ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

УКРАЇНА **(19) UA** **(11) 98402** **(13) U**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 12359**

(22) Дата подання заявки: **17.11.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **27.04.2015**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.04.2015, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
Завгородній Андрій Іванович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Калашник Микола Васильович (UA),
Калашник Наталія Василівна (UA)

(73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Живильне середовище для індикації та культивування атипових мікобактерій містить калій фосфорнокислий, магній сірчанокислий, натрій лимоннокислий, гліцерин, яєчну масу, 2 % водний розчин малахітового зеленого, воду дистильовану. Додатково містить калій 2-заміщений, глікокол, натрій L-глутаміновокислий, амоній лимоннокислий 1-заміщений і цинк сірчанокислий.

UA 98402 U

Корисна модель належить до мікробіології і стосується виготовлення живильних середовищ для індикації і культивування з біоматеріалу збудників туберкульозу і атипових мікобактерій та може бути застосована в роботі ветеринарних і медичних лабораторій з метою встановлення первинного діагнозу на туберкульоз, а також для вивчення у виділених польових ізолятів культур мікобактерій тинкторіальних, культурально-морфологічних, біологічних, біохімічних властивостей та чутливості до мікобактеріальних препаратів.

Відоме живильне середовище Гельберга для виділення культур мікобактерій, що містить калій фосфорнокислий двозаміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, пептон, гліцерин, воду, молоко, картопляний відвар, гліцерин, яйця курячі та малахітовий зелений (настанова по діагностиці туберкульозу тварин та птиці, затверджена головним державним інспектором вет. медицини України, 1994 р.).

Існує також живильне середовище Фінн-2, яке містить магній сульфат, натрій цитрат, квасці залізоаміачні, калій фосфат однозаміщений, амоній цитрат однозаміщений, натрію глутамінат однозаміщений, гліцерин, яєчну масу, 2 % розчин малахітового зеленого і дистильовану воду (В кн. "Туберкулез сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним" под. редакцией В.П. Шишкова и В.П. Урбана - М.: ВО "Агропромиздат", 1991).

Недоліками вказаних середовищ є недостатні ростові властивості та висока собівартість.

Найбільш близьким за технічною суттю до заявленого об'єкта є середовище Левенштейна-Йенсена, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сульфат, натрій цитрат, L-аспарагін, гліцерин, яєчну масу та малахітовий зелений. Недоліком цього середовища є недостатня його елективність та повільний ріст мікобактерій. Крім цього до складу компонентів цього середовища входить препарат L-аспарагін, який не виготовляється вітчизняною промисловістю, а закуповується за кордоном.

В основу корисної моделі поставлена задача виготовити живильне середовище для індикації та культивування мікобактерій, що містить калій фосфорнокислий, магній сірчанокислий, натрій лимоннокислий, гліцерин, яєчну масу, 2 % водний розчин малахітового зеленого, воду дистильовану шляхом вилучення L-аспарагіну, заміни калію 1-заміщеного на калій 2-заміщений та додаткового введення глікоколу, натрію L-глутаміновокислого, амонію лимоннокислого 1-заміщеного і цинку сірчанокислого, при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

калій фосфорнокислий 2-заміщений	1,0-4,0
магній сірчанокислий	0,075-0,3
натрій лимоннокислий	0,19-0,76
глікокол	1,25-5,0
натрій L - глутаміновокислий	1,25-5,0
амоній лимоннокислий 1-заміщений	0,2-0,8
цинк сірчанокислий	0,001-0,003
гліцерин	30,0 $см^3$
2 % водний розчин малахітового зеленого	20 $см^3$
яєчна маса	670 $см^3$
вода дистильована не більше	1000,0 $см^3$,

pH 7,0±0,2 (доводиться 0,1 N розчином їдкого натру або 10 % розчином лимонної кислоти).

Аналіз складу відомих щільних живильних середовищ для виділення і культивування мікобактерій показав, що при їх виготовленні використовують глікокол, натрій L-глутаміновокислий у сполученні з іншими компонентами та в інших пропорціях. Однак використання перелічених інгредієнтів у відомих живильних середовищах в поєднанні з іншими компонентами та в інших пропорціях не дозволяє підвищити ростові властивості цих середовищ. Зокрема прискорити ріст збудників туберкульозу та накопичення бактеріальної маси, а також зменшити собівартість середовища.

