



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83167** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 03470	(72) Винахідник(и): Завгородній Андрій Іванович (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Позмогова Світлана Аркадіївна (UA), Гірка Марина Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.03.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2013, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ M. PARATUBERCULOSIS

(57) Реферат:

Поживне середовище для культивування M. Paratuberculosis що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанонокислий, гліцерин, яєчну масу, малахітовий зелений, дистильовану воду. Додатково містить натрій піровиноградний, коричневє лимонноаміачне залізо (III), витяжку низинного торфу, глюкозу, картопляний відвар.

UA 83167 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології для виготовлення поживних середовищ для накопичення бактеріальної маси з метою подальшого вивчення культурально-морфологічних, біологічних та біохімічних властивостей культур у ветеринарній медицині при встановленні діагнозу на паратуберкульоз, диференціальної діагностики від інших видів мікобактерій та підвиду *M. avium*.

На сучасному етапі культивування *M. paratuberculosis* засновано на мікобактинзалежності, яка використовується як таксономічна характеристика цього виду мікобактерій. Для культивування субкультур виготовляють середовища, у склад яких додають похідну *M. phlei*-*mycobactin J*, або використовують готові стандартизовані поживні середовища імпорного виробництва з вмістом *mycobactin J*.

У ветеринарній практиці використовують модифіковане середовище Dubos's, в склад якого входять: касаміно кислоти (Difco), аспарагін, натрій фосфорнокислий 2-заміщений, натрій лимоннокислий, калій дигідрофосфат, магній сірчанокислий, гліцерин, Твін-80, агар, хлорамфенікол, пеніцилін, амфотерицин В, сироватка крові, *mycobactin J* [Smith H.W. Modification of Dubos's media for the cultivation of *Mycobacterium johnei*. J. Pathol. Bacteriol., 1953. - № 66. - P. 375-381]. Недоліком цього середовища є висока вартість і складність його придбання, а також недостатньо інтенсивний ріст культури.

Для культивування збудника паратуберкульозу існує стандартизоване живильне середовище Herrolds's, яке містить пептон; хлорид натрію; м'ясний екстракт; гліцерин; піруват натрію; агар; *mycobactin J*; яєчні жовтки; малахітовий зелений. У вміст цього середовища входять дорогі антибіотики: хлорамфенікол, пеніцилін, амфотерицин В [OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals.-2004; ch.2. 2. 6. PARATUBERCULOSIS]. Недоліком цього середовища є висока вартість та недостатнє накопичення бактеріальної маси, а також складність обліку росту колоній, в результаті схожості кольору колоній і середовища.

Найбільш близьким до об'єкта, що заявляється, є середовище Левенштейна - Ієнсена, до складу якого входить L-аспарагін, калій фосфорнокислий 1-заміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, гліцерин, яєчна маса, малахітовий зелений, вода дистильована *mycobactin J* [Jorgensen J.B. An improved medium for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from faeces. Acta Vet. Scand., 1982. - № 23, P. 325-335]. Це середовище може бути найближчим аналогом. Недоліком середовища є висока вартість імпорних складових цього середовища: L-аспарагину та *mycobactin J*. Ріст культури спостерігали при наявності *mycobactin J*.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити поживне середовище для культивування збудника паратуберкульозу, що містить калій фосфорнокислий 1-заміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, гліцерин, яєчну масу, малахітовий зелений, дистильовану воду шляхом вилучення L-аспарагину, *mycobactin J*, та шляхом додавання до складу поживного середовища натрію піровиноградного, коричневого лимонноаміачного заліза (III), витяжки низинного торфу, глюкози, картопляного відвару при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,44-1,64
магній сірчанокислий	0,10-0,20
натрій лимоннокислий	0,28-0,48
глікокол	4,0-6,0
гліцерин	5,0-7,0
малахітовий зелений 2 %	10,0-20,0
яєчна маса	400,0 см ³
натрій піровиноградний, (C ₄ H ₃ O ₃ Na)	4,0-6,0
коричневе лимонноаміачне залізо (III)	4,0-6,0
глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	4,0-6,0
витяжка низинного торфу	30,0-50,0 см ³
картопляний відвар	300,0 см ³
вода дистильована	до 1000,0 см ³

Порівняльний аналіз запропонованого поживного середовища з найближчим аналогом дозволяє зробити висновок, що заявлений склад поживного середовища відрізняється відсутністю в ньому L-аспарагину, *mycobactin J* та введення до його складу натрію піровиноградного, коричневого лимонноаміачного заліза (III), витяжки низинного торфу, картопляного відвару як фактора росту, що не відображається на якості середовища і дозволяє культивувати збудника паратуберкульозу в подальших пасажах.

Поживне середовище готують таким чином.

У гомогенізовану яєчну масу додають розчинені в дистильованій воді складові компоненти: калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчанокислий, натрій лимоннокислий, глікокол,

гліцерин, малахітовий зелений 2 %, натрій піровиноградний, коричневе лимонноаміачне залізо (III), витяжку низинного торфу, профільтрований стерильний картопляний відвар (з розрахунку 400,0 г картоплі на 1 л дистильованої води), ретельно перемішують. Потім ставлять в термостат за температури 37 °С на три години і періодично перемішують до створення однорідної суспензії. Суспензію фільтрують через марлю доводять рН до 6,0 лимонною кислотою і розливають у бактеріологічні пробірки по 4 см³, закривають ватно-марлевими пробками і коагулюють у вертикальному положенні за температури (90±0,5)°С протягом 60 хвилин.

