



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16829 (13) U
(51) МПК (2006)
C12Q 1/00
C12Q 1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОЇ МІКРОФЛОРИ В НЕВЕЛИКИХ КІЛЬКОСТЯХ ЕКСУДАТУ З ВЕЛИКИХ СЛИННИХ ЗАЛОЗ

1	2
<p>(21) u200603224 (22) 27.03.2006 (24) 15.08.2006 (46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р. (72) Большакова Галина Михайлівна, Бірюкова Світлана Василівна, Савінова Олена Михайлівна, Кучма Ірина Юріївна, Чернявський Віталій Ілліч, Маніна Жанна Миколаївна (73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ (57) Спосіб визначення патогенної мікрофлори в невеликих кількостях ексудату з великих слинних залоз, який включає взяття матеріалу з проток слинних залоз і висівання на живильне середовище, яке містить:</p>	<p>сухе середовище для контролю стерильності 33,0 г пептон 15,0 г натрій тіогліколят 1,0 г натрій метабісульфіт $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ або натрій гідросульфід ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 0,1 г натрій фосфорнокислий двозамісний (Na_2HPO_4) 1,0 г хлористий калій (KCl) 0,2 г живильний бульйон з аміним азотом 120-150мг % 1,0 л, з подальшою ідентифікацією мікроорганізмів, який відрізняється тим, що до середовища додають м'ясо-пептонний агар на дріжджовій основі у кількості 2,0 г.</p>

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до розділу мікробіології і призначена для застосування в мікробіологічних (бактеріологічних), клініко-діагностичних лабораторіях лікувально-профілактичних установ.

Актуальність розробки пропонованого способу диктується неухильним зростанням кількості хронічних запальних захворювань слинних залоз (ХЗЗСЗ), обумовлених погіршенням екологічної ситуації, коли створюються оптимальні умови для розмноження патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів із зміненими властивостями.

Рішення проблеми етіології ХЗЗСЗ можливо шляхом розробки високоінформативних для широкої медичної практики і швидких у виконанні методів виявлення наявності збудника в слинних залозах пацієнтів. Вживані в даний час мікробіологічні методи визначення бактерійного інфікування даного біотопу не цілком відповідають даним вимогам [Приказ МЗ СССР №535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" Утв. зам. Министра здравоохран. СССР Ю.Ф. Исаковым и нач. Гл. упр. лечебно-профилактич. помощи А.М. Москвичевым 22.04.85. / МЗ СССР - М.,

1985.-123с.]

Взяття ексудату із привушних та підщелепних великих слинних залоз при хронічному запаленні проводять за допомогою спеціальних канюль після прийому хворим 8 крапель 1% розчину пілокарпина гідрохлориду по методиці І.Ф.Ромачевої [Ромачева И.Ф., Юдин Л.А., Афанасьев В.В., Морозов А.Н. Заболевания и повреждения слюнных желез // Методы обследования больных с заболеваниями слюнных желез.-М.: Медицина, 1987.-С. 12-34].

Доставляється матеріал в стерильних шприцах із спущеним повітрям. У разі отримання достатньої кількості ексудату (від 0,5мл і більше) використовується класична схема дослідження: приготування мазків, прямий посів методом розведення на всі диференціально-діагностичні середовища і в середовище накопичення. Але специфіка ХЗЗСЗ припускає надходження мінімальних кількостей матеріалу - 0,1-0,2мл.

Необхідно підібрати одне середовище, яке ідеально відповідає для зростання і накопичення бактерій всіх типів дихання. Основою для її приготування може послужити склад одного з поживних середовищ для анаеробів, таких як наприклад, середовище Вілкінса-Чалгрена, яке містить пан-

(19) UA (11) 16829 (13) U

креалізати казеїну і желатину, дріжджовий екстракт, глюкозу, хлористий натрій, L-аргінін, піруват натрію, агар, гемін, вітамін K₁ і дистильовану воду. Застосовують також середовище Клаузена, яке містить триптон, дріжджовий екстракт, пептон, глюкозу, хлориди натрію, кальцію і магнію, динатрійфосфат, цитрат, дитіонат і біфосфат натрію, L-цистин, L-аспарагін, лецитин, сульфати магнію, кобальту, заліза і цинка, твін-80, агар і дистильовану воду). Проте ці середовища містять дорогі і рідкісні інгредієнти.

Відомі багато інших поживних середовищ для виділення анаеробів, яке можливо використовувати для визначення патогенної мікрофлори в невеликих кількостях ексудату з великих слинних залоз [Каталог фірми Oxoid, Великобританія, 1991; Morello G.A., Graves M.H. Clinical Anaerobic Bacteriology.-Laboratory Management, 1977], Середовище Шадлера містить:

Панкреалізація сої	10,0г
Пептон	5,0г
Дріжджовий екстракт	5,0г
Глюкоза	5,0г
Цистеїн	0,4г
Гемін	0,01г
Агар	13,5г
Трис-буфер	0,75г
Дистильована вода	до 1 літру.
При її використуванні в неї ex tempore стерильно вносять 10мкг/мл менадіона і 5об. крові.	

Недоліки застосування вказаного середовища пов'язані з необхідністю додавання в них після стерилізації ex tempore додаткових інгредієнтів, таких як менадіон, кров і ін.

