



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147469

(13) U

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 07027**

(22) Дата подання заявки: **02.11.2020**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **13.05.2021**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **12.05.2021, Бюл.№ 19**

(72) Винахідник(и):

**Завгородній Андрій Іванович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Калашник Микола Васильович (UA),
Позмогова Світлана Аркадіївна (UA),
Калашник Наталія Василівна (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення живильного середовища для індикації та культивування *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* включає приготування водних розчинів солей, приготування водного розчину малахітового зеленого, змішування з водним розчином малахітового зеленого, розлив у ємності. Додатково вводять агар мікробіологічний, залізо лимонноаміачне, картоплюну муку, гідролізат казеїну, а також спиртові екстракти культур *M. phlei*, *M. scrofulaceum*.

UA 147469 U

UA 147469 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології, а саме: виготовлення живильних середовищ для індикації збудника паратуберкульозу зі зразків біологічного матеріалу, культивування збудника на живильному середовищі з подальшою диференціацією від інших представників роду *Mycobacterium*. На сьогоднішній день успішне культивування *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) на селективних живильних середовищах ґрунтується на залежності цього збудника від специфічного ферихрому - мікобактину. Цей сідерофор забезпечує зв'язування Феруму та його перехід у розчинну форму, який, у свою чергу, є незамінним мікроелементом у процесі метаболізму MAP.

Зазначена специфічна властивість використовується для таксономічної характеристики цього виду мікобактерій. Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин (МЕБ) рекомендовано використовувати живильні середовища, до складу яких входить ростовий фактор мікобактин, для культивування збудника паратуберкульозу.

Відоме середовище Герольда для виділення культур мікобактерій паратуберкульозу, яке виготовляють розчиненням інгредієнтів у дистильованій воді, їх змішуванням а саме: пептон, хлорид натрію, екстракт яловичини, гліцерин, піруват натрію, агар, мікобактин, ячні жовтки, малахітовий зелений, хлорамфенікол, та додаванням антибіотиків пеніциліну та амфотерицину В (World Organization of Animal Health (OIE). Manual diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7th ed. Vol. 2. Paris: OIE, 2012. Chapter 3.1.15, Paratuberculosis (Johne's disease); p. 544-559). Недоліком цього середовища є його непрозорість, що ускладнює виявлення первинних колоній мікобактерій на першій стадії вегетації.

Існує також живильне середовище Дюбо, яке виготовляють розчиненням інгредієнтів у дистильованій воді, їх змішуванням а саме: казамінокислоти, аспарагін, натрій фосфорнокислий двозаміщений, дигідрофосфат калію, натрій лимоннокислий, магній сірчаноокислий, гліцерин, твін 80, агар, мікобактин, сироватку крові великої рогатої худоби, та додаванням антибіотиків (пеніцилін, хлорамфенікол, амфотерицин В) (Behr M.A., Collins D.M., ed. Paratuberculosis: organism, disease, control. - Preston: MGP Books Group, 2010. - 375 p). Недоліком зазначеного середовища є його висока собівартість. Наявність антибіотиків негативно впливає на первинний ріст MAP.

Найбільш близьким аналогом є модифіковане живильне середовище Левенштейна-Йенсена (Jargensen, J.B. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet Scandinav. - 1982. - 23. - P. 325-335), яке виготовлене шляхом приготування водних розчинів солей, приготування водного розчину малахітового зеленого, приготування ячної маси, змішування водного розчину з ячною масою і водним розчином малахітового зеленого, розлив у ємності, коагуляцію, при наступному співвідношенні компонентів г/л:

калій фосфорнокислий 1-заміщений	2,4
магній сірчаноокислий	0,6
натрій лимоннокислий	0,7
2 % водний розчин малахітового зеленого	19,0
L-аспарагін	3,6
гліцерин	12,0
ячна маса	600 см ³
мікобактин	
вода дистильована	до 1000,0 см ³

Недоліком є низькі показники ростових властивостей, а також висока вартість деяких складових (мікобактин).

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виготовлення живильного середовища для індикації та культивування *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, що включає приготування водних розчинів солей, приготування водного розчину малахітового зеленого, їх змішування та розлив у ємності шляхом вилучення мікобактину і ячної маси та додаткового введення агару мікробіологічного, заліза лимонноаміачного, картопляної муки, гідролізату казеїну, а також спиртових екстрактів культур *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

L-аспарагін	2,0-8,0
натрій лимоннокислий	0,5-2,0
калій фосфорнокислий двозаміщений	0,25-1,0
магній сірчаноокислий	0,25-1,0

семиводний	
залізо лимонноаміачне	0,025-0,1
агар мікробіологічний	17,0-25,0
картопляна мука	18,5-50,0
гідролізат казеїну	2,5-8,0
гліцерин	50,0-65,0
	см ³
2,0 % водний розчин	18,0-22,0
малахітового зеленого	см ³
спиртовий екстракт культури	1,25-5,0 см ³
M. phlei	
спиртовий екстракт культури	1,25-5,0 см ³
M. scrofulaceum	
вода дистильована	до 1000
	см ³ .