Порівняльний аналіз живильного середовища, що заявляється, із прототипом дозволяє зробити висновок про те, що живильне середовище відрізняється від відомого заміною калію фосфорнокислого 1-заміщеного на калій фосфорнокислий 2-заміщений та введенням до складу нових компонентів, а саме глікоколу, натрію L-глутаміновокислого, амонію лимоннокислого 1-заміщеного та цинку сірчанокислого, що відповідає критерію "новизна".

Склад компонентів, що пропонується, стимулює адаптацію та вегетацію збудника туберкульозу, надає новий ефект, що дозволяє підвищити елективні властивості середовища,

діагностичну ефективність за рахунок прискорення росту збудників туберкульозу та накопичення бактеріальної маси у мікобактерій.

Живильне середовище готують таким чином: наважки солей розчиняють у дистильованій воді в наведеній вище послідовності, додають гліцерин, ретельно змішують, доводять pH до значення 7,0±0,2 розчином 0,1 N їдкого натру або 10 % розчином лимонної кислоти, фільтрують через паперовий фільтр, розливають у 500 мл флакони і стерилізують при 1,5 атм протягом 30 хвилин.

Яєчну масу готують окремо із свіжих курячих яєць, які ретельно миють щіткою з милом, протирають ватним тампоном, змоченим у 70° спирті, шкаралупу яєць розбивають стерильним шпателем, вміст яєць зливають в стерильну колбу з бусами, гомогенізують до одержання однорідної маси, додають сольовий розчин і 2 % водний розчин малахітового зеленого, перемішують, фільтрують через стерильні марлеві салфетки та доводять pH до 7,0±0,2. Отримане таким чином середовище розливають у стерильні бактеріологічні пробірки по 4-4,5 мл та коагулюють в скошеному положенні в апараті для інактивації сироватки крові за температури 90 °С протягом 60 хвилин.

Виготовлене живильне середовище перевіряють на стерильність та зберігають в холодильнику при 4 °С 30 діб.

Приклад 1. Живильне середовище готують за наведеною схемою при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

калій фосфорнокислий 2-заміщений	1,0
магній сірчанокислий	0,075
натрій лимоннокислий	0,19
глікокол	1,25
натрій L - глутаміновокислий	1,25
амоній лимоннокислий 1-заміщений	0,2
цинк сірчанокислий	0,001
гліцерин	30 $см^3$
2 % водний розчин малахітового зеленого	20 $см^3$
яєчна маса	670 $см^3$
вода дистильована	до 1000 $см^3$,

pH 7,0±0,2 (доводиться 0,1 N розчином їдкого натру або 10 % розчином лимонної кислоти).

Приклад 2. Теж, що в прикладі 1 при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

калій фосфорнокислий 2-заміщений	2,0
магній сірчанокислий	0,15
натрій лимоннокислий	0,38
глікокол	2,5
натрій L - глутаміновокислий	2,5
амоній лимоннокислий 1-заміщений	0,4
цинк сірчанокислий	0,002
гліцерин	30 $см^3$
2 % водний розчин малахітового зеленого	20 $см^3$
яєчна маса	670 $см^3$
вода дистильована	до 1000 $см^3$,

pH 7,0±0,2 (доводиться 0,1 N розчином їдкого натру або 10 % розчином лимонної кислоти).

Приклад 3. Теж, що в прикладі 1 та 2 при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

калій фосфорнокислий 2-заміщений	4,0
магній сірчанокислий	0,3
натрій лимоннокислий	0,76
глікокол	5,0
натрій L - глутаміновокислий	5,0

амоній лимоннокислий 1-заміщений	0,8
цинк сірчанокислий	0,003
гліцерин	30 $см^3$
2 % водний розчин малахітового зеленого	20 $см^3$
яєчна маса	670 $см^3$
вода дистильована	до 1000 $см^3$,

pH 7,0±0,2 (доводиться 0,1 N розчином їдкого натру або 10 % розчином лимонної кислоти).

Ростові властивості середовища визначали шляхом висіву 0,1 $см^3$ зависі мікобактерій туберкульозу виду M. bovis (шт. Vallee), M. tuberculosis (шт. $H_{37}Rv$), M. avium (шт. M. avium ИЭКВМ-УААН), а також 5 проб патологічного матеріалу від хворих на туберкульоз тварин.

Після висіву культур мікобактерій та проб біоматеріалу пробірки з посівами закривали ватно-марлевими пробками і культивували в горизонтальному положенні за температури 37 °С протягом 3 діб. Після цього пробки заливали парафіном, розміщали в бактеріологічні штативи та інкубували в термостаті при 37 °С протягом 60 діб.

