(19) **KG** (11) **89** (13) **C1**

(51)[5] **C12N 1/20**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(21) 950129.1
(22) 06.04.1995
(46) 01.01.1996, Бюл. №4, 1996
(71) Республиканская санитарно-эпидемиологическая станция (РСЭС), (KG)
(72) (73) Омуралиев К.Т., Похнатюк Л.Ю., (KG)
(56) Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. - М., 1982, с. 60.

(54) **Питательная среда для культивирования бактерий кишечной группы**

(57) Изобретение относится к медицинской микробиологии, биотехнологии и касается питательных сред для культивирования и накопления бактерий кишечной группы при проведении бактериологической диагностики сальмонелл и шигелл. Заявляемая среда, обладая высокими ростовыми свойствами, более чем в 25 раз, ниже по стоимости известных в этой области питательных сред, т.к. готовится на общедоступных местных дешевых ингредиентах. В заявляемую среду входят следующие компоненты, г/л: дрожжи пекарные - 35-45; натрий хлористый, хч - 18-22; 0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого - 9.6-10; дистиллированная вода - до 1 л. 4 табл., 1 пр.

Изобретение относится к медицинской микробиологии, биотехнологии и может быть использовано для приготовления питательных сред для культивирования бактерий кишечной группы при проведении бактериологической диагностики сальмонелл и шигелл.

Известна питательная среда для культивирования микроорганизмов кишечной группы - селенитовая.

Существует 2 варианта состава селенитовой среды. Один из этих составов (коммерческая сухая среда), выпускаемая НИИ питательных сред (г.Махачкала), содержит в %:

- однозамещенный кислый селенисто - кислый натрий	0.4
- пептон	0.5
- натрий фосфорно-кислый двузамещенный (безводный)	0.7
- натрий фосфорно-кислый однозамещенный (безводный)	0.3

- лактозу химически чистую 0.4
- дистиллированную воду 100

Данная среда имеет несколько недостатков:

1. Среда многокомпонентна, при этом се компоненты, например, однозамещенный кислый селенисто-кислый натрий не производится не только в нашей республике, но и на территории СНГ, т.е. он должен закупаться за валюту в дальнем зарубежье. Остальные компоненты выпускаются в республиках ближнего зарубежья, но все равно они труднодоступны.

2. Большим недостатком известной среды является ее токсичность при изготовлении и работе с ней, т.к. кислый селенисто-кислый натрий относится к токсичным веществам (Статья 164 КЗОТ ССР и письмо МЗ СССР от 4.12.69 г. № 02-14/59. Медицинские показания утверждены 22.05.69 г.).

3. Существенным недостатком известной среды является жесткий лимит времени работы с готовой средой, т.к. диагностический посевной материал сохраняется в ней в течение 24 ч, а затем микроорганизмы подвергаются лизису, а сама среда становится непригодной из-за диссоциации исходных компонентов.

Это обстоятельство диктует условие приготовления среды строго перед внесением в нее исследуемого материала, т.к. готовая среда из-за вышеназванных причин, не может храниться больше одних суток. При необходимости уточнения микробиологической диагностики, определения лекарственной чувствительности возбудителя становится обязательным через сутки провести пересев для сохранения жизнеспособности бактериологического материала. Упомянутые свойства селенитовой среды делают ее неприемлемой для транспортировки диагностических проб из отдаленных горных районов.

4. К недостаткам среды следует отнести и экономический аргумент. Высокая стоимость среды, расходы на ее транспортировку, делают бактериологические исследования на селенитовой среде дорогостоящими, а если учесть, что 60 % исследований занимает бакдиагностика кишечных возбудителей инфекции, то в настоящей экономической ситуации эти исследования становятся невыполнимыми. Так, на 1.01.95 г. стоимость 1 кг среды, включая транспортные расходы, составила 126 сомов. Потребность баклабораторий республики - 400 кг селенитовой среды в год, т.е. только закупка селенитовой среды обходится в 50400 сомов.

Задача изобретения - упрощение компонентного состава среды, удешевление ее за счет введения в нее широкодоступных дешевых компонентов, сохранение и потенцирование жизнеспособности патогенных бактерий кишечной группы при длительном хранении и транспортировке диагностического материала при условии идентичности ростовых свойств среды по сравнению с прототипом.

