



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24539 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 1/00
A61K 39/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛЕПТОСПІР

1

(21) u200613105

(22) 11.12.2006

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Савченко Борис Іванович, Кондратенко Віктор Миколайович, Третьякова Людмила Вікторівна, Малинівська Броніслава Петрівна

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА

(57) 1. Спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспір, що полягає у використанні кролячої сироватки, який **відрізняється** тим, що перед додаванням сироватки до основи живильного середовища виявляють токсичність її для лептоспір, після чого визначають оптимальну концентрацію придатної кролячої сироватки.

2

2. Спосіб виготовлення живильного середовища за п. 1, який **відрізняється** тим, що оцінку токсичності здійснюють за наявності порушень типових морфологічних ознак лептоспір, рухомості бактерій та інтенсивності росту культури.

3. Спосіб виготовлення живильного середовища за п. 2, який **відрізняється** тим, що оптимальну концентрацію кролячої сироватки визначають за критерієм наявності рухомих бактерій з типовою морфологією кількістю 100 та більше у полі зору.

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

Захворюваність на лептоспіроз в Україні продовжує залишатися високою з летальністю в деяких районах до 35%. Іноді виникають епідемічні спалахи, що потребують швидкої і точної діагностики збудника інфекції, тому актуальність лабораторної діагностики лептоспірозів з часом не зменшується. Для діагностики потрібні в достатній кількості якісні діагностичні та живильні середовища.

Основним методом діагностики лептоспірозу у людей і тварин, та виявлення циркуляції збудників серед гризунів є серологічна реакція мікроаглютинації (РМА), яка дозволяє за допомогою діагностичних антигенів виявляти наявність специфічних антитіл у проба сироваток. Серологічна діагности-

ка лептоспірозів заснована на постановці реакції мікроаглютинації (РМА) з використанням у якості антигенів живих культур лептоспір діагностичного набору, що включає 13 сероварів з обліком результатів за допомогою темнопільного мікроскопу. Збереження у життєздатному стані діагностичного набору живих культур лептоспір потребує регулярного пересіву цих сероварів (1 раз через 10-12 днів) в рідкі живильні середовища (водно-сироваточне, або середовище Терських).

Відомі модифікації живильних середовищ, які пропонувались для вирощування культур лептоспір з різними емпірично взятими концентраціями кролячої сироватки. Так, у живильне середовище Уленгута вносять 5-10% стерильної кролячої сироватки; у середовище Кортгофа додають 8% кролячої сироватки; у живильне середовище Флетчера - 12% кролячої сироватки; у середовище Терських у пробірку з 5,0мл буферної суміші вносять 5-7 крапель сироватки (≈10-12% сироватки); у Водно-сироваточне живильне середовище вносять 1-2 краплі сироватки на 1,0мл води. [1].

Запропоновані рецептури живильних середовищ з різними, часто з високими концентраціями кролячої сироватки ведуть до порушення морфології лептоспір, рухомості, появи аутоаглютинації, що не дозволяє використовувати їх в якості антигенів для постановки реакції мікроаглютинації

UA
(13)

24539
(11)

UA
(19)

(РМА) з сироватками людей та тварин, ведуть до загибелі музейних штамів діагностичного набору лептоспир.

В якості прототипу обрано рецептуру живильного середовища, що наведена в «Приказе №1152 МЗ СССР от 13.11.1979г. "О профилактике заболеваний людей лептоспирозом" [2]. Відповідно до способу прототипа для виготовлення живильного середовища використовують дистильовану воду отриману із водогінної води, рН якої фосфатними розчинами доводять до і після стерилізації (рН 7,2-7,4). Пробірки, у яких після стерилізації в автоклаві з'явився кристалічний, або аморфний осад видаляють. У кожен пробірку з прозорим вмістом та з рН 7,2 - 7,4 в стерильних умовах додають інактивовану протягом 30 хвилин при +56°C нормальну кролячу сироватку в кількості 1-2 краплі на 1,0мл забуференої води.

До недоліків прототипу можна віднести те, що в кролячій сироватці не визначають токсичні фактори щодо лептоспир, наявність можливих неспецифічних аглютининів. Оптимальну концентрацію сироватки перед внесенням її до дистильованої води також не визначають. До недоліків прототипу також можливо віднести використання води приготовленої на основі дистиляції водогінної води, яка може мати токсичну дію в зв'язку з присутністю в ній токсичних речовин (фенол та хлорорганічні сполуки), що не видаляються при дистиляції, до яких лептоспир є високочутливими.

Недостатня кількість кролячої сироватки в живильному середовищі (у разі відсутності токсичної дії сироватки) веде до повільного приросту кількості лептоспир. Перевищення концентрації сироватки у живильному середовищі приводить до аутоаглютинації лептоспир, появи зернистості, викликає порушення морфології лептоспир та рухомості.

