



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95392 (13) C2

(51) МПК

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) ШТАМ ENTEROCOCCUS RAFFINOSUS 42-Д ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ДЛЯ ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЕНТЕРОКОКІВ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ОЗНАКАМИ**

1

(21) a201005386

(22) 05.05.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) МИРОНЕНКО ЛЮДМИЛА ГРИГОРІВНА, ПЕРЕТЯТКО ОЛЕНА ГЕОРГІЙВНА, В'ЯЛИХ ЖАННА ЕДУАРДІВНА, БОЖКО МАРИНА ГЕННАДІЄВНА, БАЛУТА ІГОР МИРОНОВИЧ, МІЗІН ВАСІЛЬ ВАСИЛЬОВИЧ, КРЕСТЕЦЬКА СВІТЛАНА ЛЕОНІДІВНА, КАЗМІРЧУК ВІКТОР ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ"

(56) GEN-Probe. Enterococcus culture identification test, November 2, 2001. 102843 Rev.J. Знайдено в інтернет. <URL: <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/102843-ART.pdf>>

Facklam R.R. and Collins M.D. "Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme", Journal of clinical microbiology, Apr. 1989, p. 731-734.

Lindsay M. et al.: "Comparison of enterococcus raffinosus with enterococcus avium on the basis of penicillin susceptibility, penicillin-binding protein analysis, and high-level aminoglycoside resistance", Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 35, No. 7, July 1991, p. 1408-1412.

Brtkova A. et al.: "Characterization of enterococci of animal and environmental origin using phenotypic method and comparison with PCR based method", Veterinarni Medicina, 55, 2010 (3):97-105.

2

Cupacova S. et al.: "Genus-specific identification of enterococci by PCR method", ACTA VET. BRNO 2005, 74: 633-637.

Перетятко О.Г. "Гетерогенність за факторами патогенності та антибіотикочутливості мікроорганізмів роду Enterococcus, вилучених з різних екоотопів", Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, Харків-2009. Знайдено в базі даних NBUV.

Ozava Yoshiyuki et al.: "Идентификация энтерококков на видовом уровне секвенированием генов D-аланин-лигазы. "Identification of enterococcus at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligases", Syst and Appl. Microbiol. 2009. 23, N2, p. 230-237. (Abstract). [он-лайн]. Знайдено в базі даних VINITI.

PLIVA Lachema Diagnostika s.r.o. Quality certificate. Micro-Ia-test. STREPTOtest 24, 18.09.2009. Знайдено в інтернет: <URL: http://www.lachema.com/attachments/STREPTO24_302709.pdf>

Jonathan A. T. Sandoe et al.: "Vertebral osteomyelitis caused by enterococcus raffinosus", Journal of clinical microbiology, Vol. 39, No. 4, Apr. 2001, p. 1678-1679.

(57) Штам Enterococcus raffinosus для використання як позитивного контролю в тест-системах для видової ідентифікації ентерококів за біохімічними ознаками, депонований в депозитарії ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Грошавського АМН України" за № 42-Д.

Винахід належить до мікробіології та лабораторної діагностики, зокрема являє собою штам Enterococcus raffinosus, що може використовуватися в тест-системах для біохімічної ідентифікації клінічно значущих представників роду Enterococcus. Штам придатний для використання як позитивний контроль при урахуванні результатів дослідження, а також як контрольна референтна культура при оцінці функціональності окремих партій тест-систем типу EN-COCCUStest (виробник Pliva-Lachema Diagnostika, Чехія), доступних на вітчизняному ринку.

Використання тест-систем для ідентифікації клінічних ізолятів мікроорганізмів дозволяє суттєво скоротити обсяг робіт та витратних матеріалів, необхідних для проведення дослідження, у порівнянні з рутинними методами бактеріологічної діагностики.

EN-COCCUStest дозволяє оцінити профіль біохімічної активності мікроорганізмів по відношенню до восьми субстратів (аргінін, сорбоза, арабіноза, манітол, сорбітол, мелібіоза, рафіноза і меліцитоза), розташованих у 8-лункових стріпах 96-лункової пластинки, розрахованої на одночасну

(13) C2

(11) 95392

(19) UA

ідентифікацію 12 штамів. Оцінка результатів тесту здійснюється візуально: за таблицею "Інтерпретація результатів" з використанням кольорової шкали та/або кольорових реакцій контрольних штамів. При цьому, використання контрольних штамів дозволяє, певним чином, підвищити об'єктивність оцінки та контролювати функціональність тест-системи.

