



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76004** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**C12N 1/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 05478</b>	(72) Винахідник(и): <b>Завгородній Андрій Іванович (UA), Позмогова Світлана Аркадіївна (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Гірка Марина Олександрівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>03.05.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.12.2012</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.12.2012, Бюл.№ 24</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)</b>

## (54) ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ M. PARATUBERCULOSIS З ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

### (57) Реферат:

Живильне середовище для виділення M. paratuberculosis з патологічного матеріалу містить калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчаноокислий, гліцерин, зелений малахітовий водний розчин, яєчну масу, натрій піровіноградний, кислоту амінооцтову, спиртовий екстракт маси M.scrofulaceum, воду дистильовану.

UA 76004 U



Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології для виготовлення живильних середовищ з метою виділення збудника паратуберкульозу з біологічного матеріалу та його ідентифікації і може використовуватися у ветеринарній медицині при встановленні діагнозу на паратуберкульоз, диференціальній діагностиці від інших видів мікобактерій.

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

10 Для ізоляції збудника паратуберкульозу з патологічного матеріалу 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 склад 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 те, що воно не достатньо контрастне з кольором колоній збудника паратуберкульозу.

15 У ветеринарній практиці також використовують модифіковане середовище Dubos's, в склад якого входять: касаміно кислоти (Difco), аспарагін, натрій фосфорнокислий 2-заміщений, натрій лимоннокислий, калій дигідрофосфат, магній сірчаноокислий, 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. -Р. 375-381). Проте, відсутність яєць у цьому середовищі не дозволяє нейтралізувати залишки деконтамінуючих речовин, що використовуються при передпосівній обробці. Це негативно позначається на первинному виділенні мікобактерій з патологічного матеріалу. Крім того, основна проблема використання цих середовищ є їх висока вартість і складність придбання.

20 Найбільш близьким до об'єкта, що заявляється, є середовище Левенштейна-Ієнсена, до складу якого входить L-аспарагін, калій фосфорнокислий 1-заміщений, магній лимоннокислий, магній сірчаноокислий, гліцерин, яєчна маса, малахітовий зелений, *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 прототипом. Недоліком середовища є висока вартість імпортних складових: L-аспарагіна та *mycobactin* J.

25 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити живильне середовище для виділення *M. paratuberculosis* з патологічного матеріалу, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчаноокислий, гліцерин, зелений малахітовий, яєчну масу, воду дистильовану шляхом додавання натрію піровіноградного, кислоти амінооцтової, спиртового екстракту маси *M. scrofulaceum*, при наступному співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,0-2,0 г/л
магній сірчаноокислий,	0,1-0,2 г/л
натрій піровіноградний	3,0-5,0 г/л
кислота амінооцтова	4,0-6,0 г/л
гліцерин	20,0 - 40,0 см <sup>3</sup>
зелений малахітовий, 2 % водний розчин	14,0 - 17 см <sup>3</sup>
яєчна маса	660,0 - 680,0 см <sup>3</sup>
спиртовий екстракт <i>M. scrofulaceum</i>	4,0 - 6,0 см <sup>3</sup>
	до 1000,0 см, <sup>3</sup> щоб забезпе- чити ефектив- ність живиль- ного середо- вища.
вода дистильована	

40 Живильне середовище для виділення *M. paratuberculosis* з патологічного матеріалу додатково містить спиртовий екстракт бактеріальної маси *M. scrofulaceum* - як фактор росту, натрій піровіноградний - як стимулятор росту, кислоту амінооцтову - як джерело азоту і вуглеводню.

Порівняльний аналіз запропонованого живильного середовища з прототипом дозволяє зробити висновок, що заявлений склад живильного середовища відрізняється заміною тусcobactin J на спиртовий екстракт *M.scrofulaceum*, який має такі ж властивості та заміну імпортованого L-аспарагіну на вітчизняну амінооцтову кислоту, заміну натрію лимоннокислого на натрій пірвіноградний, що не відображається на якості середовища і дозволяє виділяти збудника паратуберкульозу, що відповідає критерію "новизна". Середовище з запропонованим складом характеризується більш ростовими властивостями та збільшує кількість бактеріальної маси.

Живильне середовище готують таким чином:

Солі, гліцерин, амінооцтову кислоту розчиняють у дистильованій воді, автоклавують за режимом 1 атм. (121 °C-15 хвилин), охолоджують до кімнатної температури, додають гомогенізовану яєчну масу, вносять стерильний 2 % водний розчин малахітового зеленого, спиртовий екстракт *M.scrofulaceum*, ретельно перемішують, доводять рН до 5,8-6,0 лимонною кислотою. Середовище розливають у пробірки по 4 см<sup>3</sup> і коагулюють у вертикальному положенні за температури (89,5±0,5)°C протягом 60 хвилин.

Для отримання спиртового екстракту культуру *M.scrofulaceum* вирощують в бутлях на рідкому середовищі Сотона протягом 30-40 діб у похилому положенні за температури (37,5±0,5)°C. Через 40 діб культивування бутлі з пишною, товстою плівкою інактивують за режимом 120 °C-60 хв. Інактивовану бактеріальну масу відділяють від культуральної рідини через паперовий фільтр, промивають стерильною дистильованою водою від залишків середовища Сотона і висушують на пергаментному папері у термостаті за температури 45 °C. Після того, як бактеріальна маса висохне, її зіскрібають стерильним скальпелем з паперу в стерильну ступку і розтирають в порошок. Спиртовий екстракт з *M.scrofulaceum* готують таким чином: 20,0 г сухої бактеріальної маси 3 рази екстрагують у 100 см<sup>3</sup> етилового спирту у флаконі (колбі) за температури (97±1)°C у сушильній шафі до зменшення об'єму спирту до 1-2 см над рівнем бактеріальної маси. Отримані порції екстракту збирають піпеткою і випаровують до 4,0-6,0 см<sup>3</sup>, додають до 1000,0 см яєчного середовища. Перед висівом середовище перевіряють на стерильність шляхом витримування у термостаті за температури (37,5±0,5)°C впродовж 3 діб.

