



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108119

(13) U

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 09638**

(22) Дата подання заявки: **05.10.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

@IPROALT_BIBLO_L

(72) Винахідник(и):

Пономаренко Світлана Володимирівна (UA),

Осолодченко Тетяна Павлівна (UA),

Порт Олена Валерівна (UA),

Крестецька Світлана Леонидівна (UA),

Півненко Світлана Юріївна (UA),

Антушева Тетяна Іванівна (UA),

Пірцхалава Тетяна Валентинівна (UA)

(73) Власник(и):

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ

МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.

МЕЧНИКОВА НАМН УКРАЇНИ",

вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)

@IPROALT_BIBLO_R

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ СТАФІЛОКОКІВ @IPROALT_54

(57) Реферат:

Середовище для детекції стафілококів містить екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрію фосфорнокислий двозаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2 г/л та 130 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію. Як джерела амінного азоту містить ферментолізат зернової барди в кількості 157,5-210,0 г/л. @IPROALT_ABSTRACT

UA 108119 U

Корисна модель належить до медичної мікробіології, зокрема до засобів лабораторної діагностики бактеріальних інфекцій, а саме є культуральним середовищем для детекції стафілококів.

Для детекції та попередньої диференціації стафілококів в бактеріологічній практиці використовують жовточно-сольовий агар (ЖСА, агар Чистовича) наступного складу, г/л [1]: пептон ферментативний 1,5 г/л, суміш амінокислот гідролізатна (САГ) 4,5 г/л, екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрій фосфорнокислий двозаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2,0 г/л та 130,0 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію. Тривалість інкубації стафілококів на цьому агарі складає 48 год. При 37±1 °С.

До суттєвих ознак, що зумовлюють функціональність цього складу при детекції стафілококів належить відносно висока концентрація натрію хлориду (78,5 г/л), що забезпечує селективні якості середовища, а також наявність умов для детекції лецитиназної активності, що забезпечує швидку попередню диференціацію стафілококів.

Спільними із рішенням, що заявляється, суттєвими ознаками прототипу є наявність в складі 2,5 г/л екстракту дріжджів, 0,7 г/л натрію карбонату, 78,5 г/л натрію хлориду, 0,5 г/л натрій фосфорнокислого двозаміщеного, 11,0±2,0 г/л агару мікробіологічного та 130,0 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію.

До причин, що заважають одержанню бажаного технічного результату належить висока собівартість зумовлена використанням імпортованих складових: пептон ферментативний, суміш амінокислот гідролізатна.

Як поживні основи мікробіологічних середовищ також використовуються ферментативні гідролізати рослинної сировини, зокрема [2]. Зернова барда є основним відходом спиртового виробництва. Вміст сухої речовини в ній складає 7,5-8,5 %, з яких 26,0-30,0 % протеїни; вказане зумовлює обмежені терміни її зберігання. В натуральному вигляді ця субстанція фактично не має ринкової цінності та потребує швидкої утилізації, що створює певні технологічні та екологічні проблеми. Нутритивна цінність зернової барди, що зумовлює її придатність для виробництва поживних основ мікробіологічних середовищ, визначається наявністю білків (у т. ч. таких, що містять есенціальні амінокислоти лізин та метіонін), целюлози, а також вітамінів групи В, токоферолів та ергостерину, тощо.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити середовище для детекції стафілококів, в якому за рахунок використання в якості джерела амінного азоту ферментолізату зернової барди, досягається зниження його собівартості.

Поставлена задача вирішується наступним складом середовища:

ферментативний гідролізат зернової барди 157,5-210 г/л, екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрій фосфорнокислий двозаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2 г/л та 130,0 г суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію на літр готового середовища

Заявлений діапазон вмісту ферментолізату зернової барди (157,5-210,0) ґрунтується на можливості досягнення оптимального для ростових властивостей середовища вмісту амінного азоту (120-140 мг %): при кількості ферментолізату менше ніж 157,5 г/л вміст амінного азоту складає менше 120 мг %, а при його кількості більш ніж 210 г/л вміст амінного азоту складає більше 140 мг %.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструють наведені нижче приклади.

Прикладі

Готували середовище №1, що містить ферментолізат зернової барди 157,5 г/л, екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрій фосфорнокислий двозаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2 г/л та 130,0 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію.

Для порівняння кількості мікроорганізмів, що вирости на поверхні твердого середовища, культурально-морфологічних властивостей штамів, лецитиназної активностей паралельно використовували жовточно-сольовий агар (ЖСА).

У дослід було взято вилучені від хворих 5 штамів *S. aureus*, 5 штамів *S. epidermidis*, референс-штами *S. aureus* ATCC №25923; *S. saprophyticus* ATCC №1535; *S. epidermidis* ATCC № 12228.

Для постановки дослідів використовували 18-24 годинні культури вказаних мікроорганізмів. Готували суспензію відповідних мікроорганізмів у стерильному фізіологічному розчині, що відповідала 1,0 одиниці мутності за McFarland, робили послідовні десятикратні розведення та

висів із розведень 10^{-6} , 10^{-7} по 0,1мл на запропоноване середовище та на жовточно-сольовий агар (ЖСА).

Для визначення стабільності основних біологічних властивостей мікроорганізмів проводили десять пасажів вищезазначених штамів через запропоноване середовище та ЖСА й вивчали наступні ознаки: - для штамів *S. aureus*, *S. epidermidis* та *S. saprophyticus* - плазмокоагулазну активність, оксидазну та каталазну активності, ферментацію глюкози в анаеробних умовах та маніту в аеробних умовах. Оцінка результатів проводилась через 24 години культивування.

Приклад 2

Готували середовище № 2, що містить ферментолізат зернової барди 210,0 г/л, екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрій фосфорнокислий двозаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2 г/л та 130,0 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію.

Результати двох дослідів наведено в таблицях 1-2.

Таблиця 1

Порівняльні данні ростової здатності стандартного та сконструйованого середовища

| Тест-штами | Розроблене середовище №1 | | Розроблене середовище №2 | | Контрольне середовище (ЖСА) | |
|-----------------------------|--|------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
| | Розведення культури | | | | | |
| | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ |
| | Кількість мікроорганізмів (КУО) в 0,1 мл (M±m) | | | | | |
| | 100 м.к. | 10 м.к | 100 м.к. | 10 м.к | 100 м.к. | 10 м.к |
| S. aureus № 1 | 66,9±0,3 | 6,2±0,3 | 71,4±0,3 | 7,2±0,1 | 62,4±0,9 | 6,5±0,2 |
| S. aureus № 2 | 67,2±0,4 | 6,5±0,2 | 70,2±0,2 | 7,0±0,3 | 61,8±0,5 | 6,6±0,1 |
| S. aureus № 3 | 68,5±0,1 | 6,8±0,1 | 72,5±0,3 | 7,2±0,1 | 63,3±0,7 | 6,9±0,3 |
| S. aureus № 4 | 69,2±0,2 | 6,7±0,3 | 71,2±0,5 | 7,0±0,3 | 62,1±0,5 | 6,1±0,2 |
| S. aureus № 5 | 71,1±0,4 | 7,0±0,2 | 73,3±0,4 | 7,2±0,2 | 67,2±0,3 | 6,8±0,1 |
| S. aureus ATCC №25923 | 70,8±0,3 | 7,3±0,6 | 72,3±0,6 | 7,1±0,5 | 66,4±0,9 | 6,5±0,3 |
| S. saprophyticus ATCC №1535 | 67,4±0,4 | 6,6±0,1 | 69,5±0,2 | 6,9±0,3 | 60,4±0,6 | 6,2±0,3 |
| S. epidermidis ATCC № 12228 | 65,3±0,5 | 6,6±0,3 | 69,3±0,5 | 7,0±0,2 | 62,4±0,2 | 6,2±0,6 |
| S. epidermidis № 6 | 66,2±0,4 | 7,2±0,4 | 70,3±0,4 | 7,0±0,2 | 61,4±0,1 | 7,0±0,1 |
| S. epidermidis № 7 | 64,2±0,5 | 7,3±0,5 | 68,1±0,2 | 7,0±0,6 | 62,2±0,4 | 6,1±0,3 |
| S. epidermidis № 8 | 68,4±0,4 | 6,7±0,4 | 70,4±0,1 | 6,9±0,45 | 62,4±0,7 | 6,0±0,8 |
| S. epidermidis № 9 | 64,8±0,6 | 6,3±0,3 | 66,5±0,2 | 6,6±0,3 | 61,5±0,4 | 6,0±0,2 |
| S. epidermidis № 10 | 64,5±0,7 | 6,3±0,2 | 67,1±0,3 | 6,7±0,2 | 64,4±0,9 | 6,1±0,4 |

Культурально-морфологічні ознаки були типовими, а окремі біологічні властивості, що вивчалися, залишалися стабільними протягом десяти пасажів при чотирикратному проведенні дослідів.

Наведені данні свідчать про те, що культивування стафілококів можливе, при вмісті ферментолізату зернової барди в діапазоні 15-20 % на літр середовища. Застосування вмісту зернової барди вище ніж 15 % та менше ніж 20 % недоцільно у зв'язку з суттєвим зниженням ростових властивостей запропонованого середовища та не стабільності прояву біологічних властивостей.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика прояву лецитиназної активності на запропонованому середовищі та жовточно-сольовому агарі

| Тест-штами | Лецитиназна активність | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | Розроблене середовище №1 | Розроблене середовище №2 | Контрольне середовище (ЖСА) |
| S.aureus № 1 | +++ | +++ | ++ |
| S. aureus № 2 | +++ | +++ | +++ |
| S. aureus № 3 | +++ | +++ | +++ |
| S. aureus № 4 | ++ | ++ | ++ |
| S. aureus № 5 | ++ | ++ | ++ |
| S. aureus ATCC№25923 | +++ | ++ | +++ |
| S. saprophyticus ATCC №1535 | - | - | - |
| S. epidermidis ATCC № 12228 | - | - | - |
| S. epidermidis № 6 | - | - | - |
| S. epidermidis № 7 | - | - | - |
| S. epidermidis № 8 | - | - | - |
| S. epidermidis № 9 | - | - | - |
| S. epidermidis № 10 | - | - | - |

Примітка: "+" - наявність ознаки; "-" - відсутність ознаки.

Наведені дані вказують на придатність запропонованого середовища для детекції стафілококів та його відмінні ростові властивості.

Порівняння стабільності біологічних властивостей на запропонованому середовищі та на середовищі зі стандартною рецептурою не виявило статистично достовірних відмінностей.

Джерела інформації:

1. Стафілокок. Класифікація і лабораторна діагностика. Навчальний посібник. Харків -2012. С.-76.

2. Патент № 97598 UA "Спосіб одержання поживної основи із зернової барди для культивування мікроорганізмів" / Осолодченко Т. П., Пономаренко С. В., Литвиненко О.А., Лук'яненко Т. В., Менкус О.В., Порт О.В., Штикер Л.Г. - заявник і патентовласник ДУ "ІМІ НАМН".-№ у 2014 10237 заявл. 18.09.2014; опубл. - Бюл. № 6 від 25.03.2015.-6 с

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Середовище для детекції стафілококів, що містить екстракт харчових дріжджів 2,5 г/л, натрію карбонат 0,7 г/л, натрію хлорид 78,5 г/л, натрію фосфорнокислий двоаміщений 0,5 г/л, агар мікробіологічний 11,0±2 г/л та 130 г/л суспензії курячого жовтка у ізотонічному розчині хлориду натрію, яке **відрізняється** тим, що як джерела амінного азоту містить ферментолізат зернової барди в кількості 157,5-210,0 г/л.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601