



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **70576** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2010 06008	(72) Винахідник(и): Мироненко Людмила Григорівна (UA), Перетятко Олена Георгіївна (UA), В'ялих Жанна Едуардівна (UA), Черняєва Тамара Анатоліївна (UA), Волков Тарас Олександрович (UA), Маланчук Світлана Генадіївна (UA), Крестецька Світлана Леонідівна (UA), Вальчук Сергій Іванович (UA), Пилюгін Сергій Васильович (UA), Кучма Ірина Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 18.05.2010	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2012	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.11.2011, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул.Пушкінська, 14, м.Харків, 61057 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2012, Бюл.№ 12	

(54) ШТАМ ENTEROCOCCUS DURANS 43-Д ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ДЛЯ ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЕНТЕРОКОКІВ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ОЗНАКАМИ

(57) Реферат:

Штам *Enterococcus durans* для використання як негативного контролю в тест-системах для видової ідентифікації ентерококів за біохімічними ознаками, депонований в депозитарії ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України" за № 43-Д.

UA 70576 U

Корисна модель належить до мікробіології та лабораторної діагностики, зокрема являє собою штам *Enterococcus durans*, що може використовуватися в тест-системах для біохімічної ідентифікації клінічно значущих представників роду *Enterococcus*. Штам придатний для використання як негативного контролю при урахуванні результатів дослідження, а також як

контрольної референтної культури 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 мелецитоза), розташованих у 8-лункових стріпах 96-лункової пластинки, розрахованої на одночасну 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 негативний контроль в EN-COCCUStest виробником рекомендується референтний штам *Enterococcus durans* CCM 5612^T [Collins, M.D. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. [Text]/ Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J.A.E., Kilpper-Balz, R., Schleifer, K.H. *Int. Hi. Syst. Bacteriol.* - 1984. - V. 34. - P. 220-223], що є прототипом корисної моделі, яка заявляється. Він характеризується широким спектром біохімічної активності, але дає негативну реакцію з більшістю субстратів тест-системи (за винятком аргініну). В склад набору EN-COCCUStest, доступного на вітчизняному ринку, цей штам не входить, оскільки експортно-імпортні операції з біологічним матеріалом вимагають дотримання складних та вартісних процедур. Штам депоновано в багатьох національних та міжнародних колекціях (CCM 5612^T=ATCC 19432=CCTM La 2365=CIP 55.125 - CNCTC Str 8/63=DSM 20633=JCM 8725=LMG 10746=NCDO 596=NCTC 8307), 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 *Enterococcus durans* CCM 5612^T.

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, правильною 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) °C, температурний оптимум - 37 °C. Оптимальне для росту значення pH - pH 6,3-6,6. Росте при 40 % жовчі, при 6,5 % NaCl, при pH 9,6. Гідролізує аргінін, ескулін. Ферментує вуглеводи з утворенням молочної кислоти без продукування вуглекислого газу. Зброджує D-глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, D-манозу, рибозу, трегалозу, саліцин. Не ферментує арабінозу, D-арабітол, L-арабітол, гліцерол, манітол, мелібіозу, мелецитозу, рафінозу, сорбітол, сорбозу, інулін, сахарозу, рамнозу, ксілозу. Дані табл. 1 ілюструють біохімічні властивості *Enterococcus durans* CCM5612^T.

Таблиця 1

Біохімічні властивості *Enterococcus durans* CCM 5612^T за результатами дослідження з використанням EN-COCCUStest (температурний оптимум +37 °C)

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

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

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

Поставлену задачу вирішено використанням штаму, ізолюваного у 2007 році в бактеріологічній лабораторії Міської лікарні № 2 м. Харкова з кишечника хворого на цукровий діабет. Штам ідентифіковано як *E. durans*, в філії Музею мікроорганізмів на базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України», м. Харків, вул. Пушкінська, 14/16.

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 $37 \pm 0,5$ °С. Кінцеве клонування штаму проведено двадцятьма пасажами з окремих колоній. В процесі виконаних пасажів ретельно вивчено біохімічні властивості проміжних культур ентерококу і підтверджено їх стабільність протягом року.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму.

Морфологія.

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

Культуральні властивості.

Штам *Enterococcus durans* 43-Д за типом дихання - факультативний анаероб. При вирощуванні на поверхні середовища «Ентерококагар» колонії світло-рожевого кольору мають правильну округлу форму діаметром 0,7-1,0 мм, гладку, випуклу поверхню, рівний край. У бульйоні утворюють однорідну каламуть.

Фізіолого-біохімічні властивості.

Каталазонегативний. Росте при температурі (10-45) °С, температурний оптимум - 37 °С. Оптимальне для росту значення рН - рН 6,3-6,6. Росте при 40 % жовчі, при 6,5 % NaCl, при рН 9,6. Гідролізує аргінін, ескулін. Ферментує вуглеводи з утворенням молочної кислоти без продукування вуглекислого газу. Зброджує D-глюкозу, галактозу, лактозу, мальтозу, D-манозу, рибозу, трегалозу, саліцин. Не ферментує арабінозу, D-арабітол, L-арабітол, гліцерол, манітол, мелібіозу, мелецитозу, рафінозу, сорбітом, сорбозу, інулін, сахарозу, рамнозу, ксілозу.

Умови зберігання.

Для довгострокового та більш надійного 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 і витримують в термостаті з щоденною перевіркою протягом 4 днів.

Відомості про депонування: штам *Enterococcus durans* депоновано у Депозитарії ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України" за номером 43-Д 22 березня 2010 року.

Можливість здійснення корисної моделі 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 durans* 43-Д як негативного контролю.

Чисті культури контрольних штамів виду *Enterococcus durans* 43-Д висівають на кров'яний агар для отримання ізолюваних колоній та інкубують при 37 °С протягом 18-24 годин.

Подальша послідовність технологічних 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 Densi-La-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. Інкують при температурі 37 °C 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, інкують при температурі (35-37) °C протягом 24 годин, після чого здійснюють оцінку результатів тестів.

Тест-система може вважатися придатною до використання, якщо профіль біохімічної активності референтного штаму *Enterococcus durans* 43-Д відповідає стандарту, а саме аргінін - позитивний тест (червоно-фіолетовий або червоний колір), сорбоза, арабіноза, манітол, сорбітол, мелібіоза, рафіноза, мелецитоза - негативний тест (червоний або помаранчево-червоний колір). Отримані дані наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Біохімічні властивості *Enterococcus durans* 43-Д за результатами дослідження з використанням EN-COCCUStest (температурний оптимум +37 °C)

Тести							
H ARG	G SOE	F ARA	E MAN	D SOR	C MLB	B RAF	A 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 параметрами, які оцінюються в тест-системі EN-COCCUStest, штам *Enterococcus durans* 43-Д ідентичний штаму *Enterococcus durans* CCM 5612^T.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Enterococcus durans* для використання як негативного контролю в тест-системах для видової ідентифікації ентерококів за біохімічними ознаками, депонований в депозитарії ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України" за № 43-Д.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601