Задачею корисної моделі на спосіб виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир є підвищення якості живильного середовища для культивування лептоспир, що буде сприяти більш інтенсивному накопиченню лептоспир з характерною для них морфологією та рухливістю.

Задача вирішується тим, що у способі виготовлення живильного середовища для культивування лептоспир, при використанні кролячої сироватки, перед додаванням сироватки до основи живильного середовища виявляють її токсичність для лептоспир та наявність неспецифічних аглютининів, після чого визначають оптимальну концентрацію придатної кролячої сироватки, що є необхідною для швидкого росту лептоспир. Оцінку токсичності здійснюють за наявністю або відсутністю порушень типових морфологічних ознак бактерій, рухливості лептоспир, росту культури. Оптимальна концентрація кролячої сироватки визначається за критерієм наявності рухливих бактерій з типовою морфологією кількістю 100 та більше у полі зору.

Спосіб реалізується наступним чином: кролячу сироватку контролювали на токсичність, неспецифічних аглютининів та визначали оптимальну концентрацію, необхідну для вирощування лептоспир. Вирощували лептоспир у зростаючих концентраціях кролячої сироватки від 1% до 10%. Врахову-

вали інтенсивність росту культури, морфологічні ознаки, рухливість бактерій, визначаючи, таким чином, оптимальну концентрацію сироватки, яка сприяла інтенсивному накопиченню рухливих лептоспир з типовою морфологією, придатних для пересіву музейних культур та для постановки серологічної реакції мікроаглютинації (РМА).

Проводили також вивчення впливу якості дистильованої води на зріст культури лептоспир, готували живильні середовища на дистильованій воді перегнаної із водогінної води та на дистильованій воді перегнаної із води свердловини, взятої із шару води на глибині 120м. Було встановлено, що приготовлені в рівних умовах живильні середовища з додаванням однакової кількості кролячої сироватки на дистильованій воді із водогінної води вели до загибелі лептоспир, порушення морфології та рухомості, в той же час живильне середовище приготовлене на дистильованій воді із свердловини давали добре зростання мікроорганізмів, мали характерну морфологію, були добре рухливими з концентрацією лептоспир 100-150 в полі зору мікроскопу. Такі культури можливо використовувати при постановці серологічної реакції мікроаглютинації (РМА), а також для збереження музейних штамів.

Визначення концентрації кролячої сироватки у рідкому живильному середовищі досягали шляхом додавання дозованого об'єму кролячої сироватки у живильне середовище Терських, або у дистильовану воду з рН 7,2-7,4. Оптимальну концентрацію визначали для кожної серії сироватки (5-10 літрів). Ємкості з дистильованою водою (рН 7,2-7,4), або з живильним середовищем Терських стерилізували у автоклаві при +120°C протягом 30 хвилин. В охолоджених розчинах знову перевіряли рН, при необхідності корегували та повторно стерилізували. Стерильне середовище Терських з рН 7,2-7,4, або забуферену дистильовану воду, переносили у 2 ряди по 10 пробірок в об'ємах наведених в Таблиці 1. В обидва ряди паралельно розташованих пробірок вносили зростаючий об'єм кролячої сироватки від 1% до 10%.

Пробірки з приготуванням середовищем з різною концентрацією сироватки інактивували у водняній бані при +56°C протягом 30 хвилин, витримували у термостаті 48 годин при +37°C для контролю стерильності. У кожен пробірку із стерильним живильним середовищем з різною концентрацією кролячої сироватки вносили по 0,5мл. одного із штамів діагностичного набору лептоспир (наприклад *Leptospirae Icterohaemorrhagiae*). Вирощували лептоспир у термостаті при +29°C протягом 7-10 діб. Перегляд культур, проводили на 7-10 добу спочатку у промені світла освітлювача 01-19, для встановлення характерного лептоспірам росту у вигляді муарових хвиль, які виявляли при легкому струшуванні пробірок, та у відсутності зернистості, характерної для аутоаглютинації. Переглядали вирості культури у темному полі мікроскопу при збільшенні у 150 разів). Визначали кількість лептоспир у полі зору мікроскопу (більше 100 у полі зору мікроскопу). У цьому випадку краплини культури лептоспир наносили на предметне скло та переглядали у темному полі мікроскопу без на-

кривних скелець при збільшенні у $\times 150$ разів. Також переглядали культури при збільшенні у 300 разів. Краплину культури наносили на предметне скло та накривали накривним скельцем, визначали рухомість лептоспир, відзначали характерний сріблястий відтінок, звертали увагу на морфологію,

відсутність аутоаглютинації та порушених лептоспир.

