



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39178 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ L-ФОРМ МІКОБАКТЕРІЙ З ПРОБ ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

1

2

(21) u200810981

(22) 08.09.2008

(24) 10.02.2009

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) ЗАВГОРОДНИЙ АНДРІЙ ІВАНОВИЧ, UA, ТА-
РАСОВА ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕ-
РИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(57) Спосіб виділення L-форм мікобактерій з проб патологічного матеріалу, що включає обробку проб 3% розчином сірчаної кислоти, триразове відмивання, висів на щільне та напівсинтетичне середовище Школьникової, який **відрізняється** тим, що гомогенізують патологічний матеріал стерильним піском та додатково фільтрують надосадову рідину через стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,45мкм.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології і може бути використана для виділення L-форм мікобактерій з проб патологічного матеріалу та застосована в ветеринарній медицині як спосіб виділення L-форм мікобактерій при дослідженнях на туберкульоз.

Існує спосіб виділення L-форм мікобактерій, який передбачає обробку проб патологічного матеріалу 6% розчином сірчаної кислоти в співвідношенні 1:4, потім центрифугування при 3000об/хв протягом 15 хвилин, з загальною експозицією 30 хвилин. З отриманого осаду готують мазки та висівають на щільне поживне середовище [метод Гона. Лабораторные исследования в ветеринарии, Москва, 1971, с 84-102].

Існує також спосіб обробки патологічного матеріалу: подрібнюють в ступки, гомогенізують стерильним піском, додають 5% розчин щавлевої кислоти і залишають на 15 хвилин, та одноразово відмивають стерильним фізіологічним розчином. Матеріал розтирають та висівають на поживне середовище [Лабораторные исследования в ветеринарии, Москва, 1971, с.84-102].

Недоліком обох способів є пагубна дія кислоти, яка використовується без подальшого відмивання фізіологічним розчином, високий ріст сторонньої мікрофлори та паралельне виділення як L-форм, так і R,S форм мікобактерій, що ускладнює ідентифікацію культур, та зменшує чутливість запропонованих способів.

Найбільш близьким рішенням за технічною суттю до заявляемого об'єкту є спосіб виділення L-форм мікобактерій. За цим способом дослідний матеріал поміщають в банку з бусами, додають 3% розчин сірчаної кислоти та струшують протя-

гом 10 хвилин. Після чого центрифугують при 2000об/хв протягом 10 хвилин, експозицією 20 хвилин, та трьохразово відмивають стерильним фізіологічним розчином шляхом центрифугування протягом 10 хвилин. Одержаний осад ресуспендують 2см³ стерильним фізіологічним розчином та висівають досліджувану пробу по 0.2см³ на щільне живильне середовище Левенштейна-Йенсена та напівсинтетичне середовище Школьникової. [Савченко П.Е., Лабораторна діагностика туберкульоза животных-Чернигов, 1998, с.64.]

Недоліком цього способу є високий відсоток росту сторонньої мікрофлори та паралельний ріст на середовищі Школьникової як L-форм, так і бактеріальних форм мікобактерій, що ускладнює їх ідентифікацію.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виділення L-форм мікобактерій з проб патологічного матеріалу, що містить обробку проб 3% розчином сірчаної кислоти, трьохразове відмивання, висів на щільне та напівсинтетичне середовище Школьникової шляхом гомогенізації патологічного матеріалу стерильним піском, та додаткового фільтрування надосадової рідини через стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0.45мкм., щоб забезпечити ефективність способу.

Порівняльний аналіз способу, що заявляється, і найближчому аналогу показує, що заявляємий спосіб виділення L-форм мікобактерій з проб патологічного матеріалу відрізняється від відомого тим, що гомогенізують патологічний матеріал стерильним піском та додатково проводиться фільтрація через стерильні мембранні фільтри з діамет-

(13) U

(11) 39178

(19) UA

ром пор 0.45мкм досліджуваних проб та висів фільтрату на середовища.

Спосіб виконується таким чином:

Проби тканини подрібнюють в стерильній ступці ножицями і заливають 3% розчином сірчаної кислоти та залишають на 10 хвилин. Кислоту зливають та трьохразово відмивають стерильним розчином. Засипають стерильним піском та розтирають, отриману завісь відстоюють 5 хвилин, надосадкову рідину відбирають стерильною піпеткою та фільтрують за допомогою стерильних мембранних фільтрів з діаметром пор 0.45мкм. Отриманий фільтрат висівають на середовище Школьникової та на щільне яєчне середовище для культивування мікобактерій (по 10 пробірок на пробу) і культивують в термостаті при температурі 37°C протягом трьох місяців. Облік росту проводять кожні 5-7 діб. З метою збільшення фільтрату об'єм дослідної проби збільшують до 100см³.

Приклад 1.

Проби патологічного матеріалу подрібнювали в стерильні ступки ножицями, додавали 3% розчин сірчаної кислоти з експозицією 10 хвилин та трьохразово відмивали стерильним фізіологічним розчином, розтирали з стерильним піском. Осад фільтрували за допомогою стерильних мембранних фільтрів з діаметром пор 0.45мкм. Отриманий фільтрат висівали на середовище Школьникової

та на щільне яєчне середовище для культивування мікобактерій.

Приклад №2.

Теж, що і в прикладі 1 при застосуванні 5% розчину сірчаної кислоти та експозиції також 10 хвилин.

Приклад №3.

Теж, що і в прикладі 1, 2 при застосуванні 10% розчину сірчаної кислоти та експозиції також 10 хвилин.

При передпосівній обробці запропонованим способом проб патологічного матеріалу від великої рогатої худоби, з застосуванням 3% розчин сірчаної кислоти (приклад 1) було виділено 18 культур L-форм мікобактерій, та у проб відмічений ріст банальної мікрофлори 2%. При обробці патматеріалу 5% розчинам сірчаної кислоти (приклад 2) виділено 7 культур L-форм мікобактерій та відмічений ріст банальної мікрофлори 1%.. При обробці патматеріалу 10% розчином сірчаної кислоти ріст L-форм мікобактерій та секундарної мікрофлори не виявляли на живильному середовищі. Результати дослідів наведені у таблиці.

Запропонований спосіб, передпосівної обробки патологічного матеріалу дозволяє виділити більше культур L-форм мікобактерій із патологічного матеріалу, відповідає сучасним вимогам при роботі з заразним матеріалом, безпечний і ефективний при роботі.

Таблиця

| | Розчин кислоти | Кількість проб | Виділено культур L-форм мкб. | | Кількість проросту |
|-------------------|----------------|----------------|------------------------------|----------|--------------------|
| | | | кількість | відсоток | |
| Приклад 1 | 3% | 32 | 18 | % | 2% |
| Приклад 2 | 5% | 32 | 7 | % | 1% |
| Приклад 3 | 10% | 32 | 0 | % | 0% |
| Найближчий аналог | | 32 | 4 | % | 24% |