Як позитивний контроль в EN-COCCUStest виробником рекомендується референтний штам *Enterococcus raffinosus* CCM4216, [Collins M.D. *Enterococcus raffinosus* sp.nov., *Enterococcus solitarius* sp.nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp.nov. [Text] / Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A.E., Williamson, R... // FEMS Microbiol.Lett.-1989. - V57. - P.283-288 ISSN:1574-6968], що є прототипом винаходу, яка заявляється. Він характеризується широким спектром біохімічної активності та дає позитивну реакцію з більшістю субстратів тест-системи (за винятком аргініну). В склад набору EN-COCCUStest, доступного на вітчизняному ринку, цей штам не входить, оскільки експортно-імпорتنі операції з біологічним матеріалом вимагають дотримання складних та вартісних процедур. Штам депоновано в багатьох національних та міжнародних колекціях (CCM 4216^T= ATCC 49427=CCUG29292=DSM5633=JCM8733=LMG12888=NCIMB12901=NCTC12192), однак в Україні не депоновано. Складність та вартість процедури

трансферу поряд з необхідністю періодичного оновлення культури, робить його придбання для окремої клініко-діагностичної лабораторії в Україні економічно недоцільним, що ускладнює використання тест-системи.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості

Факультативно анаеробні, каталазо-негативні грам-позитивні коки розміром (0,6×0,6-1,5) мкм, в мазках розташовуються окремо, парами або ланцюжками. Спор та капсул не утворюють, нерухомі. При вирощуванні на поверхні середовища "Ентерококагар" колонії світло-рожевого кольору, правильної округлої форми діаметром 0,7-1,0 мм, з гладкою, випуклою поверхнею та рівним краєм. В рідких поживних середовищах утворюють однорідну каламуть.

Здатний рости при температурі (10-45)°С, температурний оптимум -37 °С. Оптимальне для росту значення pH 6,3-6,6. Росте при 40 % жовчі, при 6,5 % NaCl, при pH 9,6. Не гідролізує аргінін, ескулін та гіпурат. Ферментує вуглеводи з утворенням молочної кислоти без продукування вуглекислого газу. Зброджує сахарозу, лактозу, мелібіозу, рафінозу, гліцерол, сорбітол, манітол, арабінозу, D-глюкозу, мелецитозу, рибозу, сорбозу, D-арабітол, L-арабітол, D-манозу, саліцин, трегалозу. Не ферментує ксилол, інулін.

Таблиця 1.

Біохімічні властивості *E. raffinosus* за результатами дослідження з використанням EN-COCCUStest (температурний оптимум 37 °С).

Тести							
H	G	F	E	D	C	B	A
ARG	SOE	ARA	MAN	SOR	MLB	RAF	MLZ
-	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: ARG - аргінін, SOE - сорбоза, ARA - арабіноза, MAN - манітол, SOR - сорбітол, MLB - мелібіоза, RAF - рафіноза, MLZ - мелецитоза, "+" - позитивний результат, "-" - негативний результат.

В основу винаходу поставлено задачу ізолювати, охарактеризувати та депонувати в Україні новий штам *E. raffinosus*, що, за спектром біохімічної активності, є придатним для використання як референтний в тест-системах для ідентифікації представників роду *Enterococcus*.

Поставлене завдання вирішено використанням штаму, ізолюваного у 2006 році в бактеріологічній лабораторії Міської дитячої поліклініки № 13 м. Харкова, з кишечнику дитини з синдромом дисбактеріозу. В філії Музею мікроорганізмів на базі ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України" штам ідентифіковано як *E. raffinosus*.

Спосіб одержання штаму.

Штам культивувано в поживному середовищі "Ентерококагар" (Росія) шляхом пересівів з окремих колоній 1-2 рази на тиждень з подальшою витримкою в термостаті при 37±0,5 °С. Кінцеве клоноування штаму проведено двадцятьма пасажами з окремих колоній. В процесі виконаних пасажів ре-

тельно вивчено біохімічні властивості проміжних культур ентерококу і підтверджено їх стабільність протягом року.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості.

Морфологія: грам-позитивні коки розміром (0,6×0,6-1,5) мкм, в мазках розташовуються окремо, парами або ланцюжками. Спор та капсул не утворюють, нерухомі.