Заявляемая среда содержит, г/л:

Дрожжи пекарные	35-45
Натрий хлористый	18-22
0.1 % водный раствор бриллиантовый зеленый	9.6-10
Дистиллированная вода	до 1 л.

Готовая заявляемая среда является полноценной питательной средой и имеет все необходимые элементы для обеспечения активного роста бактерий кишечной группы. Из литературы известен минимум аминокислот, витаминов и др. элементов, обязательных и необходимых для жизнедеятельности бактерий кишечной группы, таблица 1 приводит сравнительные данные об известном минимуме питательного и витаминного состава и о фактическом содержании идентичных элементов в заявляемой среде. Как видно из таблицы 1, аминокислотный и витаминный состав заявляемой среды в количественном отношении перекрывает по многим элементам известный необходимый минимум. Эта таблица является также обоснованным доказательством полноценности питательной основы заявляемой среды для культивирования бактерий кишечной группы.

Проведено изучение влияния заявляемой среды на морфологические и дифференцирующие свойства бактерий кишечной группы. Результаты исследований приведены в таблице 2. Исследования проводились следующим образом.

Тест-культуры Sh. Sonnei, S.typhimurium, как наиболее типичных представителей бактерий кишечной группы, брали из числа депонированных из института им. Л.О.. Тарасевича (г. Москва). Пробы для посева тест-культур готовили стандартным методом. В заявляемую среду вносили микробную взвесь суточных тест-культур после серийных десятикратных разведений из расчета 10^6 микробных клеток в 1 мл взвеси.

Посевы термостатировали 24 ч при 37°. Затем 0.1 мл выросшего материала переносили на плотную среду Эндо для последующей идентификации бактерий.

Как показали исследования, бактерии кишечной группы Sh.Sonnei, S.typhimurium сохраняют типичные морфологические, культурно-биохимические и агглютинирующие свойства после высева на заявляемую среду.

Кроме того, были проведены испытания ростовых свойств заявляемой среды в сравнении с известной селенитовой средой в росписи по Справочнику (известный объект) и коммерческой сухой средой (базовый объект, г. Махачкала, НИИ питательных сред). Результаты испытаний приведены в таблице 3. Для приготовления микробных взвесей суточные культуры тест-микробов смывали 0.9 % физиологическим раствором, доводили взвесь до содержания 1 млрд./мл микробных клеток по оптическому стандарту мутности, затем серийными десятикратными разведениями доводили до содержания 1 тыс. (10^6) и 100 (10^7) микробных клеток в 1 мл взвеси. Из разведения 10^6 и 10^7 взвеси каждой тест-культуры высевали по 0.2 мл в заявляемую среду и среды по прототипу. Учет результатов проводили через 1 сут (24 ч), 2, 3, 5, 7 сут, а затем через каждые 5 дней до 30 дня хранения посевного бакматериала на испытуемых средах. Кроме анализа выросших колоний патогенных тест-культур был проведен контроль пророста посторонней микрофлоры, который показал отсутствие банальной микрофлоры, т.е. это служит доказательством достаточности де контаминации среды присутствующим в заявляемой среде 0.1 % водного раствора бриллиантового зеленого.

Результаты испытаний, (таблица 3) показывают, что заявляемая среда не уступает по ростовым качествам лучшей в области бакисследоваиий селенитовой среде после 24 ч инкубации. Но в отличие от последней, заявляемая среда сохраняет полноценную жизнеспособность бактериологического материала в течение 30 сут, в то время как на селенитовой среде прекращается рост тест-культур на 2 сут; сама среда становится непригодной для дальнейшего использования из-за ее диссоциации. Уже через 30 ч инкубации пересев бакматериала с селенитовой среды на свежеприготовленную не дает роста, что дает основание утверждать о полной гибели посевного материала бактерий на селенитовой среде на 2-е сут хранения. Именно с этой точки зрения ростовые свойства заявляемой среды гораздо выше известных.

Присутствие химически чистого натрия хлористого необходимо для сохранения pH=7, требуемого осмотического давления среды и для обеспечения клеток нужными неорганическими элементами.

Дистиллированная вода необходима для поддержания нейтральной реакции среды и устранения возможности внесения посторонних солей и ионов тяжелых металлов, которые могут попасть с водопроводной водой, и которые токсичны для клеток.

