



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50927 (13) A

(51) C 12N1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИРОЩУВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1	2
(21) 2001064199	натрій двовуглекислий 0,08 - 0,1
(22) 18 06 2001	спирт ректифікований 0,7 - 0,9
(24) 15 11 2002	кальцій хлористий 0,1 - 0,15
(46) 15 11 2002, Бюл. №11, 2002 р.	натрій піроцитрат дво-
(72) Колос Юрій Олександрович, Лазарев Олексій Павлович	замінний 0,007 - 0,009
(73) Колос Юрій Олександрович, Лазарев Олексій Павлович	глюкоза безводна 0,011 - 0,014
(57) Спосіб вирощування мікобактерій туберкульозу шляхом обробки посівного матеріалу активатором росту та його висіву на поживне середовище, який відрізняється тим, що як стимулятор росту мікобактерій використовують активатор наступного складу, г/л	вода дистильована до 1,0 л,
сахароза хімічно чиста 2,0 - 4,0	а як поживне середовище використовують середовище наступного складу, г/л
	агар-агар 20 - 40
	пептон 40 - 60
	кальцій хлористий 0,1 - 0,15
	крохмаль картопляний 10 - 25
	натрій двовуглекислий 1 - 2
	вода дистильована до 1,0 л

Винахід відноситься до мікробіології і може бути використаний в клінічних та бактеріологічних лабораторіях медичних і ветеринарних установ.

Відомі способи бактеріологічних досліджень на туберкульоз, які включають вирощування мікобактерій туберкульозу та згідно з якими дослідний патматеріал висівають на поживне середовище Левінштейна-Йенсена, Фінна та ряд інших («Методические указания по применению унифицированных микробиологических исследований при туберкулезе», п 22, с 15-20, Москва, 1978). Але такі способи забезпечують дуже повільний ріст мікобактерій (20 - 90 діб), що значно знижує ефективність діагностики. Окрім того, до недоліків середовища, наприклад, Левінштейна-Йенсена можна віднести і те, що в його склад входить яєчна маса, внаслідок чого термін зберігання приготовленого середовища обмежений, а саме середовище складне по набору інгредієнта та по виготовленню (протягом 3 діб).

Відомі також спроби різних авторів досягти прискореного росту мікобактерій туберкульозу. Так, Степанова Л.А. (а с СССР 566877 С 12 К1/Л00) одержувала прискорення росту мікобактерій шляхом обробки патологічного матеріалу перед посівом високочастотним електромагнітним полем, що дозволяло значно скоротити строки їх росту, але всеж результати аналізу можна було одержати не раніше, ніж за місяць, а Назарчук М.І. із співавторами (а с СССР, 1063836, С 12 К 1/04)

використовували в якості активатора росту мікобактерій розчин ентерохеліна. У них ріст мікобактерій починався з 15-17 доби інкубації, однак для одержання остаточного результату необхідно було витримувати посіви в термостаті до 30-60 діб.

Завданням даного винаходу є розробка способу вирощування мікобактерій туберкульозу, який був би простим в виконанні та сприяв скороченню часу проведення бактеріологічних досліджень.

Поставлене завдання вирішується тим, що згідно з запропонованим способом вирощування мікобактерій туберкульозу шляхом обробки посівного матеріалу активатором росту та його висіву на поживне середовище якості активатора росту мікобактерій використовують активатор наступного складу, г/л: сахароза хімічно чиста - 2,0-4,0г, натрій двохвуглекислий - 0,08-0,1г, спирт ректифікований - 0,7-0,9г, кальцій хлористий - 0,1-0,15г, натрій піроцитрат дво-замінний - 0,007-0,0009г, глюкоза безводна - 0,011-0,014г, вода дистильована до - 1,0л, а в якості поживного середовища використовують середовище наступного складу, г/л: агар-агар - ГОСТ-1628-70 - 20-40г, пептон - ГОСТ-1385-60 - 40-60г, кальцій хлористий - 0,1-0,15г, крохмаль картопляний - 10-25г, натрій двохвуглекислий - 1-2г, вода дистильована - до 1,0л.

Вирішення поставленого завдання ілюструється прикладами конкретного виконання.