Культуральні властивості: росте при температурі (10-45)°С, температурний оптимум - 37 °С; оптимальне для росту значення pH 6,3-6,6; при вирощуванні на поверхні середовища "Ентерококагар" колонії світло-рожевого кольору правильної округлої форми, діаметром 0,7-1,0 мм, з гладенькою, випуклою поверхнею, рівним краєм; у бульйоні утворюють однорідну каламуть.

Фізіолого-біохімічні властивості: факультативний анаероб, каталазонегативний; росте в присутності 40 % жовчі, 6,5 % NaCl, pH 9,6; не гідролізує аргінін, ескулін та гіпурат; зброджує вуглеводи з утворенням молочної кислоти без продукування вуглекислого газу; зброджує сахарозу, лактозу, мелібіозу, рафінозу, гліцерол, сорбітол, манітол, арабінозу, D-глюкозу, мелецитозу, рибозу, сорбо-

зу, D-арабітол, L-арабітол, D-манозу, саліцин, трегалозу; не ферментує ксилит та інулін.

Умови зберігання

Для довгострокового зберігання штаму необхідна його ліофілізація, що може бути виконано за стандартною технологією. Тимчасове зберігання штаму ентерококу до місяця включно можливо проводити у пробірках з середовищем МПА під шаром вазелінової олії в рефрижераторі з температурою у діапазоні від +2 до +5 °С.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму.

Для одержання культури з ліофілізованого матеріалу здійснюють регідратацію шляхом додавання 5 мл фізіологічного розчину хлориду натрію або поживного середовища. Після цього матеріал серійно розводять по 1 мл в рядах з 9 пробірками по 9 мл, середовища в кожній витримують в термостаті з щоденною перевіркою протягом 4 днів.

Відомості про депонування: штам *Enterococcus raffinosus* депоновано у Депозитарії ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України" за номером 42 -Д 22 березня 2010 року.

Можливість здійснення винаходу підтверджує нижче наведений приклад використання штаму, що заявляється.

ПРИКЛАД

Визначення якості тест-системи EN-COCCUStest виробництва Pliva-Lachema Diagnostika (Чехія): контроль функціональності набору та якості проведення видової ідентифікації ентерококів з використанням штаму *Enterococcus raffinosus*42-Д як позитивного контролю.

Чисті культури контрольних штамів виду *Enterococcus raffinosus*42-Д, висівають на кров'я-

ний агар для отримання ізольованих колоній та інкубують при 37 °С протягом 18-24 годин. Подальша послідовність дій проводиться згідно з інструкцією по використанню набору EN-COCCUStest виробництва Pliva-Lachema Diagnostika (Чехія).

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за допомогою електронного приладу DensiLa-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією. З поверхні агарових середовищ стерильним фізіологічним розчином змивають культуру та доводять до двох одиниць оптичного стандарту щільності за McFarland. Водночас здійснюють посів суспензії культури для перевірки її чистоти та ростових властивостей. Інкубують при температурі 37 °С протягом 24 годин. Суспензію ретельно струшують та вносять по 0,1 мл в лунки одного ряду пластинки. Після інокуляції в лунки колонки Н (тест на аргінін) додають 2 краплі парафінового масла. Закривають пластинку, розміщують в поліетиленовому пакеті, та інкубують при температурі (35-37)°С протягом 24 годин, після чого здійснюють оцінку результатів тестів.

Тест-система може вважатися придатною до використання якщо профіль біохімічної активності референтного штаму *Enterococcus raffinosus* відповідає стандарту, а саме аргінін - негативний тест (жовтий або світло-помаранчевий колір), сорбоза, арабіноза, манітол, сорбітол, мелібіоза, рафіноза, мелецитоза - позитивний тест (жовтий або світло-помаранчевий колір). Отримані дані наведено в табл. 2.

Таблиця 2.

Біохімічні властивості *E. raffinosus*42-Д за результатами дослідження з використанням EN-COCCUStest (температурний оптимум 37 °С).

Тести							
H	G	F	E	D	C	B	A
ARG	SOE	ARA	MAN	SOR	MLB	RAF	MLZ
-	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: ARG - аргінін, SOE - сорбоза, ARA - арабіноза, MAN - манітол, SOR - сорбітол, MLB - мелібіоза, RAF - рафіноза, MLZ - мелецитоза, "+" - позитивний результат, "-" - негативний результат.

Наведені результати підтверджують можливість здійснення корисної моделі, оскільки за па-

раметрами, які оцінюються в тест-системі EN-COCCUStest, штам *Enterococcus raffinosus*42-Д ідентичний штаму *Enterococcus raffinosus* CCM4216.