Среда готовится на широкодоступных исходных компонентах, производимых на территории республики. Технология изготовления проста, вследствие чего она доступна любой баклаборатории. Стоимость 1 кг среды 5 сомов, что в 25 раз дешевле базовой селенитовой среды.

Важным является наличие высоких ростовых показателей заявляемой среды, длительное потенцирование жизнеспособности посевного бакматериала, отсутствие диссоциации в течение 30 дней, ее дешевизна и доступность.

Среда готовится следующим образом. Дрожжи пекарные, натрий хлористый (химически чистый). 0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого в количестве, предусмотренном формулой изобретения, помещают в емкость, например, в колбу, заливают дистиллированной водой и выдерживают в термостате при температуре 58°-60°

в течение 2 сут. По мере разжижения дрожжей емкость встряхивают 1-2 раза в сут для равномерного прогревания содержимого. Готовая среда имеет однородную жидкую консистенцию голубовато-зеленого цвета, запах пекарных дрожжей. Через 2 сут в питательной среде устанавливают pH=7, разливают в стерильные флаконы требуемого объема и подвергают стерилизации в автоклаве при температуре 115° в течение 15 мин. После стерилизации среда готова к использованию для культивирования (накопления) бактерий кишечной группы - сальмонелл, шигелл.

Посевной бактериологический материал вносится в среду известным методом, инкубируется в термостате при 37° в течение 24 ч. Высев из среды накопления производится на твердые среды Плоскирева, Эндо, висмут-сульфитный агар бактериологической петлей с последующей суточной инкубацией и идентификацией.

Ниже приводится пример конкретного выполнения культивирования патогенных тест-культур кишечной группы с оптимальными и граничными концентрациями компонентов для иллюстрации ростовых свойств образцов.

Пример 1. Среда готовится, как указано выше.

Образец 1 имеет оптимальную концентрацию компонентов, г/л:

Дрожжи пекарные ГОСТ 171-69	40
Натрий хлористый, хч	20
0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого	10
Дистиллированная вода	до 1 л

Образец 2 - имеет граничные с Образцом 1 минимальные концентрации компонентов, г/л:

Дрожжи пекарные ГОСТ 171-69	35
Натрий хлористый, хч	18
0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого	9.6
Дистиллированная вода	до 1 л

Образец 3 - имеет граничные с Образцом 1 максимальные концентрации компонентов, ч/л:

Дрожжи пекарные ГОСТ 171-69	45
Натрий хлористый, хч	22
0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого	10
Дистиллированная вода	до 1 л

Подготовку и посев патогенных тест-культур бактерий кишечной группы проводили как описано выше. Учет результатов делали к концу 1 сут, затем на 2, 5, 10, 15 и 30 сут после посева "бактериологического материала. Результаты прироста биомассы тест-культур представлены в таблице 4. Выход биомассы после посева на образцы 1-3 заявляемой среды и на селенитовую среду (прототип) показывает, что ростовые качества заявляемой среды во всех образцах идентичны среде по прототипу после первых 24 ч инкубации, но уже со 2 сут видно преимущество заявляемой среды, на которой выросшая биомасса тест-культур сохраняет свою жизнеспособность до 30 сут.

Использование предлагаемой среды делает возможным длительное потенцирование посевного бактериологического материала для диагностики и определения лекарственной чувствительности возбудителей кишечных инфекций, сократить материальные затраты на исследования, сделать се широкодоступной.

Таблица 1

Аминокислотный и витаминный состав заявляемой среды

Элементы среды	Минимальная концентрация аминокислот и витаминов для обеспечения роста сальмонелл и шигелл (по Козеру и Райту)	Фактическое содержание аминокислот и витаминов в заявляемой среде
Витамины		
Биотип	0.000001	0.0012
Гиомин	0.00001	0.024
Рибофлавин	0.0005	0.03
Ниацин	0.001	0.056
Незаменимые и заменимые аминокислоты		
Глутаминовая кислота	50	62.8
Глицин	20	16.6
Лизин	20	36.5
Валин	10	27.9
Лейцин	10	36.2
Фенилаланин	10	19.8
Пролин	10	19.7
Метионин	10	9.3
Аргинин	10	11.8
Аспарагиновая кислота	3	27.4
Белок	0.5 %	0.508 %
Глюкоза	200	-