Порівняльний аналіз способу виготовлення живильного середовища, що пропонується, із близьким аналогом дозволяє зробити висновок про те, що живильне середовище потребує менше затрат на його приготування так, як вилучений дороговартісний компонент мікобактин, вилучена яєчна маса та додатково введені спиртові екстракти культур M. phlei, M. scrofulaceum, залізо лимонноаміачне - есенціальний фактор росту MAP, картопляна мука - джерело азоту, вуглеводи і мікроелементи та гідролізат казеїну - джерела білка для живлення мікобактерій, що підвищує адаптивні властивості та вегетацію збудника MAP, прискорює появу первинного росту колоній мікобактерій та забезпечує достатнє накопичення бактеріальної маси, що і відповідає критерію "новизна".

Живильне середовище готують таким чином: наважки сухих компонентів розчиняють в об'ємі 800 см³ дистильованої води в такій послідовності: L-аспарагін, натрій лимоннокислий, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий семиводний, залізо лимонноаміачне та гідролізат казеїну. Отриманий сольовий розчин фільтрують через ватно-марлевий фільтр. Після цього додають картопляну муку, гліцерин, 2,0 % водний розчин малахітового зеленого. Доводять рН до значення 6,9±0,1 розчином 0,1 N їдкого натру або 10,0 % розчином лимонної кислоти. Додають агар мікробіологічний, ретельно перемішують та кип'ятять впродовж 3-5 хвилин до повного рівномірного розчинення агару. Додають спиртові екстракти культур M. phlei та M. scrofulaceum. Кінцевий об'єм середовища доводять до 1000,0 см³ дистильованою водою.

Живильне середовище ретельно перемішують та розливають по 4,0-4,5 см³ у стерильні бактеріологічні пробірки з гвинтовими герметичними кришками та автоклавують за режиму 121 °С впродовж 15 хвилин. Після автоклавування пробірки з живильним середовищем розміщують у скошені штативи під кутом 45° та залишають у такому положенні до повного його застигання.

Виготовлене середовище перевіряють на стерильність за температури 37±0,5 °С у термостаті впродовж 3 діб. Зберігають середовище за температури 4-8 °С впродовж 3 місяців.

Приклад 1. Живильне середовище готують за наведеною схемою при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

L-аспарагін	2,0
натрій лимоннокислий	0,5
калій фосфорнокислий	0,25
двозаміщений	
магній сірчанокислий	0,25
семиводний	
залізо лимонноаміачне	0,025
агар мікробіологічний	17,0
картопляна мука	18,5
гідролізат казеїну	2,5
гліцерин	50,0 см ³
2,0 % водний розчин	18,0 см ³
малахітового зеленого	
спиртовий екстракт культури	1,25 см ³
M. phlei	

спиртовий екстракт культури 1,25 см³
M. scrofulaceum
 вода дистильована до 1000см³.

Приклад 2. Теж, що в прикладі 1 при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

L-аспарагін 4,0
 натрій лимоннокислий 1,0
 калій фосфорнокислий 0,5
 двозаміщений
 магній сірчанонокислий 0,5
 семиводний
 залізо лимонноаміачне 0,05
 агар мікробіологічний 20,0
 картопляна мука 37,0
 гідролізат казеїну 5,0
 гліцерин 60,0 см³
 2,0 % водний розчин
 малахітового зеленого 20,0 см³
 спиртовий екстракт культури
M. phlei 2,5 см³
 спиртовий екстракт культури
M. scrofulaceum 2,5 см³
 вода дистильована до 1000
 см³.

Приклад 3. Теж, що в прикладі 1 та 2 при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

5

L-аспарагін 8,0
 натрій лимоннокислий 2,0
 калій фосфорнокислий 1,0
 двозаміщений
 магній сірчанонокислий 1,0
 семиводний
 залізо лимонноаміачне 0,1
 агар мікробіологічний 25,0
 картопляна мука 50,0
 гідролізат казеїну 8,0
 гліцерин 65,0 см³
 2,0 % водний розчин 22,0 см³
 малахітового зеленого
 спиртовий екстракт культури
M. phlei 5,0 см³
 спиртовий екстракт культури
M. scrofulaceum 5,0 см³
 вода дистильована до 100 см³.