Перед висівом культур середовище перевіряють на стерильність шляхом витримування у термостаті за температури (37,5±0,5)°С впродовж 3 діб.

10 Приклад № 1. Поживне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,44
магній сірчаноокислий	одо
натрій лимоннокислий	0,28
глікокол	4,0
гліцерин	5,0
малахітовий зелений 2 %	10,0 см ³
яєчна маса	400,0 см ³
натрій піровиноградний, (C ₄ H ₃ O ₃ Na)	4,0
коричневе лимонноаміачне залізо (III)	4,0
глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	4,0
витяжка низинного торфу	30,0 см ³
картопляний відвар	300,0 см ³
вода дистильована	до 1000,0 см ³

Приклад № 2.

Теж, що і в прикладі № 1 при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,54
магній сірчаноокислий	0,15
натрій лимоннокислий	0,38
глікокол	5,0
гліцерин	6,0
малахітовий зелений 2 %	15,0 см ³
яєчна маса	400,0 см ³
натрій піровиноградний, (C ₄ H ₃ O ₃ Na)	5,0
коричневе лимонноаміачне залізо (III)	5,0
глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	5,0
витяжка низинного торфу	40,0 см ³
картопляний відвар	300,0 см ³
вода дистильована	до 1000,0 см ³

Приклад № 3.

15 Теж, що і в прикладі № 2 при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,64
магній сірчаноокислий	0,20
натрій лимоннокислий	0,48
глікокол	6,0
гліцерин	7,0
малахітовий зелений 2 %	20,0 см ³
яєчна маса	400,0 см ³
натрій піровиноградний, (C ₄ H ₃ O ₃ Na)	6,0
коричневе лимонноаміачне залізо (III)	6,0
глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	6,0
витяжка низинного торфу	50,0 см ³
картопляний відвар	300,0 см ³
вода дистильована	до 1000,0 см ³

Ростові властивості поживного середовища визначали за швидкістю та інтенсивністю росту шляхом висіву референтного штаму *M. paratuberculosis* на середовище. Швидкість (діб.) та інтенсивність (+) росту

20 *M. paratuberculosis* на середовищі, що заявляється і середовищі Левенштейна - Ієнсена наведені в таблиці.

З матеріалів таблиці видно, що на запропонованому середовищі (приклад № 2), та (приклад № 3) первинний ріст колоній *M. paratuberculosis* спостерігали на 15 добу у вигляді дрібних (до 1,0 мм), білого кольору колоній. Вже на 20 добу спостерігали збільшення росту колоній на середовищі (приклад № 2), тоді як на середовищі (приклад № 3) ріст колоній залишався таким же. На середовищах з мінімальним складом компонентів (приклад № 1) та на середовищі Левенштейна - Ієнсена, росту колоній *M. paratuberculosis* не виявляли протягом всього періоду культивування (30 діб). На середовищі (приклад № 2) на 30 добу спостереження відмічали ріст колоній на всій поверхні середовища у вигляді поодиноких колоній, а деякі з них зливались утворюючи між собою не рівну бугристу поверхню.

Таким чином, запропоноване поживне середовище (приклад № 2) є оптимальним для культивування збудника паратуберкульозу для накопичення бактеріальної маси, має високі елективні ростові властивості, його виготовлення не потребує імпортного мусобactin J, антибіотиків та інших дорогих компонентів.

Таблиця

Поживне середовище для культивування *M. paratuberculosis*

Швидкість (діб.) росту	Запропоноване середовище			Середовище Левенштейна - Ієнсена
	Інтенсивність росту (+)			Інтенсивність росту (+)
	Приклад № 1	Приклад № 2	Приклад № 3	
10	-	-	-	-
15	-	+	+	-
20	-	++	+	-
25	-	+++	+++	-
30	-	++++	+++	-
Примітка:	(-) - росту немає; (+) - від 1 до 10 колоній; (++) - від 10 до 20 колоній; (+++) - від 20 до 50 колоній; (++++)- ріст по всій поверхні середовища			

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Поживне середовище для культивування *M. Paratuberculosis*, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, натрій лимоннокислий, магній сірчанокислий, гліцерин, ячну масу, малахітовий зелений, дистильовану воду, яке **відрізняється** тим, що додатково містить натрій піровиноградний, коричневе лимонноаміачне залізо (III), витяжку низинного торфу, глюкозу, картопляний відвар при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,44-1,64
магній сірчанокислий	0,10-0,20
натрій лимоннокислий	0,28-0,48
глікокол	4,0-6,0
гліцерин	5,0-7,0
малахітовий зелений 2 %	10,0-20,0
ячна маса	400,0 см ³
натрій піровиноградний, (C ₄ H ₃ O ₃ Na)	4,0-6,0
коричневе лимонноаміачне залізо (III)	4,0-6,0
глюкоза (C ₆ H ₁₂ O ₆)	4,0-6,0
витяжка низинного торфу	30,0-50,0 см ³
картопляний відвар	300,0 см ³
вода дистильована	до 1000,0 см ³ .

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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