Приклад № 1. Живильне середовище готують як вказано вище, при наступному співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий	1,0 г/л
однозаміщений	
магній сірчанонокислий	0,10 г/л
натрій пірвіноградний	3,0 г/л
кислота амінооцтова	4,0 г/л
гліцерин	20,0 см <sup>3</sup>
зелений малахітовий,	14,0 см <sup>3</sup>
2 % водний розчин	
яєчна маса	660,0 см <sup>3</sup>
спиртовий екстракт	4,0 см <sup>3</sup>
<i>M.scrofulaceum</i>	
вода дистильована	до 1000,0 см. <sup>3</sup>

Приклад № 2. Теж, що і в прикладі № 1 при наступному співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий	1,50 г/л
однозаміщений	
магній сірчанонокислий	0,15 г/л
натрій пірвіноградний	4,0 г/л
кислота амінооцтова	5,0 г/л
гліцерин	30,0 см <sup>3</sup>
зелений малахітовий,	15,0 см <sup>3</sup>
2 % водний розчин	
яйця курячі	670,0 см <sup>3</sup>
спиртовий екстракт	5,0 см <sup>3</sup>
<i>M.scrofulaceum</i>	
вода дистильована	до 1000,0 см. <sup>3</sup>

Приклад № 3. Теж, що і в прикладі № 2 при наступному співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,54 г/л
магній сірчаноокислий	0,15 г/л
натрій піровіноградний	5,0 г/л
кислота амінооцтова	6,0 г/л
гліцерин,	40,0 см <sup>3</sup>
зелений малахітовий, 2 % водний розчин	16,0 см <sup>3</sup>
яєчна маса	680,0 см <sup>3</sup>
спиртовий екстракт M.scrofulaceum	6,0 см <sup>3</sup>
вода дистильована	до 1000,0 см. <sup>3</sup>

Елективні властивості живильного середовища визначають шляхом висіву контамінованого біологічного матеріалу (фекальні маси) референтним штамом M.Johneї після передпосівної обробки, за часом появи перших колоній та інтенсивності росту. Швидкість (діб.) та інтенсивність (+) росту M.Johneї на середовищі, що заявляється, і середовищі Левенштейна-Ієнсена (Л-І) з мусобастін J наведені в таблиці.

З матеріалів таблиці видно, що на запропонованому середовищі з оптимальним (приклад № 2), максимальним (приклад № 3) вмістом компонентів ріст перших колоній M.Johneї (від 1 до 3) спостерігали на 25 добу у вигляді дрібних (до 1,0 мм), білого кольору колоній. Первинний ріст колоній на середовищах з мінімальним складом компонентів (приклад № 1) і Левенштейна-Ієнсена виявляли на п'ять діб пізніше. Ріст M.Johneї на середовищі (приклад № 1) був найменш інтенсивний, після 50 діб культивування кількість колоній не перевищувала 10-20, на цьому їх ріст призупинився. Інтенсивність росту колоній на середовищах (приклад № 3) і Левенштейна-Ієнсена була однаковою, і на 50 добу спостереження кількість колоній становила від 20 до 50 і більше не зростала. Розмір колоній на середовищах з мінімальним, максимальним складом компонентів і Левенштейна-Ієнсена не перевищував 2 мм. Середовище з оптимальним вмістом компонентів (приклад № 2) забезпечувало найбільше накопичення бактеріальної маси, так на 50 добу культивування ріст колоній спостерігали по всій поверхні середовища, розмір колоній становив від 1 до 3 мм. На 90 добу окремі колонії зливалися, розросталися по горизонталі і вгору, набували складчастості.

Таким чином, запропоноване живильне середовище (приклад № 2) є оптимальним для первинної ізоляції збудника паратуберкульозу з патологічного матеріалу, має високі елективні ростові властивості, його виготовлення не потребує імпортного мусобастін J та інших дорогих компонентів.

Таблиця

Живильне середовище для виділення M. paratuberculosis

Швидкість (діб.) росту	Запропоноване середовище			Середовище Л-І з мусобастін J
	Інтенсивність росту (+)			Інтенсивність росту (+)
	Приклад № 1 (min)	Приклад № 2 (optim)	Приклад № 3 (min)	
25		+	+	-
39	+	++	+	+
40	+	+++	++	++
50	++	++++	+++	+++
60	++	++++	+++	+++
90	++	++++	+++	+++
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

Живильне середовище для виділення M. paratuberculosis з патологічного матеріалу, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчаноокислий, гліцерин, зелений малахітовий

2 % водний розчин, яєчну масу, воду дистильовану, який **відрізняється** тим, що додатково містить натрій пірвіноградний, кислоту амінооцтову, спиртовий екстракт маси *M.scrofulaceum*, при наступному співвідношенні компонентів:

калій фосфорнокислий однозаміщений	1,0-2,0 г/л
магній сірчаноокислий	0,1-0,2 г/л
натрій пірвіноградний	3,0-5,0 г/л
кислота амінооцтова	4,0-6,0 г/л
гліцерин	20,0-40,0 см <sup>3</sup>
зелений малахітовий, 2 % водний розчин	14,0-17 см <sup>3</sup>
яєчна маса	660,0-680,0 см <sup>3</sup>
спиртовий екстракт <i>M.scrofulaceum</i>	4,0-6,0 см <sup>3</sup>
вода дистильована	до 1000,0 см <sup>3</sup> .

5

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

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