



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **64265** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ PROTEUS**

1

2

(21) u201015789

(22) 27.12.2010

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) ЮРЧЕНКО ЛЮДМИЛА АНАТОЛІЇВНА, ОСО-
ЛОДЧЕНКО ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ПАРУСОВА
ЯРОСЛАВА ЮРІЇВНА, ПАРУСОВ АНТОН ВОЛО-
ДИМІРОВИЧ, ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮРІЙОВИЧ,
КУЧМА ІРИНА ЮРІЇВНА, ВАЛЬЧУК СЕРГІЙ ІВАНО-
ВИЧ, МАРТИРОСЯН ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ЛА-
ХМАН СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, ПІЛЮГІН СЕРГІЙ
ВАСИЛЬОВИЧ, ПЕРВОМАЙСЬКА ОЛЬГА ЕДУАР-
ДІВНА(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРО-
БІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"(57) Живильне середовище для виявлення леци-
тиназної активності бактерій роду *Proteus* sp., що
містить агарову основу, яке **відрізняється** тим,
що має наступний кількісний та якісний склад:

глюкоза	4,0 %
пептон ферментативний	7,0 %
агар мікробіологічний	3,5 %
NaCl	2,5 %
жовткова суміш	20,0 %
pH	7,2.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме - до медичної мікробіології, зокрема до мікробіологічних поживних середовищ для культивування мікроорганізмів роду *Proteus*.

Характерною ознакою бактерій роду *Proteus* є здатність до роїння (Н-форма), яке здійснюється за рахунок утворення клітин - швермерів довжиною 20-30 мкм вже через 3-4 години росту на МПА. Клітинна стінка швермерів утворює єдину оболонку без перетинок, по всій довжині швермера рівномірно розташовані одинарні або парні ядерні структури. Через 0,5-1 годину швермери починають перетворюватись в звичайні клітини, серед яких знову утворюються подовжені форми роїння. Ці процеси супроводжуються швидким розповсюдженням культури по всій поверхні щільного середовища та суттєво ускладнює ідентифікацію супутньої мікрофлори.

Пригнічення феномену роїння може бути досягнуто підвищенням концентрації агару, культивуванням при температурі $t=45^{\circ}\text{C}$, додаванням до середовища поверхнево-активних речовин, однак ці умови не завжди є оптимальними для культивування інших потенційно патогенних мікроорганізмів, що можуть бути присутні в клінічному матеріалі в асоціації з протеєм.

Лецитиназна активність є важливим фактором патогенності мікроорганізмів роду *Proteus*. Для визначення лецитиназної активності більшості бактерій застосовується жовтково - сольовий агар (ЖСА), але для протеїв він є селективним сере-

довищем, пригнічує їх ріст, тому з вказаною метою не застосовується.

Для вирощування протею використовуються середовища Плоскірєва, Ендо, 5 % кров'яний агар та ін. Усі перераховані середовища виготовляються на основі м'ясо-пептонного агару. Відмінності між ними полягають у використанні додаткових стимуляторів росту: глюкози, лактози, пептону тощо [1-4].

Найбільш близьким за складом та за призначенням до рішення, що заявляється є поживне середовище Чистовича, що включає такі інгредієнти:

МПА	3,5 %
NaCl	10 %
жовткова суміш	15 %
pH	7,2.

Спільним із запропонованим середовищем є наявність у складі агару та жовткової суміші.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити поживне середовище для визначення гемолітичної активності бактерій роду *Proteus*, в якому за рахунок оптимізації складу компонентів забезпечити можливість дослідження лецитиназної активності мікроорганізмів роду *Proteus* та одночасного пригнічення феномену роїння.

Поставлена задача вирішена за рахунок використання в якості живильної основи пептону фер-

(13) **U**(11) **64265**(19) **UA**

ментативного, агару мікробіологічного, глюкози, жовткової суміші і NaCl.

Суттєвими ознаками корисної моделі, що заявляється, необхідними та достатніми для досягнення бажаного результату, є використання наступного кількісного та якісного складу середовища:

глюкоза	4 %
пептон ферментативний	7 %
агар мікробіологічний	3,5 %
NaCl	2,5 %
жовткова суміш	20 %
pH	7,2.

Вказане середовище може бути отримане наступним чином:

Живильну основу автоклавують 20 хв при 1 атм. При температурі основи 45 °С додають 20 % жовткової суміші (1 жовток на 150 мл фізіологічного розчину) та розливають в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Вміст агару до 35,0 г/л обумовлено тим, що при менших його значеннях протей переходить в Н-форму і проявляє здатність до роїння. Високі концентрації пептону та цукру фактично повністю пригнічують феномен роїння.

Можливість здійснення корисної моделі та придатність запропонованого складу для визначення лецитиназної активності та одночасного пригнічення роїння мікроорганізмів роду *Proteus* ілюструють нижче наведені приклади.

Приклад 1. Ростові якості запропонованого середовища

Для дослідження ростових властивостей середовища використовували 18 годинні культури протеев. Суспензію готували у стерильному фізіологічному розчині (1,0 каламутності за McFarland), з яких робили послідовні розведення до 10^{-6} - 10^{-7} мікробних клітин; по 0,1 мл суспензії засівали на чашку Петрі із запропонованим середовищем. В досліді використано стандартний штам *Proteus vulgaris* ATCC 4636, рекомендований для перевірки контролю якості поживних середовищ [5], а також клінічні ізоляти *Proteus vulgaris* та *Proteus mirabilis*, виділені із клінічного матеріалу від пацієнтів з гнійно-запальними процесами. Наявність росту при висіві 10^{-6} - 10^{-7} мікробних клітин є загальноприйнятим показником задовільної ростової якості середовища. Для порівняння використовували середовище для пригнічення роїння протейів, отримане шляхом кислотного гідролізу із еритроцитарної маси людини на якому також суттєво пригнічується процес роїння.

В якості контролю на кожному чашку засівали бляшку культури *S.aureus* ATCC 25923.

Усі досліді проводили у п'ятьох відтвореннях, результати статистично оброблено за допомогою комп'ютерної програми «Biostat», за критичний рівень значимості p приймали 0,05(табл. 1).

Таблиця 1

Кількісна характеристика росту протейів на запропонованому середовищі та середовищі, означеного в якості прототипу (контроль)

Вид мікроорганізму	№ штаму або ізоляту	Мікробне навантаження, КУО/мл	Кількість колоній (М±m)		
			Запропоноване середовище	Середовище із гідролізату еритроцитної маси	P
1	2	3	4	5	6
<i>P. vulgaris</i>	ATCC6	10^{-6}	68,6 ± 1,1	55,2 ± 0,7	p<0,05
		10^{-7}	5,8 ± 0,4	5,4 ± 0,4	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	19	10^{-6}	72,8 ± 1,4	53,8 ± 1,2	p<0,05
		10^{-7}	7,8 ± 0,4	6,0 ± 0,3	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	21	10^{-6}	68,2 ± 1,2	56,2 ± 1,2	p<0,05
		10^{-7}	7,6 ± 0,5	5,6 ± 0,4	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	27	10^{-6}	72,2 ± 1,1	59,8 ± 1,9	p<0,05
		10^{-7}	7,8 ± 0,6	5,4 ± 0,5	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	43	10^{-6}	75,0 ± 1,6	56,4 ± 2,1	p<0,05
		10^{-7}	7,4 ± 0,7	5,6 ± 0,4	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	56	10^{-6}	75,6 ± 1,9	56,8 ± 1,7	p<0,05
		10^{-7}	7,6 ± 0,4	5,8 ± 0,6	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	60	10^{-6}	74,4 ± 2,2	55,6 ± 1,3	p<0,05
		10^{-7}	8,4 ± 0,6	6,0 ± 0,3	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	70	10^{-6}	70,6 ± 2,9	53,8 ± 0,8	p<0,05
		10^{-7}	7,8 ± 0,8	6,6 ± 0,6	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	74	10^{-6}	75,0 ± 1,4	53,0 ± 1,3	p<0,05
		10^{-7}	7,2 ± 0,7	6,8 ± 0,6	p<0,05
<i>P. mirabilis</i>	16	10^{-6}	75,4 ± 1,5	52,8 ± 1,2	p<0,05
		10^{-7}	8,0 ± 0,3	6,2 ± 0,8	p<0,05
<i>P. mirabilis</i>	18	10^{-6}	76,2 ± 2,3	58,0 ± 1,2	p<0,05
		10^{-7}	8,6 ± 0,5	7,0 ± 0,4	p<0,05

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6
P. mirabilis	23	10^{-6}	$77,4 \pm 1,2$	$60,0 \pm 0,4$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,4 \pm 0,9$	$6,4 \pm 0,4$	$p < 0,05$
P. mirabilis	24	10^{-6}	$76,0 \pm 1,5$	$61,0 \pm 1,7$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,6 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,6$	$p < 0,05$
P. mirabilis	32	10^{-6}	$73,6 \pm 1,9$	$59,2 \pm 1,1$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$7,8 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,7$	$p < 0,05$
P. mirabilis	35	10^{-6}	$76,4 \pm 2,1$	$58,0 \pm 1,3$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,4 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,2$	$p < 0,05$
P. mirabilis	41	10^{-6}	$71,2 \pm 2,3$	$60,0 \pm 1,3$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,8 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,6$	$p < 0,05$
P. mirabilis	46	10^{-6}	$78,2 \pm 1,9$	$59,2 \pm 2,1$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$9,2 \pm 0,8$	$6,6 \pm 0,7$	$p < 0,05$
P. mirabilis	54	10^{-6}	$76,8 \pm 1,4$	$60,6 \pm 1,1$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$9,0 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,5$	$p < 0,05$
P. mirabilis	55	10^{-6}	$77,2 \pm 1,1$	$58,0 \pm 1,4$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,8 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,4$	$p < 0,05$
P. mirabilis	61	10^{-6}	$77,8 \pm 1,2$	$53,2 \pm 2,1$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$9,2 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,5$	$p < 0,05$
P. mirabilis	68	10^{-6}	$74,4 \pm 3,2$	$61,2 \pm 1,6$	$p < 0,05$
		10^{-7}	$8,6 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,6$	$p < 0,05$

Примітка: підрахунок колоній проведено через 24 години культивування.

Культурально морфологічні ознаки тест-культур і клінічних ізолятів були типовими (окремі біологічні властивості ізолятів виявились стабільними при збереженні у напіврідкому середовищі при температурі -4°C протягом 6 місяців).

Приклад 2. Оцінка лецитиназної активності бактерій роду *Proteus* з використанням запропонованого живильного середовища

При визначенні лецитиназної активності середовище, отримане з гідролізату еритроцитарної маси, було модифіковане шляхом додавання стандартної кількості субстрату для лецитинази (20 % жовткової суміші) та використано в якості об'єкту порівняння (табл. 2).

Таблиця 2

Наявність лецитиназної активності культур протею на запропонованому середовищі та середовищі – прототипі

Вид мікроорганізму	№ штаму або "ізоляту"	Лецитиназна активність мікроорганізмів	
		Запропоноване середовище	Середовище із солянокислого гідролізату еритроцитарної маси
1	2	3	4
P. vulgaris	ATCC 4636	—	—*
P. vulgaris	19	+	—
P. vulgaris	21	+	—*
P. vulgaris	27	+	—
P. vulgaris	43	—	—*
P. vulgaris	56	—	—
P. vulgaris	60	—	—
P. vulgaris	70	+	—*
P. vulgaris	74	+	—
P. mirabilis	16	+	—
P. mirabilis	18	+	—*
P. mirabilis	23	+	+
P. mirabilis	24	+	—*
P. mirabilis	32	+	—
P. mirabilis	35	+	+
P. mirabilis	41	+	+
P. mirabilis	46	+	—*
P. mirabilis	54	—	—*

Продовження таблиці 2

1	2	3	4
<i>P. mirabilis</i>	55	+	—*
<i>P. mirabilis</i>	61	+	—*
<i>P. mirabilis</i>	68	+	+

Примітка: « + » - наявність ознаки,
« - » - відсутність ознаки
« * » - наявність елементів роїння

Отримані дані вказують на придатність запропонованого складу для виявлення лецитиназної активності, високий рівень його продуктивності та здатність повністю пригнічувати роїння.

Джерела інформації:

1. Нестерова Г.Н. Патогенетическое значение эколого-физиологических особенностей рода *Proteus*, (сб. лекций).- Горький.- 1975.-79 с.

2. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // Под

ред. М.О. Биргера, 3-е изд.- М.: Медицина, 1982.- 464 с.

3. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим средам.-М.Медицина.- 2003.-316 с.

4. «Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии», ВОЗ, Женева, 1994.

5. Інформаційний лист МОЗУ, 15.11.00, № 05.4.1/1670 "Бактеріологічний контроль поживних середовищ".