



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38452 (13) U

(51) МПК (2006)

C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИЛІЗОЦИМНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ E. COLI

1

2

(21) u200810442

(22) 15.08.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ВЛАДИМИРСЬКИЙ ІГОР БОРИСОВИЧ, UA,  
ВОЛИНЕЦЬ ЛЕОНІД КУЗЬМИЧ, UA(73) ВЛАДИМИРСЬКИЙ ІГОР БОРИСОВИЧ, UA,  
ВОЛИНЕЦЬ ЛЕОНІД КУЗЬМИЧ, UA

(57) Спосіб визначення антилізоцимної активності E.coli, що включає готування поживного агару з додаванням до нього стерильного фізіологічного розчину з ферментом, який пригнічує ріст мікроорганізмів, нанесенням на нього дослідних добових агарових культур, вирощування мікроорганізмів

при 37°C в термостаті протягом 18-24 год., наступне оброблення парами хлороформу вирощених мікроорганізмів та внесення на оброблений матеріал другим шаром *Micrococcus luteus* на фізіологічному розчині з 0,7%-ним поживним агаром та інкубування протягом 24 год. при 37°C, який відрізняється тим, що як фермент, який пригнічує ріст мікроорганізмів, використаний препарат "Лісобакт", який містить лізоциму хлорид та піридоксину гідрохлорид, і за рівень антилізоцимної активності досліджуваних культур приймають максимальне значення концентрації "Лісобакту" (лізоциму хлориду) в поживному середовищі, при якому ще спостерігається ріст *Micrococcus luteus*.

Галузь техніки до якої відноситься корисна модель: медицина, мікробіологія, ветеринарна медицина, а саме при вивченні факторів персистенції ентеробактерій які були виділені із патологічного матеріалу, зовнішнього середовища та продуктів тваринництва.

Антилізоцимна активність - це здатність патогенного мікроорганізму протидіяти лізоциму, що є з одним із факторів неспецифічної реактивності макроорганізму, і таким чином пристосовується до існування в організмі господаря.

Відомий спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій E.coli [Аналог - Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. Москва. Медицина. 1999. - С.88.], що включає (приготування поживного агару з яєчним лізоцимом). Для постановки антилізоцимної активності мікроорганізмів в чашки Петрі до 1,5% поживного агару додається яєчний лізоцим в різній концентрації. Але використання яєчного лізоциму значно утруднює процес визначення антилізоцимної активності бактерій E.coli, тому, що яєчний лізоцим є менш доступний, та економічно не вигідний.

В основу корисної моделі поставлена задача, розробка способу визначення антилізоцимної активності бактерій E.coli, в якому замість яєчного лізоциму використовуємо препарат „Лісобакт“.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення антилізоцимної активності ба-

ктерій E.coli, включає в себе готування поживного агару з додаванням до нього стерильного фізіологічного розчину з ферментом, який пригнічує ріст мікроорганізмів, нанесенням на нього дослідних добових агарових культур, вирощування мікроорганізмів при 37°C в термостаті протягом 18-24 год., наступне оброблення парами хлороформу вирощених мікроорганізмів та внесення на оброблений матеріал другим шаром *Micrococcus luteus* на фізіологічному розчині з 0,7%-ним поживним агаром та інкубування протягом 24 год. при 37°C, який відрізняється тим, що як фермент, який пригнічує ріст мікроорганізмів використуваний препарат „Лісобакт“, який містить лізоциму хлорид та піридоксину гідрохлорид, і за рівень антилізоцимної активності досліджуваних культур приймають максимальне значення концентрації „Лісобакт“ (лізоциму хлориду) в поживному середовищі, при якому ще спостерігається ріст *Micrococcus luteus*.

„Лісобакт“ - відомий препарат (реєстраційний номер: UA/2 790/01/01 затверджено Наказом Міністерства охорони здоров'я України №106 від 14.03.2005) який пропонується для постановки реакції по визначенню антилізоцимної активності бактерій E.coli.