Приклад 1. Активатор росту та дослідне пожи-

(13) A  
(11) 50927  
(19) UA

вне середовище готували з мінімальною кількістю інгредієнтів, що заявляється

Компоненти активатора росту мікобактерій розчиняли в дистильованій воді і стерилізували в автоклаві 20хв при  $120^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Інгредієнти поживного середовища змішували із дистильованою водою і кип'ятили до повного їх розчинення, стерилізували в автоклаві 20хв при  $120^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , рН поживного середовища доводили до 7,2-7,3, потім розливали в пробірки

Для перевірки ефективності способу вирощування мікобактерій використовували вакцинний штам БЦЖ, музейні культури туберкульозу (штам *M. tuberculosis* H-37Rv, *M. bovis* шт. Балпе)

Кожну тест-культуру обробляли стимулятором росту і витримували в термостаті 18 годин при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ , після чого пересівали на 10 пробірок із середовищем. Посіви витримували в термостаті при температурі  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  і переглядали щоденно протягом 10 діб, а далі через кожні 10 діб до 3 місяців після посіву

Ріст тест-культур мікобактерій туберкульозу, оброблених активатором росту згідно з запропонованим способом, на поживному середовищі з мінімальним вмістом інгредієнтів спостерігався через 24-36 годин інкубації, але ріст був недостатньо активним, газонний ріст культур появлявся на 2-3 добу

Приклад 2. Активатор росту та поживне середовище одержували, як в прикладі 1, але готували їх із середньою (оптимальною) кількістю інгредієнтів активатора росту: сахароза хімічно чиста - 3,0г, натрій двофосфатний - 0,09г, спирт ректифікований - 0,8г, кальцій хлористий - 0,12г, натрій пірофосфат двоаміний - 0,008г, глюкоза безводна - 0,012г, вода дистильована до 1,0л, поживне середовище: агар-агар - ГОСТ-1628-70 - 30г, пептон - ГОСТ-1385-60 - 50г, кальцій хлористий - 0,1г, крохмаль картопляний - 12,5г, натрій двофосфатний - 1,5г, вода дистильована - до 1,0л

При використанні запропонованого авторами способу ріст колоній з'явився через 24-48 годин, а через 48-72 години спостерігався газонний ріст на всіх посівах

Приклад 3. Активатор росту та поживне середовище одержували, як в прикладі 1, але готували їх із максимальною кількістю інгредієнтів, що заявляється

В процесі досліджень встановлено, що при запропонованому способу ріст мікобактерій на поживному середовищі з'являвся через 48-72 годин,

але спочатку спостерігався не на всіх засіяних пробірках і лише через 72 годин з'явився на всіх «косяках», а газонний ріст відмічався через 72-96 годин

В якості контролю був існуючий спосіб вирощування мікобактерій з використанням поживних середовищ Левінштейна-Йенсена та Фінна-2. На контрольному середовищі Левінштейна-Йенсена ріст тест-культур мікобактерій з'явився на 20-23 день, а на середовищі Фінна-2 - на 17-19 добу

Приклад 4. Активатор росту та поживне середовище одержували, як в прикладі 1, і готували їх із середньою (оптимальною) кількістю інгредієнтів

Посівним матеріалом були мокрота (харкотиння), в якій при мікроскопії спостерігали мікобактерії туберкульозу та кров хворих

Мокроту обробляли 10% фосфорнокислим натрієм, витримували 18 годин, центрифугували, осад промивали фізрозчином, центрифугували, до осаду додавали 1,5-2мл активатора росту мікобактерій, ретельно змішували, витримували 18-24 години в термостаті при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ , після чого висівали на пробірки з поживним середовищем згідно з винаходом. Стерильно взятую кров висівали без обробки інгібітором. До неї добавляли рівну кількість активатора росту, витримували в 18-24 годин в термостаті і висівали на дослідне середовище

Для контролю харкотиння і кров висівали від цих же хворих по існуючому способі на середовища Левінштейна-Йенсена та Фінна-2

Для досліджень використали матеріал від 10 хворих

Використовуючи спосіб, що заявляється, отримали ріст мікобактерій на 1-4 добу в усіх висіяних зразках крові та мокроті

На контрольних середовищах, з використанням відомого способу вирощування мікобактерій, ріст мікобактерій спостерігався лише при посіві мокроті і не з усіх посіяних проб на середовищі Левінштейна-Йенсена - в 7 на 20-40 добу, а на середовищі Фінна-2 - в 8 на 18-30 день

Таким чином, запропонований спосіб вирощування мікобактерій туберкульозу дозволяє одержати ріст мікобактерій (тест-культури) на 2-3 добу, а із нативного матеріалу - на 3-5 день, в той час як при використанні відомого способу для цього потрібно 17-90 діб

Спосіб, який заявляється, простий у використанні, компоненти, які в ньому використовуються у винаході, виготовляються на Україні, вони дешеві і не дефіцитні

---

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 - 20 - 90

---

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 - 32 - 71