Елективні властивості живильного середовища визначають за швидкістю появи первинного росту та інтенсивністю росту колоній мікобактерій шляхом висіву суспензії біологічного матеріалу від великої рогатої худоби, попередньо контамінованого референтною культурою *M. Johnei*. Результати вивчення ростових властивостей мікобактерій (швидкість та інтенсивність росту колоній MAP) на живильних середовищах наведені в таблиці.

10

Із матеріалів таблиці видно, що на запропонованому середовищі (приклад № 2) первинний ріст колоній збудника MAP спостерігали на 12 добу культивування у вигляді поодиноких колоній (від 1 до 8) сферичної форми, розміром від 0,5 мм до 1,0 мм у діаметрі, білого кольору. На 20-25 добу культивування відмічали збільшення кількості колоній та інтенсивності їх росту (від 28 до 30), тоді як на середовищі (приклад № 3) первинний ріст поодиноких колоній (від 1 до 3) відмічали тільки на 25 добу культивування. На середовищі з найменшою концентрацією складових компонентів (приклад № 1) та на середовищі Левенштейна-Йенсена первинний ріст колоній було виявлено на 25 добу. Інтенсивність росту колоній MAP на середовищі (приклад № 1) та середовищі Левенштейна-Йенсена була у межах від 1 до 10 колоній мікобактерій

15

20

впродовж усього терміну спостереження. Разом з цим, на 30 добу спостереження на середовищі (приклад № 2) відмічали ріст колоній MAP на всій поверхні середовища у вигляді поодиноких колоній розміром від 2,0 мм до 4,0 мм, а деякі з них зливались між собою та мали нерівну бугристу поверхню білого кольору. На середовищі (приклад № 1,3) та на середовищі Левенштейна-Йенсена впродовж 30 діб культивування відмічали рідкий нестабільний ріст колоній MAP, колонії MAP були дрібними.

Таким чином, запропоноване живильне середовище, виготовлене таким способом (приклад № 2) є оптимальним для первинної індикації MAP і забезпечує накопичення достатньої кількості бактеріальної маси збудника паратуберкульозу, має високі ростові властивості та має невисоку вартість виробництва. Середовище може застосовуватись у роботі лабораторій ветеринарної медицини з метою встановлення первинного діагнозу на паратуберкульоз, а також з метою вивчення у виділених польових ізолятів мікобактерій тинкторіальних, культурально-морфологічних, біологічних та біохімічних властивостей.

Спосіб виготовлення середовища для індикації та культивування *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

Показники	Запропоноване середовище															Середовище Левенштейна- Йенсена				
	приклад 1					приклад 2					приклад 3									
	термін культивування, діб																			
	12	15	20	25	30	12	15	20	25	30	12	15	20	25	30	12	15	20	25	30
Інтенсивність росту колоній	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+

Примітки:

1. «-» - відсутність росту колоній; 2. «+» - ріст від 1 до 10 колоній; 3. «++» - ріст від 10 до 20 колоній; 4. «+++» - ріст від 20 до 50 колоній; 5. «++++» - суцільний ріст колоній ($n > 50$); 6. «*» - $p < 0,001$ у порівнянні з прототипом.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення живильного середовища для індикації та культивування *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, що включає приготування водних розчинів солей, приготування водного розчину малахітового зеленого, змішування з водним розчином малахітового зеленого, розлив у ємності, який **відрізняється** тим, що додатково вводять агар мікробіологічний, залізо лимонноаміачне, картопляну муку, гідролізат казеїну, а також спиртові екстракти культур *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, при наступному співвідношенні компонентів, г/л:

L-аспарагін	2,0-8,0
натрій лимоннокислий	0,5-2,0
калій фосфорнокислий	
двозаміщений	0,25-1,0
магній сірчаноокислий	
семиводний	0,25-1,0
залізо лимонноаміачне	0,025-0,1
агар мікробіологічний	17,0-25,0
картопляна мука	18,5-50,0
гідролізат казеїну	2,5-8,0
гліцерин	50,0-65,0 см ³
2,0 % водний розчин малахітового зеленого	18,0-22,0 см ³
спиртовий екстракт культури <i>M. phlei</i>	1,25-5,0 см ³
спиртовий екстракт культури <i>M. scrofulaceum</i>	1,25-5,0 см ³
вода дистильована	до 1000 см ³ .

