



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92976

(13) C2

(51) МПК-2011.01

A61B 5/00

G01N 33/483

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

(21) а200905595

(22) 01.06.2009

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.

(72) БІЛЬКО ІВАН ПЕТРОВИЧ, ХУВ'ЯДЖ ДЖОМА, LY

(73) НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІС-
ЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМ. П.Л.ШУПИКА(56) Смирнова Т.А., Поглазова М.Н., Николаенко
М.Н. Адгезивные свойства *Bacillus thuringiensis* // Биотехнология. - 2000. - №3. - С. 16-26

Порт Е.В. Изучение адгезивных свойств штаммов синегнойной палочки // Вісн. Харк. нац. ун-ту. - 2004. - № 639

US 5795563 A 18.08.1998

2

(57) Спосіб визначення адгезивної активності мікроорганізмів шляхом підрахунку кількості адгезованих клітин досліджуваного мікроорганізму на одному еритроциті людини 0 (1) групи Rh+ (індекс адгезії мікроорганізму), який **відрізняється** тим, що суміш клітин досліджуваного мікроорганізму і еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ після витримки при 37 °С протягом 60 хвилин наносять на блок 1-1,5 % агарового гелю, приготовленого на стерильному 0,9 % водному розчині натрію хлориду площиною 1-1,5 см² і розміщеного на предметному склі, покривають її накривним склом і для підрахунку кількості адгезованих на одному еритроциті клітин досліджуваного мікроорганізму (індекс адгезії мікроорганізму) здійснюють фазово-контрастну мікроскопію суміші.

Винахід відноситься до галузі мікробіології, а саме до визначення адгезивної активності мікроорганізмів і може бути використаний мікробіологічними лабораторіями наукових медичних та лікувально-профілактичних закладів для визначення адгезивної активності мікроорганізмів з метою встановлення ступеню приживлення мікроорганізмів-представників нормальної мікрофлори організму людини або вірулентності патогенних мікроорганізмів.

У теперішній час для визначення адгезивної активності мікроорганізмів з метою встановлення ступеню приживлення мікроорганізмів-представників нормальної мікрофлори організму людини або вірулентності патогенних мікроорганізмів найчастіше використовується спосіб визначення індексу адгезивності мікроорганізмів на еритроцитах людини 0 (1) групи Rh+ шляхом приготування суміші клітин досліджуваного мікроорганізму в концентрації 10⁹/мл і еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ в концентрації 10⁸/мл у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду, витримки суміші у термостаті при 37°C протягом 60 хвилин з наступним приготуванням із суміші клітин мазка на предметному склі, фіксацією мазка фіксуючою рідиною, забарвленням барвниками та дослідженням отриманого препарату світлопольною мікроскопією з підрахунком кількості клітин

досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на 50 еритроцитах людини 0 (1) групи Rh + та визначенням кількості адгезованих клітин досліджуваного мікроорганізму на одному еритроциті - індексу адгезії мікроорганізму [Брили В.И., Брилене Т.Д., Ленцер Х.П., Ленцер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабор. дело. - 1986. - № 4. - с. 210-212.].

Суттєвим недоліком цього відомого способу, прийнятого нами за прототип, є те, що у процесі приготування мазка на предметному склі та фіксації і забарвленні препарату із суміші клітин досліджуваного мікроорганізму і еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ внаслідок дії на клітини фізико-хімічних факторів, пов'язаних з приготуванням, фіксацією і забарвленням препарату, частина адгезованих на еритроцитах клітин досліджуваного мікроорганізму може відокремитись від еритроцитів, що призводить до спотворення результатів визначення індексу адгезії мікроорганізму.

Задачею заявленого винаходу є усунення штучного впливу фізико-хімічних факторів на клітини досліджуваного мікроорганізму і еритроцити людини, притаманного відомому способу, і тим самим підвищення достовірності результатів визначення індексу адгезії досліджуваного мікроорганізму.

(13) C2

(11) 92976

(19) UA

Задача досягається тим, що у відомому Способі визначення адгезивної активності мікроорганізмів шляхом приготування суміші клітин досліджуваного мікроорганізму в концентрації 10^9 клітин/мл і еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ в концентрації 10^8 /мл, витримки суміші у термостаті при 37°C протягом 60 хвилин з наступним приготуванням із суміші клітин мазка на предметному склі, фіксацією його фіксуючою рідиною, забарвленням барвниками та дослідженням отриманого препарату світлопольною мікроскопією з підрахунком кількості клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на 50 еритроцитах людини 0 (1) групи Rh+ та визначенням кількості клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на одному еритроциті (індексу адгезії мікроорганізму), готують суміш клітин досліджуваного мікроорганізму і еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+, відмитих тричі у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину, витримують її у термостаті при 37°C протягом 60 хвилин, а потім наносять краплю суміші на блок 1-1,5% агарового гелю, приготовленого на стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду, товщиною 1,2-1,5мм і площиною 1-1,5см², попередньо накладеного на предметне скло, покривають суміш на блоці агарового гелю накривним склом і підраховують кількість клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на 50 еритроцитах за допомогою фазовоконтрастної мікроскопії з наступним визначенням кількості клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на одному еритроциті (індексу адгезії мікроорганізму).

