

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 338

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12R 1/45 (2006.01)
C12R 1/445 (2006.01)
C12R 1/44 (2006.01)
G01N 21/80 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36706**
(22) Přihlášeno: **04.10.2019**
(47) Zapsáno: **31.10.2019**

- (73) Majitel:
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ
- (72) Původce:
doc. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Brno, Soběšice,
CZ
Ing. Veronika Holá, Ph.D., Moutnice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Kultivační půda pro odlišení *Staphylococcus*
epidermidis od jiných druhů rodu
*Staphylococcus***

CZ 33338 U1

Kultivační půda pro odlišení *Staphylococcus epidermidis* od jiných druhů rodu *Staphylococcus*

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká kultivační diagnostické půdy pro odlišení druhu *Staphylococcus epidermidis* od jiných druhů rodu *Staphylococcus*.

10

Dosavadní stav techniky

V klinickém materiálu, ale i ve stěrech z nemocničního prostředí, se vyskytují často zástupci rodu *Staphylococcus*. Stafylokoky jsou častými původci nozokomiálních infekcí. Při výzkumu nozokomiálních infekcí proto vyvstala nutnost odlišit spolehlivě, rychle a levně *Staphylococcus epidermidis* od ostatních zástupců rodu *Staphylococcus*.

Staphylococcus epidermidis je Gram-pozitivní bakterie, která je součástí běžné flóry žijící na lidské kůži. *Staphylococcus epidermidis* obvykle není patogenní, ale u pacientů s oslabeným imunitním systémem může způsobit infekce. Zejména ohroženi jsou pacienti s intravenózními či močovými katétry, stomiemi a dalšími implantáty a zavedenými pomůckami, neboť *Staphylococcus epidermidis* vytváří na povrchu těchto implantátů biofilmy.

Staphylococcus epidermidis je častým kontaminantem vzorků odesílaných do diagnostických laboratoří právě kvůli své běžné přítomnosti na lidské kůži.

Biochemická identifikace *Staphylococcus epidermidis* je pro screeningové potřeby zbytečně finančně náročná a identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) zase náročná na zpracování a přístrojové vybavení.

30

Kultivační půdy používané v laboratořích lze rozdělit do čtyř, resp. pěti kategorií – půdy základní, půdy obohacené, půdy selektivní, půdy diagnostické a půdy selektivně-diagnostické. Základní půdou, ze které se připravuje většina ostatních půd, je masopeptonový bujon. Půda základní poskytuje základní živiny pro růst většiny mikrobů. Přídavkem suplementu (cukry, růstové faktory, krev apod.) do základní půdy vznikne půda obohacená. Obohacená půda svými suplementy poskytuje podmínky k růstu i náročnějším druhům bakterií, které by na půdě základní růst nemohly (např. kvůli nedostatku živin).

Půdy selektivní svými vlastnostmi potlačují růst některých bakterií, přičemž nebrání růstu dalších bakterií. Takovýmto selektivním přídavkem do půdy mohou být například některá antibiotika (amikacin, vankomycin, kolistin apod.) či některé další chemikálie (vyšší koncentrace chloridu sodného, azid sodný, bazický fuchsín apod.).

Půdy diagnostické vznikají přidáním složek reagujících na odlišné metabolické procesy. Výsledkem je odlišný růst jednotlivých rodů či druhů bakterií. Např. přídavek cukru může odlišit druh bakterie cukr využívající od druhu, který daný cukr ve svém metabolismu nevyužívá – rozdíl se pak detekuje acidobazickým indikátorem jako snížení pH, je-li cukr využíván.

Předkládané technické řešení řeší problém rychlého, snadného a finančně nenáročného odlišení *Staphylococcus epidermidis* od ostatních zástupců rodu *Staphylococcus*.

50

Podstata technického řešení

Předmětem předloženého technického řešení je kultivační diagnostická půda pro odlišení *Staphylococcus epidermidis* od ostatních zástupců rodu *Staphylococcus*, přičemž tato kultivační diagnostická půda obsahuje trehalózu a pH indikátor.

Kultivační půda podle předloženého technického řešení obsahuje složky základní půdy, které jsou obvyklé a odborníkovi v oboru dobře známé, např. základ pro půdu na bázi živného agaru. Živný agar obsahuje masový extrakt, pepton, NaCl a agar. pH kultivační půdy před naočkováním by se mělo pohybovat mezi 7,5 a 8,5, nejlépe 8,0 ± 0,2. Je výhodné, je-li kultivační půda pevná.

Nejvýhodnější kultivační půdou je živný agar obsahující na 1 litr:

15	Masový extrakt (sušina)	3 až 15 g
	Pepton pro bakteriologii	3 až 15 g
	NaCl	3 až 6 g
	Agar	10 až 20 g

20 a dále níže uvedené diagnostické suplementy trehalózu a pH indikátor.

Trehalóza, C₁₂H₂₂O₁₁, α-D-glukopyranosyl-(1→1)-α-D-glukopyranosid, je neredukující cukr ze skupiny disacharidů. Skládá se ze dvou molekul glukózy, které jsou mezi sebou spojené α, α – vazbou. K jeho štěpení je třeba enzymu trehalázy. *Staphylococcus epidermidis*, jako jediný zástupce rodu *Staphylococcus*, tento enzym nemá a není tedy schopen trehalózu štěpit. Těto vlastnosti lze využít při screeningové identifikaci izolovaných kmenů.

Vhodné množství trehalózy přidávané do půdy je v rozmezí 0,5 až 2 % (w/v).

30 pH indikátor pro použití v diagnostické kultivační půdě podle technického řešení je acidobazický indikátor s barevným přechodem v oblasti hodnot pH v rozmezí 6,0 až 7,5. Takovým indikátorem může být například lakmus, methylčerven, a zejména bromthymolová modř.

pH indikátor se do živné půdy přidává v množství v rozmezí 1.10⁻⁶ až 1.10⁻¹ % (w/v).

35 Při přípravě diagnostické kultivační půdy je trehalóza přidávána do kultivačního média spolu s pH indikátorem.

40 Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro přípravu kultivační půdy, která obsahuje masový extrakt, pepton, NaCl, agar, trehalózu a bromthymolovou modř. Uvedené složky jsou pak dávkovány dle požadavků na složení konkrétní půdy pro konkrétní použití.

Na takto připravenou kultivační půdu, zejména agar, se očkuje bakteriální kultura a poté se kultivuje při 37 °C po dobu alespoň 18 hodin. Hodnotí se schopnost kmene růst a štěpit trehalózu. Štěpením trehalózy dochází ke změně pH agaru a tím ke změně barvy indikátoru. V případě bromthymolové modři se jedná o změnu z původní modré až modrozelené barvy na žlutou až žlutozelenou barvu. Růst kmenů se tedy na agaru projeví růstem žlutých kolonií se žlutým až žlutozeleným okolím trehalóza-pozitivních druhů rodu *Staphylococcus* a bezbarvých kolonií s modrým až modrozeleným okolím (nezměněným) trehalóza-negativního druhu *Staphylococcus epidermidis*.

Předkládané technické řešení je dále objasněno v následujícím příkladu, aniž je jím jakkoliv omezen jeho rozsah.

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje pozitivní a negativní nárůst vybraných druhů stafylokoků na půdě s trehalózou.

5

Příklad uskutečnění technického řešení

Receptura agaru (g/1000 ml):

10	Masový extrakt (sušina)	10,0	
	Pepton pro bakteriologii	10,0	
	NaCl	5,0	
	Agar	15,0	
	Trehalóza	10,0	
15	Bromthymolová modř (0,2% (w/w) roztok	1,2 ml	
	pH 8,0 ± 0,2		

Příprava agaru:

20 V nádobě se smíchá kultivační půda (všechny složky uvedené v receptuře) s 1000 ml purifikované vody, nechá se nabobtnat, poté se rozpustí a sterilizuje v autoklávu 20 minut při 121 °C. pH půdy se adjustuje na 8,0. Do Petriho misek se rozplňuje 20 ml půdy po jejím ochlazení na 45 °C. Takto připravená kultivační půda má použitelnost 1 týden při skladování při teplotě v rozmezí 4 až 8 °C.

25

Na takto připravenou kultivační diagnostickou půdu byla z čerstvé 24hodinové kultury testovaného kmene sterilní očkovací kličkou přenesena jedna kolonie a rozočkována. Po 18 hodinách kultivace bylo hodnoceno zbarvení kultury a jejího okolí.

30

Příklad výsledku kultivace je znázorněn na obr. 1. Žlutě se projevují trehalóza-pozitivní kmeny ostatních druhů stafylokoků, modře trehalóza negativní kmeny druhu *Staphylococcus epidermidis*.

Na obr. 1:

- 35
- a, b, f, h – trehalóza-negativní kmeny *Staphylococcus epidermidis* rostoucí na půdě v bezbarvých koloniích s modrým okolím kolonií;
 - a – sbírkový kmen *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418,
 - 40
 - b - sbírkový kmen *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221,
 - f, h - *Staphylococcus epidermidis* – kmeny izolované z klinického materiálu;
 - 45
 - c, d, e, g – trehalóza-pozitivní kmeny rostoucí na půdě ve žlutých koloniích se žlutým okolím;
 - c – sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* CCM 6188,
 - 50
 - d – *Staphylococcus hominis* - kmen izolovaný z klinického materiálu,
 - e – *Staphylococcus haemolyticus* - kmen izolovaný z klinického materiálu,
 - g – sbírkový kmen *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Průmyslová využitelnost

