



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26116** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C12N 1/20
A61K 39/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛЕПТОСПІР

1

(21) u200701634
(22) 16.02.2007
(24) 10.09.2007
(46) 10.09.2007, Бюл. № 14, 2007 р.
(72) Савченко Борис Іванович, Могілевський Лев Якович, Третьякова Людмила Вікторівна, Малинівська Броніслава Петрівна
(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА

2

(57) Живильне середовище для культивування лептоспір, що містить фосфатний буферний розчин та компоненти червоної крові кролів, яке **відрізняється** тим, що як компонент червоної крові використовують приготівлений з відходів крові гемолізат, у кількості 5,0-6,0 об. % до загального об'єму буферного розчину.

Корисна модель належить до медицини, зокрема до бактеріології, може бути застосована для одержання діагностичних препаратів, що використовують для серологічної діагностики інфекційного захворювання на лептоспіроз, для накопичення антигенів при виробництві вакцин, а також для збереження музейних штамів лептоспір, необхідних для виробництва нових діагностичних препаратів. Корисна модель знайде застосування у бактеріологічних лабораторіях відділів особливо небезпечних хвороб санітарно-епідеміологічних станцій, та у ветеринарних бактеріологічних лабораторіях.

Лептоспіроз в Україні, починаючи з другої половини ХХ століття до теперішнього часу, є одною з найбільш поширених та актуальних зоонозних інфекцій.

Захворюваність на лептоспіроз в Україні продовжує залишатися високою, з летальністю в деяких районах до 35%. Іноді виникають епідемічні спалахи, що потребують швидкої та точної діагностики збудника інфекції. Тваринництво країни від захворювання на лептоспіроз має значні втрати за рахунок прямих втрат тварин, зниження приплоду, витрат на лікування та профілактику, втрат від карантину, втрат санітарної та споживчої якості продукції тваринництва. Кількість серопозитивних та хворих лептоспірозом домашніх тварин залишається значною, тому лабораторна діагностика лептоспірозів продовжує бути актуальною для медицини та ветеринарії, а це вимагає наявності в достатній кількості якісних діагностиків та живильних середовищ [1].

Серологічна діагностика лептоспірозів заснована на постановці реакції мікроаглютинації (РМА) з використанням у якості антигенів живих культур лептоспір діагностичного набору, що включає 13 сероварів та оцінки реакції за допомогою мікроскопії в темному полі мікроскопу. Збереження у життєздатному стані діагностичного набору живих культур лептоспір вимагає регулярного пересіву цих сероварів (1 раз через 10-12 днів) на рідкі живильні середовища (водно-сироваточне або середовище Терських).

Відомо, що в якості основного компоненту в живильних середовищах для вирощування лептоспір використовують кролячу сироватку, яка повинна бути вільною від токсинів, та неспецифічних аглютининів.

Але при відсутності кролячої сироватки з добримими ростовими властивостями інколи використовують сироватку зі зниженою ростовою якістю, що може бути пов'язано з неякісною первинною сировиною. Для виправлення цього становища в разі відсутності доброякісної кролячої сироватки використовують в живильних середовищах поряд з такою сироваткою деякі біологічні стимулятори: Твін-20, Твін 40, 80, пептон та гемолізовану кров, яку готують із крові донорів кролів.

Відомий спосіб-заявка RU 961 23058 [МПК6 C12N1/20, A61K39/02, [2]], що включає переробку кров'яних згустків шляхом трипсинного гідролізу з наступною стерилізацією. У цьому випадку кролячу сироватку в живильному середовищі частково, або повністю замінюється ферментолізатом кров'яних згустків. До того ж, цим способом не перед-

(13) **U**(11) **26116**(19) **UA**

бачено видалення із отриманого продукту залишків трипсину, що може привести до порушення лептоспир, які являються високочутливими до хімічних речовин, що негативно відзначиться на зрості лептоспир.

Відомий [Патент SU №1207140 МПК 7 C12N1/20, C12Q1/04, [3]], який був обраний в якості прототипу, автори якого пропонують в якості основного компоненту у живильне середовище вносити 0,025-0,1об.% непорушених еритроцитів кроля (еритроцитарну масу) та одну із жирних кислот - міристинову, пальметинову або стеаринову, котрі додають до рідкого живильного середовища на забуференій основі. Але цей метод має суттєві недоліки. По-перше, це середовище можливо використовувати тільки для ізоляції вірулентних лептоспир. Свіжоізольовані від людини, або від тварини патогенні лептоспири мають у своєму складі гемолізину, які спроможні визвати гемоліз еритроцитів, що сприяє виходу у живильне середовище речовин, необхідних для росту лептоспир. В той же час музейні штами, якими користуються для серологічної діагностики лептоспірозів за довгі роки вирощування їх на штучних середовищах втратили патогенність та спроможність гемолізувати еритроцити у живильних середовищах, тому еритроцити у живильному середовищі залишаються непорушеними, використовувати це середовище можливо тільки для культивування патогенних лептоспир. В той же час, лабораторії використовують, основним чином, антигени живих культур лептоспир музейних непатогенних штамів для серологічної діагностики лептоспірозів, визначення збудника захворювання та визначення титрів антитіл в сироватках хворих на лептоспіроз. Таким чином, використання запропонованого живильного середовища тільки для ізоляції патогенних штамів є недоцільним. До того ж, в лабораторії необхідно постійно тримати живого кроля - донора крові. Більшість практичних лабораторій мають справу з музейними штамми лептоспир діагностичного набору, які використовують в якості антигену для постановки серологічної реакції мікроаглютинації (РМА).

