

Docent Dr. F. Patočka:

## **Nové bezvaječné kultivační prostředí pro izolaci *Mycobacteria tuberculosis*.**

Z bakteriologicko-serologického ústavu lékařské fakulty Karlovy university.

Nejpoužitelnější metodou diagnostiky *Mycobacteria tuberculosis* z patologických produktů i exkrátů stala se nesporně během posledních asi 10 let kultivace na nejrůznějších vaječných půdách. Výhody diagnostiky kultivační před diagnostikou mikroskopickou jsou tak nesporné, že každá odborná laboratoř považuje dnes mikroskopické zjištění Kochova bacila pouze za metodu orientační a značně nespolehlivou. Na prvý pohled méně patrný jsou výhody kultivace nad průkazem experimentálním. Samozřejmě, že ideální jest použití obou vyšetřovacích způsobů u každého materiálu současně. To však není vždycky možno buď pro malé množství zaslaného patologického produktu, nebo — hlavně u hůře dotovaných laboratoří — pro veliký náklad spojený s prováděním obou metod. Nezbývá než se rozhodnouti opět pouze pro jednu z nich. V naší laboratoři jsme tento problém rozřešili ve prospěch metodiky kultivační a naše mnohaleté zkušenosti s ní jsou více než uspokojující. Experiment na zvířeti přímo z materiálu provádíme pouze v případech zvláštních, na zvláštní žádost klinika, nebo tam, kde jde o určení patogenity, eventuálně typu vypěstovaného *mycobacteria*. Definitivně ve prospěch kultivace rozhodly tyto důvody: za prvé délka trvání experimentu. Obsahuje-li patologický pro-

dukt velmi málo tuberkulosních bacilů, o velmi slabé virulenci, může experiment trvati celou řadu měsíců, ba dokonce Petroff požaduje, aby bylo zvíře pozorováno celý rok. V těchto nikterak příliš vzácných případech samozřejmě ani tuberkulinová reakce, provedená na infikovaném morčeti k urychlení diagnostiky není pozitivní za nějakých 14 dní nebo 3 neděle, nýbrž mnohem později, a často bývá dosti bezvýrazná. Pochopitelně zájem klinika, zejména chirurgů, při tak dlouhodobém experimentu značně upadá a není nikterak v poměru s vysokým nákladem, který je s experimentem spojen. Stává se, oznamujeme-li klinikům po několika měsících pozitivní výsledek experimentu, že nevědí již nic o pacientovi, neboť tento byl na vlastní žádost propuštěn z léčení a více se nehlásí. Dlouhodobý experiment má však ještě jednu, a to daleko závažnější nevýhodu. Všude, kde se chovají experimentální zvířata ve větších množstvích, dochází k epizootiím (hlavně na jaře), jichž výbuchu nelze vůbec zabránit. Učinili jsme mnohokrát zkušenost, že tyto epizootie daleko více postihují zvířata očkovaná nežli intaktní, a tak se stává, že se konečného výsledku u tuberkulosy vůbec nedočkáme, jelikož zvířata zajdou interkurrentní chorobou. Samozřejmě, že mikrobiolog na tom nenese žádné viny, ale přes to se často právě zde setkává s nepochopením. Druhým důvodem jest nákladnost experimentálního průkazu. Uvážíme-li, že běžná cena morčete kolísá mezi 6 až 10 K za kus, připočteme-li k tomu náklady za živení těchto morčat a násobíme-li to počtem vyšetření provedených za poslední rok, t. j. cifrou 800, dojdeme k sumě, která mnohonásobně převyšuje položku, kterou k tomuto účelu i dobře situovaný ústav může věnovati.

Naproti tomu kultivační průkaz mycobacteria tuberculosis na dobrých vaječných půdách trvá v každém případě maximálně 6 neděl, ale ve většině případů je kultura pozitivní již za 3 neděle, přičemž délka kultivační doby samozřejmě není odvislá od virulence mikrobů. Procento sekundárního znečištění kultur při dobře propracované technice je poměrně malé a jelikož se současně inkubuje více kultivačních půd najednou, zůstává alespoň jedna z nich vždy neznečištěna a umožní nám vysloviti se buď o výsledku negativním, nebo pozitivním. Procento tuberkulosních bacilů špatně, nebo vůbec nerostoucích (tak zv. dysgonických kmenů) je možno stlačit na mizivé minimum tím, že kultivujeme současně na půdy s glycerinem i bez glycerinu. Tím se zčásti vyrovná také o něco menší citlivost této metody před metodou experimentální. Na druhé straně však relativně malé náklady metody kultivační umožnily nám rozšířiti svoje vyšetřování nejenom na případy, kde klinik přímo vyslovuje podezření na tuberkulosu, nýbrž spontánně kultivujeme na ni všude tam, kde to charakter a množství materiálu dovozuje a kde všechna běžná ostatní vyšetření mikroskopická i kultivační zůstala negativní. Stalo se nám velmi často, že jsme pozitivní kultivací na tuberkulosu přivedli klinika na správnou diagnosu tam, kde na to v první chvíli snad ani nepomýšlel. Samozřejmě zůstává i nadále experiment na zvířeti suverenní metodou konečné diagnosy, neboť trváme na zásadě, že ve sporných případech není možno uznati za skutečného tuberkulosního bacila žádnou acidoresistentní tyčinku, která, byť i rostla v podezřelých koloniích, nemá schopnosti vyvolávat typické změny v orgánech citlivých zvířat.

