrý rast mykobaktériám. Uvedené vlastnosti majú špeciálne agarové pôdy, ktoré sú však náročné na prípravu a obsahujú množstvo chemikálií z dovozu.

Uvedené nedostatky možno v podstatnej miere odstrániť agarovo-vaječnou pôdou podľa vynálezu, ktorej podstata spočíva v tom, že pozostáva z 0,25 % hm. mäsového výťažku, 0,43 % hm. peptonu, 1,28 % hm. agaru, 0,33 % hm. chloridu sodného, 2,57 % hm. glycerolu, 81,73 % hm. destilovanej vody, 13,08 % hm. vaječného žltka, 0,33 % hm. 2%-nej malachitovej zelene.

Agarovo-vaječná pôda podľa vynálezu je nepriehľadná, sýto zelenej farby s dokonale hladkým a lesklým povrchom, čo umožňuje výrobnú kontrolu jak pri inkubácii, tak pri odčítaní rastu mykobaktérií. Pôdu treba uskladňovať v chlade a tme pri +4 °C. Pri správnom postupe prípravy a skladovaní vydrží najmenej 6 týždňov bez zjavného ovplyvnenia jej kvality.

Agarovo-vaječná pôda podľa vynálezu je rovnocenná s inými vaječnými pôdami používanými pre kultiváciu mykobaktérií. Jej výhodou však je, že pri primokultivácii je menej citlivá ku nešpecifickej mikroflóre, najmä pri izolácii mykobaktérií zo vzoriek vonkajšieho prostredia, čím sa zvyšuje diagnostická spoľahlivosť.

P r í k l a d 1

Príprava agarovo-vaječnej pôdy

24 g živného agaru č. 1 (SEVAC - t. j. 3,13 g mäsového výťažku, 5,22 g peptonu a 15,65 g agaru) sa po polhodinovom nabobtnaní v destilovanej vode do celkového objemu 1 000 ml dokonale rozvarí so 4 g chloridu sodného a 28 ml glycerolu. Po ochladení na 60 °C sa upraví pH na 7,5 a autoklavuje sa 25 minút pri 121 °C. Po ochladení na 52 °C sa pridá 8 kusov vaječných žltkov a 4 ml 2%-nej malachitovej zelene. Po dôkladnom zhomogenizovaní sa pôda rozlieva do bakteriologických skúmaviek v šikmej polohe. Pôda stuhne po 10 minútach.

Predmet vynálezu bol overený a štatisticky zhodnotený v pokusných podmienkach.

I. Porovnanie navrhovanej agarovo-vaječnej pôdy s najviac používanými pevnými pôdami pre mykobaktérie a štatistické hodnotenie výsledkov.

Pre testovanie pôdy boli použité referenčné mykobakteriálne kmene zo zbierky IHE v Prahe.

1. M. scrofulaceum
2. M. avium serotyp 2
3. M. intracellulare serotyp 4
4. M. intracellulare serotyp 8
5. M. fortuitum
6. M. phlei

Porovnávané kultivačné média:

1. Navrhovaná agarovo-vaječná pôda
2. Stonebrinkova pôda
3. Löwenstein-Jensenova pôda
4. Ogawova pôda
5. Heroldova pôda

Pri kultivácii bol sledovaný deň, kedy bolo možné prvý raz zaznamenať rast kmeňa a množstvo narastenej masy kmeňa na 30. deň. Výsledky boli štatisticky spracované Študentovým T-testom, na hladine významnosti = 0,05 (tabuľka č. 1).

T a b u ľ k a 1

Porovnávané pôdy	t hodnota	= 0,05
MH ⁺ : Löwenstein-Jensenova	0,175	
MH ⁺ : Stonebrinkova	0,049	1,960
MH ⁺ : Ogawova	0,321	
MH ⁺ : Heroldova	0,22	

MH⁺ = navrhovaná agarovo-vaječná pôda

Z porovnania hodnôt je zrejmé, že medzi testovanými médiami nie je štatisticky významný rozdiel a teda agarovo-vaječná pôda podľa vynálezu je pre kultiváciu vybraných mykobakteriálnych kmeňov rovnako vhodná ako porovnávané pôdy.

II. Predbežné výsledky praktického použitia agarovo-vaječnej pôdy podľa vynálezu.

Agarovo-vaječná pôda (MH) bola použitá pre primokultiváciu mykobaktérií zo vzoriek vonkajšieho prostredia pri paralelnom hodnotení s Heroldovou (H) a Löwenstein-Jensenovou (LJ) pôdou.

Celkom bolo izolovaných 35 mykobakteriálnych izolátov II., III. a IV. skupiny Runyonovej klasifikácie z 11 vyšetrených vzoriek vody a pôdy z močaristej lokality ako aj tekutého hnoja ošípaných, mäkkýšov a podobne. Hodnotenie pôd bolo založené na sledovaní absolútneho počtu izolátov, počtu pozitívnych kultivácií, počtu kontaminovaných pôd nešpecifickou mikroflórou, počtu pôd bez nárastu mykobaktérií (tabuľka č. 2). Vzťah počtu kontaminácií a počtu pôd bez nárastu mykobaktérií bol hodnotený "Chi-kvadrat" testom (tabuľka č. 3).

Tabuľka 2

Pôda	počet založených kultivácií	počet kontaminácií	počet pozitívnych kultivácií	počet pôd bez nárastu mykobaktérií	počet izolátov
LJ	33	12 36,4 %	3 9,09 %	21 63,6 %	3
MH	33	2 6,06 %	16 48,5 %	16 48,5 %	20
H	33	3 0,09 %	12 36,4 %	19 57,6 %	12

Tabuľka 3

Porovnávané pôdy	χ^2
LJ : MH	15,9
H : MH	0,512

Kritická hodnota χ^2 pre 0,05 = 3,8

Z hodnotenia vyplýva, že agarovo-vaječné pôdy Heroldova a MH sú vhodnejšie pre izoláciu atypických mykobaktérií z vonkajšieho prostredia, ako Löwenstein-Jensenova pôda, ktorá je viac citlivá ku kontaminácii.

Ďalšou výhodou je, že zloženie agarovo-vaječnej pôdy nevyžaduje chemikálie z dovozu, pričom ingrediencie - agar, peptom a mäsový výťažok - sú u nás už komerčne vyrábané v polo-produkte, t. zv. živný agar č. 1 n. p. Imuna Šarišské Michaľany. Výhodou je tiež jej nenáročnosť pri príprave, ktorá nevyžaduje špeciálne zrážacie aparatúry, ako napr. Arnoldov zrážací prístroj.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Agarovo-vaječná pôda pre kultiváciu mykobaktérií vyznačujúca sa tým, že pozostáva z 0,25 % hmotnostných mäsového výťažku, 0,43 % hmotnostných peptonu, 1,28 % hmotnostných agaru, 0,33 % hmotnostných chloridu sodného, 2,57 % hmotnostných glycerolu, 81,73 % hmotnostných destilovanej vody, 13,08 % hmotnostných vaječného žltka a 0,33 % hmotnostných 2 %-nej malachitovej zelene.