Відомим є спосіб діагностики з застосуванням поживного середовища І.З. Курбанова для культивування анаеробів [Пат. №2086646, Росія]:

Глюкоза	0,5-1,5г
Триптичний гідролізація казеїну (ТГК)	12-18г
Цистеїн	1-3г
Гемін	0,1-0,3г
Менадіон	0,0005-0,0015г
Агар	9-13г
Джерело вітамінів групи В на основі дріжджів (ЕКД)	5-15г
Пептичний гідролізація казеїну (ПГК)	5-11г
Амінопептид	2-4г
Дігідрофосфат калію	0,3-0,7г
Гідрофосфат калію	0,3-0,7г
Сульфат амонію	0,3-0,7г
Сульфат магнію	0,1-0,3г
Хлорид натрію	0,5-0,11г
Піруват натрію	1-2г
Сукцинат натрію	1-1,4г
Карбонат натрію	1,9-2,7г
Крохмал	0,5-1,5г
Мальтоза	0,5-1,5г
Арабіноза	0,5-1,0г
Фруктоза	0,5-1,0г
Поліглюкин	4-6г
Дистильована вода	до 1 літру.

Недоліки способу пов'язані з необхідністю використання великої кількості компонентів, що створює певні труднощі при приготуванні у разі

відсутності якого-небудь компоненту.

1. Найбільш близьким та обраним за прототип є спосіб з використанням напіврідкого збагаченого тіогліколевого агару (середовище НЗТА) [Лабораторна діагностика гніно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами (методичні рекомендації, Харків, 2000.-35с.)]:

Сухе середовище для контролю стерильності	33,0г
Пептон	15,0г
Натрій тіогліколят	1,0г
Натрій метабісульфіт (Na ₂ S ₂ O ₅) або натрій гідросульфід (Na ₂ S ₂ O ₄)	0,1г
Натрій фосфорнокислий двоамісний (Na ₂ HPO ₄)	1,0г
Хлористий калій (KCl)	0,2г
Агар-агар	2,0г
Живильний бульйон з аміним азотом 120-150мг%	1,0л
Після стерилізації при 1,5 атм. 30хв. до регенованої основи додають:	
Менадіон	0,2мл 1% спирт, розчина
Гемін	1мл 1% розчина
Твін-80	1мл

Спосіб має істотний недолік - необхідність додавання в середовище після стерилізації ex tempore додаткових інгредієнтів, таких як менадіон, кров і ін.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу визначення патогенної мікрофлори в невеликих кількостях ексудату з великих слинних залоз, в якому за рахунок зміни складу середовища, досягається можливість визначити присутність і накопичити в мінімальних кількостях досліджуваного матеріалу в одній пробірці середовища патогенні мікроорганізми як аеробні, так і анаеробні.

Поставлена задача вирішується в способі визначення патогенної мікрофлори в невеликих кількостях ексудату з великих слинних залоз, який включає взяття матеріалу з проток слинних залоз і посів на живильне середовище, яке містить

Сухе середовище для контролю стерильності	33,0г
Пептон	15,0г
Натрій тіогліколят	1,0г
Натрій метабісульфіт (Na ₂ S ₂ O ₅) або натрію гідросульфід (Na ₂ S ₂ O ₄)	0,1г
Натрій фосфорнокислий двоамісний (Na ₂ HPO ₄)	1,0г
Хлористий калій (KCl)	0,2г
Живильний бульйон з аміним азотом 120-150мг %	1,0л
з подальшою ідентифікацією мікроорганізмів, згідно з корисною моделлю, до середовища додають м'ясо-пептонний агар на дріжджовій основі 2,0г.	

Заміни у складі середовища «агар-агару» на «агар на дріжджовій основі» оптимізує зростання мікроорганізмів, а виключення присутності інгредієнтів ex tempore (менадіона, геміна і твін-80), створює оптимальні умови для засіву невеликої кількості досліджуваного матеріалу.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Готують поживне середовище шляхом змішування сухих інгредієнтів з подальшим розчиненням в м'ясо-пептонному бульйоні.

Сухе середовище для контролю стерильності	33,0г
Пептон	15,0г
Натрій тіогліколят	1,0г
Натрій метабісульфіт ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) або натрію гідросульфід ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	0,1г
Натрій фосфорнокислий двозамісний (Na_2HPO_4)	1,0г
Хлористий калій (KCl)	0,2г
М'ясо-пептонний агар на дріжджовій основі (або агар 2,0г і 50мл дріжджового екстракту)	2,0г
Живильний бульйон з аміним азотом 120-150мг %	1,0л
Середовище стерилізують автоклавуванням при 121° протягом 15хв.	

В поживне середовище, розлите по пробірках в кількості 10мл, засівають по 0,1мл суміші культур аеробів і анаеробних мікроорганізмів в

концентрації $1 \times 10^5 \text{ КОЕ/мл}$. Посіви інкубують в термостаті при 37°C. Після 24 годин проводять висів з поверхні середовища на плоскі диференціально-діагностичні середовища для отримання чистих культур мікроорганізмів аеробів через 48 годин - з глибини пробірки - посів на диференціально-діагностичні середовища для виділення анаеробних мікроорганізмів.

Даний спосіб посіву дозволяє визначити присутність і накопичити в мінімальних кількостях досліджуваного матеріалу в одній пробірці середовища патогенні мікроорганізми як аеробні, так і анаеробні.

Важливими перевагами цього середовища є відсутність в її рецептурі дефіцитних компонентів, компонентів *ex tempore* створення оптимальних умов для зростання аеробів і аспорогенних анаеробних мікроорганізмів шляхом додавання м'ясо-пептонного агару на дріжджовій основі і можливість завчасного приготування поживного середовища.