Ze všech kultivačních půd a nejrůznějších modifikací kultivačních metod, které byly postupně zkoušeny v našem ústavě z návodu zemřelého prof. dra Honla, a to způsobem velmi exaktním, adoptovali jsme definitivně pro poslední léta metodiku a půdu podle Löwensteina. Soudíme sice, že na příklad půda Petraganiho je stejně dobrá, ne-li dokonce o něco hodnotnější, a že i jiné modifikace kultivační, jako je metodika Corper-Uiey mají nesporně svoje výhody, ale stará zkušenost všech laboratoří, že je totiž nejlépe zůstatí při jediné metodě, ale dobře vžitě a do podrobnosti propracované, dává-li tato dobré výsledky, nás udržela u metody Löwensteinovy po dobu 7 let a pravděpodobně udrží ještě delší dobu.

Všechny modifikace kultivačních půd, sloužící k izolaci tuberkulosního bacila přímo z materiálu, jsou různými obměnami tuhých půd vaječných, jichž pravzorem byla půda Dorsetova. V novější době se sice činí pokusy zavésti zejména pro exsudáty tekuté kultivační půdy, nejčastěji syntetické, ale, jak se zdá, prozatím bez většího úspěchu. Je tedy vajíčko základní složkou na př. půdy Löwensteinovy i půdy Petraganiho, při čemž, jak novější rozbory amerických autorů ukázaly, je daleko důležitější částí vaječný žloutek nežli bílek, který sám o sobě, zejména pro svou vysokou alkalitu, by byl půdou naprosto nevhodnou. Plně hodnotná půda může ovšem býti připravena pouze z čerstvých vajec. Samozřejmě, že jejich spotřeba při našem provozu je veliká. Značné, zatím na štěstí pouze přechodné nesnáze s opatřením čerstvých vajec jsme zažili o letošních velikonocích. Úvaha, že by zejména v nynějších dobách mohl vzniknouti takový stav trvalý, který by nám samozřejmě úplně znemožnil provádění jedné z našich

nejdůležitějších vyšetřovacích metod, vedla nás k přemýšlení o tom, čím vajíčka nahraditi.

Náhodou se stalo, že krátkou dobu předtím jeden z nás četl v populárním přírodovědeckém časopise »Naší přírodou« článek inž. dra Mališe o vysoké výživné hodnotě mouky ze sojových bobů. Pod vlivem tohoto článku vznikla u nás myšlenka, že by snad sojová mouka mohla s úspěchem nahraditi vajíčko i mikrobiologům, a šlo jenom o to, jakým způsobem by bylo lze z ní udělati tuhou půdu, které by mohlo býti použito jako půdy Löwensteinovy. Současně jsme si vzpomněli, že použití sojové mouky v bakteriologii není úplnou novinkou.

Složení sojové mouky jest obdivuhodné. Průměrně obsahuje přes 15% hodnotných tuků, obyčejně více než 35% bílkoviny a asi 3% lecithinu, který se z ní také získává v čisté formě, a to daleko levněji, nežli z vaječných žloutků. Jak je běžně známo, propaguje se zejména v novější době soja jako potravina velmi hodnotná nejenom pro svůj vysoký obsah bílkovin, tuků a lecithinu, a to jako velmi dobrá náhražka vajíčka, nýbrž zejména také pro zvláštní kvalitu své bílkoviny — glycininu — který je téměř identický s živočišným kaseinem a tedy potravou nejenom snadno stravitelnou, nýbrž i velmi fyziologickou.

Pokud jsme mohli zjistiti přehledem odborné literatury, již máme k dispozici, upoutal pozornost bakteriologů u sojové mouky dosud pouze vysoký obsah bílkoviny. Od návrhů Nobécourta a Rachaixe až k metodice přesně propracované Lorentzem, Kauschovou a Weissem sloužila soja ve směs jako zdroj extraktivních bílkovin. Sojové mouky se tedy ve všech těchto metodách používá stejně jako rozemletého masa a jednoduchou ex-

trakcí za studena získaná sojová voda, podobně jako masová voda se zpracovává dále na bouillon a stává se tak východištěm půd buď tekutých, nebo tuhých. Lorentz podrobuje sojovou vodu ještě peptonifikaci, čímž zvyšuje její výživnost pro některé speciální mikrobiologické účely, na př. k výrobě průhledných telluritových ploten k diagnostice difterie. Sojová voda má proti masové vodě tu ohromnou výhodu, že se zpracovává na bouillon pouhým přidáním soli, vyčeřením a sterilisací. Přidání peptonu, tedy substance nejdražší, je podle zkušenosti německých autorů zbytečné. Nahrazuje tedy ve všech těchto případech soja vlastně maso. Nikde jsme nenašli dosud zmínky o tom, že by se byl někdo pokusil nahraditi v mikrobiologii sojou to, co se již dávno děje v kuchyňské praxi, to jest vajíčko. Byli bychom tedy v tomto ohledu prvními, ale obáváme se to tvrditi s určitostí, neboť při dnešní nesmírné rozlehlosti odborné mikrobiologické literatury, jak se o tom denně můžeme přesvědčiti, i velmi hodnotné návrhy snadno upadají v zapomenutí a jsou pak po letech v případech zvláštní potřeby vlastně znovu objevovány.