У відповідності з винаходом спосіб здійснюють таким чином: із культури досліджуваного мікроорганізму, що виросла на щільному агаровому середовищі відповідного мікроорганізму складу, готують суспензію клітин у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду з концентрацією 10^9 клітин/мл розчину за оптичним стандартом помутніння.

Із еритроцитарної маси еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ готують суспензію еритроцитів у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду і тричі відмивають її у цьому розчині шляхом центрифугування при 1000 обертів на 1 хвилину протягом 10-15 хвилин. Потім із відмитих еритроцитів готують суспензію у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду концентрацією 10^8 еритроцитів на 1мл розчину.

У стерильну пробірку вносять по 1мл суспензії клітин досліджуваного мікроорганізму і відмитих еритроцитів людини. Отриману суміш клітин струшують протягом 5-10 хвилин і вміщують у термостат при 37°C на 60 хвилин. У стерильну чашку Петрі наливають 8-10мл розплавленого на водяній бані 1-1,5% агарового гелю, приготовленого на 0,9% водному розчині натрію хлориду, і дають йому застигнути при кімнатній температурі. Потім із застиглого агарового гелю стерильним пінцетом

вирізають блок площиною 1-1,5см², який стерильним пінцетом переносять на стерильне предметне скло у його центр. На блок агарового гелю наносять краплю суміші клітин досліджуваного мікроорганізму і еритроцитів людини, попередньо витриманої при 37°C , накривають суміш стерильним накривним склом і здійснюють її фазовоконтрастну мікроскопію. При цьому підраховують кількість клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на 50 еритроцитах, а потім визначають кількість клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на одному еритроциті (індекс адгезії мікроорганізму).

Приклад виконання запропонованого способу.

Із культури *Staphylococcus aureus*, що виросла на мясопептонному агарі протягом 18-24 годин, готують суспензію клітин у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду з концентрацією 10^9 клітин/мл розчину за оптичним стандартом помутніння.

Із еритроцитарної маси еритроцитів людини 0 (1) групи Rh+ готують суспензію еритроцитів у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду і тричі відмивають її у цьому розчині шляхом центрифугування при 1000 обертів на 1 хвилину протягом 10-15 хвилин. Потім із відмитих еритроцитів готують суспензію у стерильному 0,9% водному розчині натрію хлориду концентрацією 10^8 еритроцитів на 1мл розчину. У стерильну пробірку окремими стерильними піпетками вносять по 1мл суспензії клітин *Staphylococcus aureus* і відмитих еритроцитів людини. Отриману суміш клітин струшують протягом 5-10 хвилин і вміщують у термостат при 37°C на 60 хвилин. У стерильну чашку Петрі наливають 8-10 мл розплавленого на водяній бані 1-1,5% агарового гелю, приготовленого на 0,9% водному розчині натрію хлориду, і дають йому застигнути при кімнатній температурі. Потім із застиглого агарового гелю стерильним пінцетом вирізають блок площиною 1-1,5см², який стерильним пінцетом переносять на стерильне предметне скло у його центр. На блок агарового гелю наносять краплю суміші клітин *Staphylococcus aureus* і еритроцитів людини, попередньо витриманої при 37°C , накривають суміш стерильним накривним склом і здійснюють її фазовоконтрастну мікроскопію. При цьому підраховують кількість клітин *Staphylococcus aureus*, адгезованих на 50 еритроцитах, а потім визначають кількість клітин досліджуваного мікроорганізму, адгезованих на одному еритроциті шляхом поділу кількості клітин *Staphylococcus aureus*, адгезованих на 50 еритроцитах на 50. Отримане число і є індексом адгезії *Staphylococcus aureus*. Наприклад, на 50 еритроцитах було адгезовано 500 еритроцитів. $500:50=10$. Індекс адгезії *Staphylococcus aureus* =10,0. Технічним результатом запропонованого способу є те, що він підвищує достовірність результатів дослідження.