Облік росту колоній проводили через кожні 3-7 діб після висіву.

Результати вивчення ростових властивостей мікобактерій на живильних середовищах наведені в таблиці.

Із матеріалів, наведених в таблиці видно, що первинний ріст поодиноких колоній референтних штамів збудників туберкульозу M. bovis, M. tuberculosis на живильному середовищі при мінімальному співвідношенні компонентів (приклад 1) було встановлено на 16 добу культивування, M. avium - на 10 добу, а з біоматеріалу від хворих на туберкульоз тварин - на 21 добу. На середовищі з оптимальним співвідношенням компонентів (приклад 2) первинний ріст колоній M. bovis, M. tuberculosis виявляли на 10 добу, M. avium - на 7 добу, із біоматеріалу на 13 добу культивування. На середовищі з максимальним вмістом компонентів (приклад 3) «-» на 13, 10, та 21 добу відповідно.

На базовому середовищі Левенштейна-Йенсена первинний ріст поодиноких колоній референтних штамів M. bovis, M. tuberculosis виявляли на 16 добу, M. avium - на 10 добу, із біоматеріалу на 21 добу культивування.

Що стосується інтенсивності росту колоній на живильних середовищах у досліді, то в прикладі 2 суцільний ріст колоній мікобактерій спостерігається на 24-29 добу, в контролі - на 31-38 добу, а із біоматеріалу на 38 та 52 добу відповідно у вигляді шароподібних колоній світло-сірого кольору з нерівною шорсткою поверхнею.

Таким чином, розроблене живильне середовище має високі адаптивні та елективні властивості, забезпечує накопичення бактеріальної маси для проведення тинкторіальних, культурально-морфологічних, біологічних, біохімічних досліджень епізоотичних культур мікобактерій, що дозволяє скоротити строки визначення видової належності у первинно виділених культур мікобактерій і тим самим скоротити термін встановлення первинного діагнозу на туберкульоз, а також зменшити собівартість бактеріологічних досліджень.

Таблиця

Живильне середовище для індикації та культивування атипових мікобактерій

Колоній мікобакт. Через діб	Пропоноване живильне середовище												Базове живильне середовище			
	Приклад 1				Приклад 2				Приклад 3							
	Штамм Vallee	Штамм $H_{37}Rv$	Штамм M. Avium	Пат. матеріал	Штамм Vallee	Штамм $H_{37}Rv$	Штамм M. Avium	Пат. матеріал	Штамм Vallee	Штамм $H_{37}Rv$	Штамм M. Avium	Пат. матеріал	Штамм Vallee	Штамм $H_{37}Rv$	Штамм M. Avium	Пат. матеріал
7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
13	-	-	+	-	+	+	++	+	+	+	+	-	-	-	+	-
16	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	-	+	+	++	-
21	+	+	++	+	++	++	+++	++	+	+	++	+	+	+	++	+
24	+	+	++	+	++++	++++	++++	++	++	++	++	+	++	++	+++	+
29	++	++	+++	+	++++	++++	++++	+++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+
31	++	++	+++	+	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++++	+
38	+++	+++	++++	+	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	++++	++++	++++	++
45	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++
52	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	+++
60	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++

Примітки:
«-» - відсутність росту колоній,
«+» - ріст від 5 до 10 колоній,
«++» - ріст від 10 до 20 колоній,
«+++» - ріст від 20 до 50 колоній,
«++++» - суцільний ріст колоній.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Живильне середовище для індикації та культивування атипових мікобактерій, що містить калій фосфорнокислий, магній сірчанокислий, натрій лимоннокислий, гліцерин, яєчну масу, 2 % водний розчин малахітового зеленого, воду дистильовану, яке **відрізняється** тим, що додатково містить калій 2-заміщений, глікокол, натрій L-глутаміновокислий, амоній лимоннокислий 1-заміщений і цинк сірчанокислий, при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

калій фосфорнокислий 2-заміщений	1,0-4,0
магній сірчанокислий	0,075-0,3
натрій лимоннокислий	0,19-0,76
глікокол	1,25-5,0
натрій L - глутаміновокислий	1,25-5,0
амоній лимоннокислий 1-заміщений	0,2-0,8
цинк сірчанокислий	0,001-0,003
гліцерин	30,0 $см^3$
2 % водний розчин малахітового зеленого	20 $см^3$
яєчна маса	670 $см^3$
вода дистильована не більше	1000,0 $см^3$.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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