Největší nesnázi v našich pokusech byla proměna sojové mouky v tuhou kultivační půdu, neboť sojové těsto, byť sebe hustší, vařením samo o sobě netuhne. Konečně po několika orientačních pokusech jsme se rozhodli mísiti sojovou mouku s koňským nebo hovězím serem a směs koagulovat v šikmé poloze. Koagulovaného sera, jak známo, bylo použito již Kochem ke kultivaci tuberkulosního bacila, a to s relativním úspěchem. Tato směs sera a sojové mouky by nám dávala zhruba (podle našich předpokladů) půdu asi takové kvality, jako je půda Dorset-Lubbenauova. Půda

Löwensteinova je však nesporně mnohem citlivější, a to pravděpodobně pro příměs asparaginu, Na citrici,  $MgSO_4$ , dikaliumfosfátu, bramborové moučky a pro eugonické kmeny i glycerinu. Rozhodli jsme se proto přidati tyto substance k půdě ve stejném složení a přibližně i kvantu jako jich používá Löwenstein.

Vypadá tedy naše dosud poslední modifikace (která ovšem určitě není modifikací konečnou) a náš pracovní postup následovně: 150 ccm hovězího nebo koňského sera smícháme se 150 ccm asparaginového roztoku, jehož skladbu uvádíme podrobně. K asparaginovému roztoku se před smícháním se serem přidá soja a sterilisuje se s ním varem, jak níže podrobně uvedeno.

Asparaginu . . . . .	0·8 g
$K_2HPO_4$ . . . . .	0·8 g
Na citr. . . . .	0·8 g
$MgSO_4$ . . . . .	0·8 g
glycerinu . . . . .	40·0 g
Aquae destil. ad . . . . .	1000.

Sterilisujeme v autoklavě. Ke 150 ccm takto sterilisovaného roztoku přidáme 5 plných lžic sojové mouky, 5 ccm 50% emulze bramborové mouky a vaříme 2 hodiny na vodní lázni. Po vychladnutí zhoustlé směsi přidáme 150 až 200 ccm koňského sera a 6 ccm 2% roztoku malachitové zeleně. Směs důkladně promícháme, nalejeme do zkumavek asi do té výše jako Löfflerovo serum, obsah každé zkumavky ještě jednou dobře promísíme a v šikmé poloze tři dny po sobě srážíme v páře při 80° až 90° C. Sraženou půdu, která vzhledem připomíná půdu Löwensteinovu a je při tom méně lesklá a má méně sytou barvu, zkoušíme 2 dny na sterilitu při 37° C.

Kultivace na serum-sojové půdě je stejná, jako na půdě Löwensteinově. Pro dysgonické kmeny tuberkulosního bacila se půda připravuje stejně, ale bez glycerinu.

Předkládáme toto prvotní složení půdy jako první pokus v tomto směru naší veřejnosti. Sami věříme, že toto složení není definitivní a budeme dále pracovati na jejím zlepšení. Orientační pokusy s naočkováním čisté kultury tuberkulosního bacila humanního typu (stejného kvanta) na půdy Löwensteinovy a na půdy serum-sojové dopadly nad očekávání příznivě. Kochův bacil roste na ní stejně rychle a při nejmenším stejně vydatně, ba někdy dokonce vydatněji, než na půdách Löwensteinových. Nemáme zatím ještě zkušenosti s vypěstováním Kochova bacila na sojových půdách přímo z pathologických produktů, ale řada příslušných pokusů je již v proudu a doufáme, že během několika dalších měsíců budeme moci souborně sděliti získané výsledky.

Podle orientačních pokusů není důvodů, proč by i v tomto směru nenahradila sojová půda úplně půdu Löwensteinovu. Proti této má pak tu výhodu, že je ještě levnější a její opatření nebude dělati vůbec nikdy nesnázi, neboť soja se začíná pěstovat, jak se zdá, s úspěchem i v našich krajích.

#### L i t e r a t u r a.

1. K a u s c h - W e i s s : Sojabohnenmehl, ein vollwertiger Ersatz des Nährbodenfleisches. Ztrbl. Bakt. Orig. I, Bd. 133, S. 124, 1934.

2. L o r e n t z : Neues zur Züchtung der Diphtheriebakterien. Ztrbl. Bakt. Orig. I, Bd. 124, S. 516. 1932.

3. N o b é c o u r t : Durée comparée de la vie de quelques microbes dans l'eau de viande, l'eau de riz, l'eau de haricots. (Podle referátu z Ztrbl. Bakt. Ref. Bd. 42, S. 198, 1909).