Спосіб визначення антилізоцимної активності бактерій, здійснюється шляхом розведення „Лісобакт“ за наступною схемою: 20мг „Лісобакт“ поміщаємо в пробірку та додаємо 20см<sup>3</sup> стерильного

(13) U

(11) 38452

(19) UA

фізіологічного розчину. До  $0,5\text{см}^3$  отриманого розведення додаємо  $9,5\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину. Потім робимо такі розведення: до  $0,1\text{см}^3$  отриманого розведення додаємо  $0,9\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину ( $1\text{мкг}/\text{см}^3$ ), до  $0,2\text{см}^3$  отриманого розведення -  $0,8\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину ( $2\text{мкг}/\text{см}^3$ ), до  $0,3\text{см}^3$  отриманого розведення -  $0,7\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину ( $3\text{мкг}/\text{см}^3$ ), до  $0,4\text{см}^3$  отриманого розведення -  $0,6\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину ( $4\text{мкг}/\text{см}^3$ ), до  $0,5\text{см}^3$  отриманого розведення -  $0,5\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину ( $5\text{мкг}/\text{см}^3$ ), і так до ( $10\text{мкг}/\text{см}^3$ ). Потім дане розведення заливаємо в чашки Петрі і додаємо до нього  $4\text{см}^3$  1,5% поживний агар. Також готуємо контроль, в якому замість розведення „Лісобакт” додаємо  $1\text{см}^3$  стерильного фізіологічного розчину. Чашки підсушують у термостаті при  $37^\circ\text{C}$  протягом 10-15хв. Готуємо 1млрд. завис дослідних добових агарових культур в стерильному фізіологічному розчині і наносимо на поверхню приготованого середовища бактеріологічною петлею у вигляді бляшок. Всі чашки поміщаємо в термостат при температурі  $37^\circ\text{C}$  на 18-24год. Макроколонії, що вирости, обробляють парами хлороформу, для цього чашки перевертають, поклавши в кришку

шматочки паперу ватману розміром в  $10\text{см}^3$ , який пропитаний  $0,2\text{-}0,5\text{см}^3$  хлороформу. Чашки тримають на протязі 30хв. Готують 1млрд. завис добової агарової культури *Micrococcus luteus* у фізіологічному розчині, вносять у чашки Петрі другим шаром, додаючи до індикаторної культури мікрококу 3мл 0,7%-ного поживного агару. Чашки розміщують в термостат на 24 години при  $37^\circ\text{C}$ .

За рівень антилізоцимної активності досліджувальних культур приймають максимальне значення концентрації „Лісобакт” (лізоциму хлориду) в поживному середовищі, при якому ще спостерігається ріст *Micrococcus luteus*.

Порівняльні результати використання із 1,5% поживним агаром „Лісобакт” (реєстраційний номер:UA/2790/01/01 від 14.03.2005), ясного лізоциму та контролю (1,5% поживний агар із додаванням фізіологічного розчину) наведено у таблиці.

В якості тест-культури використовували *Micrococcus luteus*. Дослід із визначення антилізоцимної активності кожного штаму *E. coli* проводили в 5-ти повтореннях. Результати всіх дослідів співпадали. При обробці статистичних даних одержали достовірний результат ( $p < 0,05$ ).

Таблиця

Наявність антилізоцимної активності досліджуваних штамів *E.coli* по відношенню до живого *Micrococcus luteus*

Досліджуваний штам	Кількість досліджень	Наявність антилізоцимної активності		Контроль
		Середовище 1	Середовище 2	
<i>E.coli</i> O111	5	-	-	+
<i>E.coli</i> O157:H7№64	5	+	+	+
<i>E.coli</i> O8	5	+	+	+
<i>E.coli</i> O157:H88 №1297	5	+	+	+

Середовище 1-1,5% поживний агар із додаванням ясного лізоциму у кількості (від  $1\text{мкг}/\text{см}^3$  до  $10\text{мкг}/\text{см}^3$ ).

Середовище 2-1,5% поживний агар із додаванням „Лісобакт” кількості (від  $1\text{мкг}/\text{см}^3$  до

$10\text{мкг}/\text{см}^3$ ).

Із поданих даних у таблиці №1 видно, що штами *E.coli* O157:H7 №64, *E.coli* O157:H88 №1297, *E.coli* O8 мають персистентні властивості, а штам *E.coli* O111 таких властивостей не має.