Приклад. У 2 ряди стерильних бактеріологічних пробірок (по 10 пробірок у кожному рядку) вносили відповідно з розрахунковою таблицею (Табл.1)

Таблиця 1

Розрахунок відсоткового вмісту кролячої сироватки у живильному середовищі

Кількість дистильованої води, мл	Кількість сироватки		Кількість лептоспир у полі зору ($\times 150$)
	мл.	%%	
4,95	0,05	1	20 \pm 5
4,90	0,1	2	25 \pm 3
4,85	0,15	3	170 \pm 18
4,80	0,2	4	161 \pm 15
4,75	0,25	5	147 \pm 13
4,50	0,3	6	81 \pm 7
4,25	0,35	7	62 \pm 6
4,00	0,4	8	43 \pm 5
3,75	0,45	9	21 \pm 3
3,50	0,5	10	13 \pm 3

мірними піпетками дистильовану воду, яку дистильовали із води свердловини з рН 7,2-7,4. У пробірки першого та другого ряду вносили мірною піпеткою кролячу сироватку, у кількості наведених у Таблиці 1. Пробірки з розведенням сироваток інактивували при $+56^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин, культивували 48 годин у термостаті $+37^{\circ}\text{C}$, переглядали на предмет відсутності росту банальної мікрофлори (контроль стерильності), охолоджували до $+18^{\circ}\text{C}$ та засівали по 0,5мл культури *Leptospirae icterohaemorrhagiae*. Розміщали у термостат при $+29^{\circ}\text{C}$ на 10 діб. По закінченні цього терміну проводили перегляд культур, спочатку у промені світла освітлювача 01-19, для встановлення характерного росту лептоспир у вигляді муарових хвиль, які виявляли при легенькому струшуванні пробірок та відсутність зернистості, характерної для аутоаглютинації.

У пробірках де було внесено 1% і 2% кролячої сироватки виявляли незначні муарові хвилі. Переглядали зростає культури під мікроскопом та виявляли 20-30 лептоспир у полі зору при збільшенні у 150 разів. Токсичність сироватки приводила до зменшення кількості лептоспир у 2 рази (досягала 10-15 у полі зору) з проявами токсичної дії на лептоспир, вони були фрагментовані, рухомість їх значно знижена, порушені лептоспир випадали в осад на дно пробірки.

В пробірках з концентрацією кролячої сироватки 3%, 4%, 5% виявляли інтенсивні муарові хвилі. Загальне збільшення мікроскопу 150 разів дозволило виявити в полі зору мікроскопу 100-150 добре рухливих лептоспир з типовою морфологією та характерною рухомістю, осаду на дні пробірок не виявляли, зернистість була відсутньою. Кількість лептоспир у пробірках з 3% - 5% сироватки була в 5-10 разів більшою у полі зору мікроскопу порівняно з пробірками з 1-2%. Вони мали характерну рухливість, сріблястий відтінок при відсутності аутоаглютинації у вигляді "павучків".

Починаючи з концентрації 6% і до 10% сироватки виявляли зернистість у пробірках, аглютиновані лептоспир у вигляді "павучків" -10-15 у полі зору мікроскопу, рухомість їх була зменшеною, виявляли лізовані лептоспир з порушеною морфологією, на дні пробірок утворювався осад із загнаних лептоспир. Такі культури лептоспир неможливо використовувати у якості антигену в РМА, тому що неможливо диференціювати аглютинацію визвану специфічними антитілами в сироватках, що досліджуються, з внесеними з антигеном аутоаглютинованими лептоспірами під дією високої концентрації сироватки.

Таким чином, у нашому прикладі, сприятливою для культивування лептоспир була концентрація з 3% - 5% кролячої сироватки в живильному середовищі, оптимальна кількість сироватки становила 3% - давала максимальний зріст лептоспир (100-150 та більше лептоспир у полі зору мікроскопу) без аутоаглютинації, з характерною рухомістю та морфологією, які можливо використовувати як для пересіву задля збереження музейних культур, а також для проведення серологічних досліджень в реакції мікроаглютинації (РМА). Дистильована вода одержана із свердловини з доведеним рН 7,2 - 7,4 та оптимальною кількістю кролячої сироватки (3%) є добрим живильним середовищем для лептоспир. Такі ж результати отримували при виготовленні живильного середовища Терських на основі дистильованої води із свердловини з використання 3% кролячої сироватки.

Запропонована корисна модель дозволила нам ізолювати велику кількість (біля 150) культур лептоспир від щурів, які були підтверджені Довідковою лабораторією ВООЗ у науково-дослідному інституті епідеміології і мікробіології ім. Гамалеї у Москві, як *Leptospira icterohaemorrhagiae*, серовар Copenhagen!, забезпечувати готовими до роботи якісними живильними середовищами, а також музейними штамами лептоспир. Запропонована ко-

рисна модель забезпечувала покращення діагностики лептоспірозів бактеріологічними лабораторіями відділів особливо небезпечних інфекцій обласних санепідстанцій.

Джерела інформації:

1. Варфоломеева А.А. Лептоспіроз. М. Медгиз, 1946, 40с.

2. Приказ МЗ СССР №1152 от 13.11.1979г. «О профилактике заболеваний людей лептоспирозом». М.1979 С. 58.