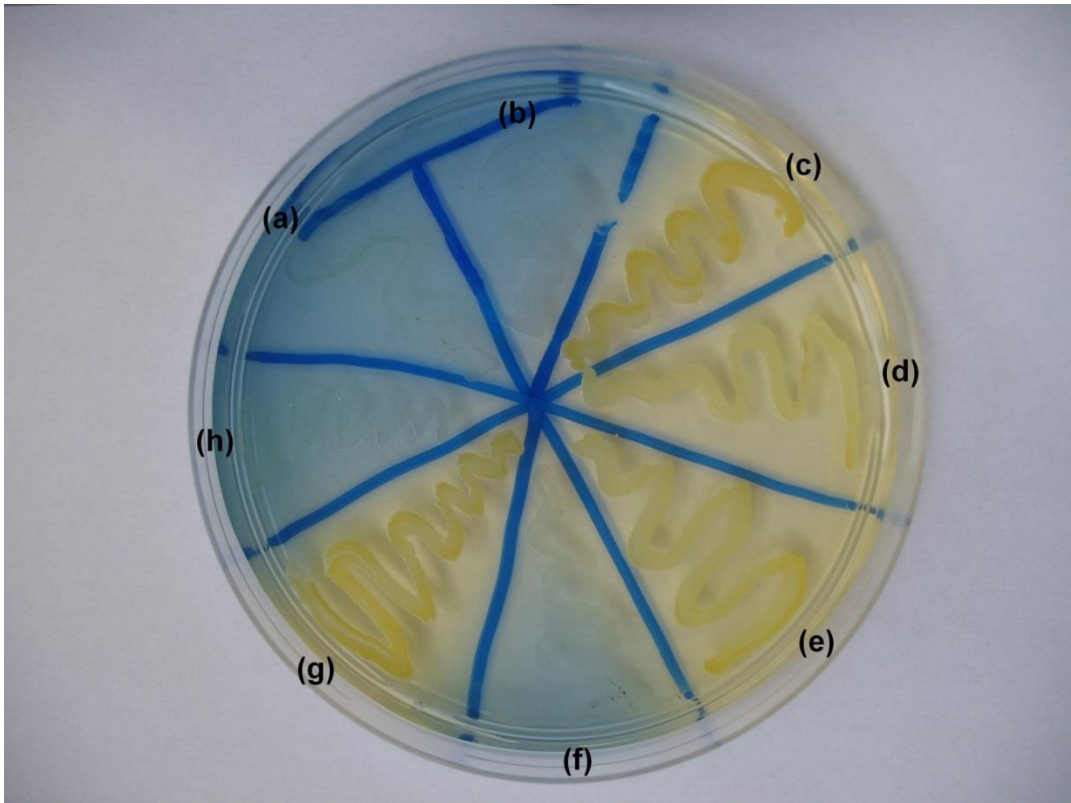
- 5 Diagnostická půda s trehalózou najde uplatnění všude tam, kde je potřeba odlišit *Staphylococcus epidermidis* od dalších klinicky významných zástupců rodu *Staphylococcus*, tedy např. v klinické mikrobiologii či epidemiologii a hygieně.

NÁROKY NA OCHRANU

10

1. Kultivační diagnostická půda pro odlišení *Staphylococcus epidermidis* od ostatních zástupců rodu *Staphylococcus*, **vyznačená tím**, že obsahuje
- 15 - základní půdu,
 - trehalózu v množství v rozmezí 0,5 až 2 % (w/v), a
 - pH indikátor s barevným přechodem v oblasti hodnot pH v rozmezí 6,0 až 7,5 v množství v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-1}$ % (w/v).
- 20 2. Kultivační půda podle nároku 1, **vyznačená tím**, že základní půdou je živný agar.
3. Kultivační půda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že pH kultivační půdy je mezi 7,5 a 8,5, s výhodou $8,0 \pm 0,2$.
- 25 4. Kultivační půda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že základní půda obsahuje následující složky v množství na 1 litr:
- | | | |
|----|--------------------------|-------------|
| | masový extrakt - sušina | 3 až 15 g |
| | pepton pro bakteriologii | 3 až 15 g |
| 30 | NaCl | 3 až 6 g |
| | Agar | 10 až 20 g. |
5. Kultivační půda podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že pH indikátor je vybrán za skupiny zahrnující lakmus, methylčerven, bromthymolová modř,
- 35 s výhodou je pH indikátorem bromthymolová modř.
6. Sada pro přípravu kultivační půdy podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačená tím**, že obsahuje masový extrakt, pepton, NaCl, agar, trehalózu a bromthymolovou modř.

1 výkres



Obr. 1