У зв'язку з виявленими недоліками живильного середовища прототипа задачею живильного середовища для культивування лептоспир є виявлення біологічної речовини із стимулюючою активністю, додавання якої могло б у невеликій кількості сприяти росту культур лептоспир (як патогенних, так і музейних), була простою для одержання та дешевою у виробництві з перевіреною ростовою якістю.

Поставлена задача досягається тим, що із відходів згортків крові кролів, що лишаються після відбору цінної біологічної речовини - кролячої сироватки, одержують гемолізат, який додають у

кількості 5-6об.% до забуференої основи живильного середовища.

Задача вирішується наступним чином. До згустків крові, що залишилися в ємностях після відбору кролячої сироватки, вносять 2-3 об'єми доброякісної дистильованої води відносно до об'єму відібраної сироватки. Стерилізацію гемолізованої крові проводять фільтрацією через керамічні свічки Шамберлена. Перевіряють стерильність отриманої гемолізованої крові, визначають стимулюючу ростову активність. Ростову якість гемолізованої крові перевіряють методом пропрочної зростаючих концентрацій гемолізату у буферному розчині, аналогічно до методу описаного у [заявці № U200613105 від 11.12.2006 «Спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир»]. Для приготування гемолізату, зазвичай використовують свіжо відібрану цільну кров кроля донора, котру вносять у дистильовану воду (тобто без відділення сироватки, що сама по собі є цінним препаратом).

В запропонованій корисній моделі кров для одержання гемолізованої крові та кролячої сироватки використовують відходи виробництва при промисловому забої кролів. Кров збирають у скляні ємності 3,0-5,0л., де вона згортається впродовж 5-7 годин. Сироватку відділяють центрифугуванням. Згустки крові подрібнюють, додають дистильовану воду, охолоджують до +4°C та витримують добу. Відбирають світло-рожеву, або темно червону рідину (гемолізована кров), центрифугують та відділяють осад. Незначне забарвлення живильного середовища при внесенні визначеної кількості гемолізованої крові не відбивалось негативно при врахуванні РМА. Проводять стерилізацію гемолізату за допомогою керамічних свічок Шамберлена при негативному атмосферному тиску. Після стерилізації відбирають гемолізовану кров для перевірки стерильності та визначення ростової якості гемолізованої крові. Перевірка ростової якості гемолізату виявила, що оптимальна концентрація у складі буферного розчину Терських для вирощування музейних та патогенних лептоспир складає 5-6об.%. Результати порівняльного аналізу заявленого рішення та прототипа наведені у табл.1.

Таким чином, заявлене живильне середовище мало в 2-2,5 раз вищу біологічну активність, ніж живильне середовище прототипа, сприяло зберіганню лептоспир з типовою морфологією у життєздатному стані та за показників ростової якості є адекватним замінником сироватки кролів. Повна переробка отриманої сировини крові кролів в промислових умовах сприяє підвищенню економічного ефекту у 2-3 рази. Гемолізовану кров із згустів можливо отримувати також в лабораторних умовах санепідстанцій, що спеціалізуються на діагностиці лептоспірозів.

Таблиця 1

Визначення стимулюючої активності заявленого складу живильного середовища

Музейні штами лептоспир		Кількість мікроорганізмів в полі зору мікроскопу на 10 добу	
		Буферний розчин + еритроцити (прототип)	Заявлене середовище
1.	Icterohaemorrhagiae	50-100	200-300
2.	Javanica	80-100	150-200
3.	Canicola	50-100	100-200
4.	Ballum	80-100	150-250
5.	Pyrogenes	50-80	100-150
6.	Cynopteri	50-70	100-150
7.	Autumnalis	70-100	150-200
8.	Australis	80-100	150-200
9.	Pomona	50-100	100-200
10.	Grippotyphosa	50-70	150-200
11.	Hebdomadis	50-80	100-200
12.	Bataviae	80-100	150-200
13.	Tarassovi	50-70	100-150

Джерела інформації:

1. Бернасовская Е.П., Угрюмов Б.Л., Вовк А.Д., Могирева Л.А. и др. в кн. Лептоспирозы. Киев "Здоровье" 1978, с.35.

2. Патент РФ 96123058 А, 6С12N1/20, А61К39/02 "Способ приготовления питательной среды для культивирования лептоспир".

3. Патент SU 1207140 7 С12N1/20, С12Q1/04 "Питательная среда для выращивания патогенных лептоспир".

4. Заява на корисну модель №u200613105 від 11.12.2006. «Спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир».