



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64266 (13) U
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ PROTEUS

1

2

(21) u201015794

(22) 27.12.2010

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) ЮРЧЕНКО ЛЮДМИЛА АНАТОЛІЙВНА, ОСО-
ЛОДЧЕНКО ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ПАРУСОВА
ЯРОСЛАВА ЮРІЙВНА, ПІЛЮГІН СЕРГІЙ ВАСИ-
ЛЬОВИЧ, ВАЛЬЧУК СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, КУЧМА
ІРИНА ЮРІЙВНА, ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮРІЙО-
ВИЧ, ПОРТ ОЛЕНА ВАЛЕРІЙВНА, ШТИКЕР ЛЮ-
БОВ ГРИГОРІЙВНА, БАТРАК ОЛЕНА АНАТОЛІЙВ-
НА, РЯБОВА ІРИНА СЕМЕНІВНА, МАРТИРОСЯНІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, МІЗІН ВАСИЛЬ ВАСИ-
ЛЬОВИЧ(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРО-
БІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"(57) Живильне середовище для виявлення гемо-
літичної активності бактерій роду *Proteus* sp., що
містить агарову основу, яке **відрізняється** тим,
що має наступний кількісний та якісний склад: глю-
кози 40,0 г/л, натрію хлориду 25,0 г/л, агару мікро-
біологічного 35,0 г/л, пептону ферментативного
70,0 г/л, еритроцитарної маси крові людини 50,0
мл/л.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до медичної мікробіології, зокрема, до пожи-
вних середовищ придатних для застосування в
мікробіологічних (бактеріологічних) лабораторіях
медичного, ветеринарного та технічного профілю.

Характерною ознакою бактерій роду *Proteus* є
здатність створювати роєві колонії (Н-форма). Ро-
їння здійснюється за рахунок подовжених (20-30 и)
клітин - швермерів через 3-4 години культивування
на м'ясо-пептонному агарі. На створювання джгу-
тикового апарату впливає стан поживного середо-
вища, перед за все аерація. В аеробних умовах
при рН=6,0-8,0 р кількість джгутиків збільшуєть-
ся. При підвищенні концентрації агару, культиву-
ванні при температурі t=45 °С, додаванні до сере-
довища поверхнево-активних речовин протей із Н-
форми трансформується в О-форму і формує ізо-
льовані колонії на щільному поживному середо-
вищі. Отримання ізольованих колоній протей важ-
ливо для виділення супутньої мікрофлори.

Визначення гемолітичної активності прово-
диться з метою визначення ступеню патогенності
виділеної культури.

Відоме живильне середовище для визначення
гемолітичної активності мікроорганізмів (поживний
агар с 5,0 % дефібрінованою кров'ю), однак воно
не придатне для застосування при роботі з куль-
турами протей, оскільки на ньому спостерігається
роїння.

Відоме середовище для пригнічення роїння
бактерій роду *Proteus* (Патент на корисну модель
№ 23150 UA, від 10.05.2007 р.) з наступним спів-
відношенням компонентів:

солянокислий гідролізат еритроци- тарної маси крові людини	50,0 г/л
натрію фосфат двузамісний	2,25 г/л
натрію карбонат	1,42 г/л
йод металевий	0,12 г/л
бентонітова глина	8,0 г/л
агар мікробіологічний	2,5 г/л
дистильована вода	1,0 л
рН	7,2

Однак це середовище не призначено для ви-
значення гемолітичної активності.

Для вивчення останньої використовують 5,0 %
кров'яний агар на основі комерційного поживного
агару для культивування мікроорганізмів (ГРМ-
АГАР), до складу якого входять:

панкреатичний гідролізат кільки	17,9 г/л
натрію хлорид	7,5 г/л
агар мікробіологічний	12,0 г/л
дистильована вода	1,0 л
рН	7,3

Дефібріновану кров кроля, коня, барана чи
людини додають в кількості 5,0 %. Однак і це се-
редовище не пригнічує роїння культури протей.

Для вирощування протей зазвичай застосо-
вуються середовище Плоскірева та інші [1,2,4].

(19) UA (11) 64266 (13) U

Відмінності між ними полягають у використанні додаткових стимуляторів росту: глюкози, лактози, пептону [2, 3].

Прототипом середовища, що заявляється є середовище Плоскірева [2], до складу якого входять такі інгредієнти:

панкреатичний гідролізат кільки	16,0 г/л
натрію гідроцитрат двузамісний	8,82 г/л
лактоза	7,59 г/л
натрію фосфат двозамісний	2,25 г/л
натрію тіосульфат	0,86 г/л
натрієві солі жовчних кислот	8,10 г/л
натрію карбонат	1,42 г/л
йод металеий	0,12 г/л
нейтральний червоний	0,04 г/л
брильянтовий зелений	0,02 г/л
агар мікробіологічний	8,75 г/л
дистильована вода	1,0 л
pH	7,2

Єдиною спільною ознакою в складі наведених аналогів, включаючи прототип є наявність агару.

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

Поставлена задача виконана шляхом використання в якості живильної основи пептону ферментативного замість панкреатичного гідролізату кільки; еритроцитарної маси крові людини замість дефібрінованої крові; глюкози замість лактози; натрію хлориду та підвищеного вмісту агару.

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

еритроцитарна маса крові людини	50,0 мл/л
глюкоза	40,0 г/л
натрію хлорид	25,0 г/л

агар мікробіологічний	35,0 г/л
пептон ферментативний	70,0 г/л

Варіювання кількісного та якісного складу середовища недоцільно, внаслідок негативного впливу на його ростові властивості та здатність протей до роїння.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструють наступні приклади.

Приклад 1. Спосіб отримання.

Основу запропонованого середовища (глюкоза, натрію хлорид, агар, пептон) автоклавують 20 хв при тиску в 1 атм. Після того, як основа досягне 45 °С, до неї додають 50,0 мл/л еритроцитарної маси та розливають в чашки Петрі. Вміст агару до 35,0 г/л обумовлено тим, що при менших його значеннях протей переходить в Н-форму і проявляє здатність до роїння. Висока концентрація пептону та цукру сприяє накопиченню поживних речовин в середовищі та суттєво знижує феномен роїння.

Приклад 2. Оцінка ростових властивостей запропонованого середовища

Для дослідження гемолітичної активності протей використовували 18-добову культуру мікроорганізмів. Готували суспензію у стерильному фізіологічному розчині, що відповідала 1,0 одиниці кааламутності за McFarland, з яких робили послідовні розведення до 10^{-6} , 10^{-7} мікробних клітин; по 0,1 мл засівали на чашку Петрі з запропонованим середовищем. До досліду брали *Proteus vulgaris* ATCC 4636, який рекомендований для контролю якості поживних середовищ [5], а також клінічні 8 ізолятів *Proteus vulgaris* та 12 *Proteus mirabilis*. Ізоляти вилучено від хворих із запальними процесами. Наявність росту при висіві 10^{-6} та 10^{-7} мікробних клітин загальноприйнято в якості індикатору задовільної ростової якості середовища. Для порівняння використовували середовище Плоскірева, на якому також пригнічується роїння протей. Усі досліди проведено в п'яти повтореннях, результати оброблено статистично з використанням комп'ютерної програми Biostat (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика кількості мікроорганізмів, що виросли на запропонованому середовищі для одночасного визначення гемолітичної активності та пригнічення роїння протей

Вид мікроорганізму	№ штаму або ізоляту	Мікробне навантаження, КУО/мл	Кількість колоній ($M \pm m$)		
			Середовище Плоскірьова	Запропоноване середовище	P
1	2	3	4	5	6
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 4636	10^{-6}	60,8±4,6	68,6±1,3	p<0,05
		10^{-7}	8,0±0,7	8,0±0,5	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	19	10^{-6}	59,6±1,9	62,4±2,2	p<0,05
		10^{-7}	8,6±0,8	7,8±0,4	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	21	10^{-6}	65,2±2,4	70,6±0,7	p<0,05
		10^{-7}	6,6±0,5	8,2±0,8	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	27	10^{-6}	62,4±2,4	69,2±1,6	p<0,05
		10^{-7}	8,0±0,9	10,6±1,3	p<0,05
<i>P. vulgaris</i>	43	10^{-6}	70,0±3,4	69,2±0,6	p<0,05
		10^{-7}	9,8±0,9	9,8±0,9	p<0,05

Продовження табл. 1

Порівняльна характеристика кількості мікроорганізмів, що вирости на запропонованому середовищі для одночасного визначення гемолітичної активності та пригнічення роїння протеїв

Вид мікроорганізму	№ штаму або ізоляту	Мікробне навантаження, КУО/мл	Кількість колоній (M±m)		
			Середовище Плоскірєва	Запропоноване середовище	P
1	2	3	4	5	6
P. vulgaris	56	10 ⁻⁶	57,4±2,6	65,8±2,3	p<0,05
		10 ⁻⁷	7,8±0,6	8,8±0,9	p<0,05
P. vulgaris	60	10 ⁻⁶	66,8±3,2	70,6±1,2	p<0,05
		10 ⁻⁷	9,6±0,8	10,0±0,7	p<0,05
P. vulgaris	70	10 ⁻⁶	64,2±1,7	66,6±2,1	p<0,05
		10 ⁻⁷	8,4±1,2	9,6±1,3	p<0,05
P. vulgaris	74	10 ⁻⁶	61,2±1,9	65,8±1,9	p<0,05
		10 ⁻⁷	7,8±1,2	8,2±0,6	p<0,05
P. tnirabilis	16	10 ⁻⁶	63,2±1,7	66,0±2,4	p<0,05
		10 ⁻⁷	8,2±0,3	9,6±0,8	p<0,05
P. mirabilis	18	10 ⁻⁶	60,6±1,1	68,4±1,7	p<0,05
		10 ⁻⁷	8,2±0,9	7,4±0,7	p<0,05
P. mirabilis	23	10 ⁻⁶	60,6±1,1	65,2±0,9	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,6±0,7	8,0±0,5	p<0,05
P. mirabilis	24	10 ⁻⁶	61,8±2,2	65,2±1,4	p<0,05
		10 ⁻⁷	7,0±0,6	8,0±0,3	p<0,05
P. mirabilis	32	10 ⁻⁶	63,4±1,1	65,6±1,9	p<0,05
		10 ⁻⁷	7,8±0,4	8,4±0,8	p<0,05
P. mirabilis	35	10 ⁻⁶	62,6±1,9	61,8±1,8	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,0±0,3	7,8±0,7	p<0,05
P. mirabilis	41	10 ⁻⁶	60,2±0,8	62,8±0,9	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,8±0,9	7,8±0,6	p<0,05
P. mirabilis	46	10 ⁻⁶	59,6±1,2	62,6±1,5	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,2±0,4	7,2±0,7	p<0,05
P. mirabilis	54	10 ⁻⁶	61,6±1,3	62,8±0,9	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,2±0,5	7,2±0,7	p<0,05
P. mirabilis	55	10 ⁻⁶	61,0±2,0	66,6±1,7	p<0,05
		10 ⁻⁷	5,8±0,6	7,2±0,4	p<0,05
P. mirabilis	61	10 ⁻⁶	58,4±1,6	62,0±0,8	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,2±0,4	7,6±0,7	p<0,05
P. mirabilis	68	10 ⁻⁶	60,8±1,2	63,0±1,5	p<0,05
		10 ⁻⁷	6,8±0,6	7,8±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 3. Оцінка гемолітичних властивостей бактерій роду *Proteus* Для визначення гемолітичної активності у запропоноване середовище додавали 50,0 мл/л еритроцитарної маси, а до середовища Плоскірєва - 50,0 мл/л дефібринованої крові людини (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика прояву гемолітичних властивостей на запропонованому середовищі в порівнянні з прототипом

Вид мікроорганізму	№ штаму або клінічного ізоляту	Гемолітична активність мікроорганізмів	
		Середовище Плоскірева	Запропоноване середовище
1	2	3	4
<i>P. vulgaris</i>	ATCC 4636	–	–
<i>P. vulgaris</i>	19	+	+
<i>P. vulgaris</i>	21	+	+
<i>P. vulgaris</i>	27	–	+
<i>P. vulgaris</i>	43	–	–
<i>P. vulgaris</i>	56	–	–
<i>P. vulgaris</i>	60	–	–
<i>P. vulgaris</i>	70	–	+
<i>P. vulgaris</i>	74	–	–
<i>P. mirabilis</i>	16	–	+
<i>P. mirabilis</i>	18	–	+
<i>P. mirabilis</i>	23	+	+
<i>P. mirabilis</i>	24	+	+
<i>P. mirabilis</i>	32	+	+
<i>P. mirabilis</i>	35	+	+
<i>P. mirabilis</i>	41	+	+
<i>P. mirabilis</i>	46	+	+
<i>P. mirabilis</i>	54	–	+
<i>P. mirabilis</i>	55	+	+
<i>P. mirabilis</i>	61	–	+
<i>P. mirabilis</i>	68	+	+

Примітка : "+" - наявність ознаки; "-" - відсутність ознаки.

Наведені данні підтверджують придатність запропонованого середовища для одночасного виявлення гемолітичної активності та пригнічення роїння. Продуктивність запропонованого середовища вища з рівнем достовірності $p < 0,05$ у порівнянні з прототипом.

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

5. Luzzaro Francesco, Mezzatesta Marilina, Mugnatioli Claudia, Amicosante Gianfranco. Trends in Production of Extended Spectrum β -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. // J. of Clin. Microbiol. - 2006. - Vol 44. - №5. - p. 1659-1664.