Таблица 2

Оценка влияния заявляемой среды на морфологические и дифференцирующие показатели тест-культур бактерий кишечной группы

Основные показатели тест-культур	Контрольные тест-культуры	Тест-культуры после 24 часовой инкубации на заявляемой среде

Sh. Sonnei		
Температура роста	37°C	37°C
Продолжителыюсть роста	24 ч	24 ч
Окраска по Граму	Грам +	Грам +
Подвижность бактерий	Неподвижны	Неподвижны
Биохимические свойства:	Лактоза - без изменен. Глюкоза - изменен. Манит - изменен. Сахароза - без изменен. H_2S - нет	Типичные
Агглютинация с поливалентной сывороткой ФНЗ	Дает агглютин с Sh. Sonnei	Типичная
Форма колоний	S - *форма*	S - форма
Цвет колоний	Прозрачный, бесцветный	Прозрачный, бесцветный
S. typhimurium		
Температура роста	37°C	37°C
Продолжительность роста	24 ч	24 ч
Окраска по Граму	Грам +	Грам +
Подвижность бактерий	Подвижны	Подвижны
Биохимические свойства:	Лактоза - без изменен. Глюкоза - изменен., газ Манит - изменен., газ Сахароза - без изменен. H_2S - +, есть	Типичные
Агглютинация с поливалентной сывороткой АБСДЕ	Дает агглютинац. с 0-4, Н-i, АБСДЕ	Типичная
Форма колоний	S - форма	S - форма
Цвет колоний	полупрозрачные, розовые	полупрозрачные, розовые

Таблица 3

Ростовые показатели сред по выходу биомассы тест-культур
Сравнительная характеристика ростовых свойств сред (по примеру)

Среда	Тест-культура	Выход биомассы тест-культур, сутки									
		1	2	3	5	7	11	15	20	25	30
Заявля-	E.coli	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8	10^8	10^8
емая	S. typhimurium	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8	10^8	10^8

	S. typhi	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8	10^8	10^8
	Sh. flexneri	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8	10^8	10^8
	Sh. Sonnei	10^8	10^9	10"	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8	10^8	10^8
Селени-	E.coli	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
товая	S. typlrimurium	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(известный	S. typhi	10^s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
объект)	Sh. flexneri	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sh. Sonnei	10^s									
Селенито-	E.coli	10^s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
вая	S. typhimurium	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(базовый	S. typhi	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
объект)	Sh. flexneri	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sh. Sonnei	10^8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 4

Среда	Компоненты заявляемой среды, г/л				Тест-культура	Чувствительность среды к росту тест-культур					
	Дрожжи пекари.	NaCl	0.1 % водный р-р брил. зеленого	Дистил. вода		1	2	5	10	15	30
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Заявляе-	40	20	10	до 1 л	E.coli	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
мая					S. typhimurium	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
Образец 1					S. typhi	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. flexneri	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. Sonnei	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
Образец 2	35	18	9.6	до 1 *л*	E.coli	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					S. typhimurium	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					S. typhi	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. flexneri	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. Sonnei	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Образец 3	45	22	10	до 1 л	E.coli	10^s	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					S. typhimurium	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					S. typhi	10^s	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. flexneri	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8
					Sh. Sonnei	10^8	10^9	10^9	10^9	10^9	10^8

Среда по прототипу - селенитовая					E.coli	10^8	-	-	-	-	-
					S. typhimurium	10^8	-	-	-	-	-
					S. typhi	10^8	-	-	-	-	-
					Sh. flexneri	10^8	-	-	-	-	-
					Sh. Sonnei	10^8	-	-	-	-	-

Формула изобретения

Питательная среда для культивирования бактерий кишечной группы, содержащая питательную основу, минеральные соли, деконтаминант и дистиллированную воду, о т л и ч а ю щ а я с я тем, что в качестве питательной основы она содержит дрожжи пекарные, в качестве деконтаминанта - 0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого при следующем количественном соотношении компонентов, г/л:

Дрожжи пекарные	35 - 45
Натрий хлористый, хч	18 – 22
0.1 % водный раствор бриллиантового зеленого	9.6 - 10
Дистиллированная вода	до 1 л.

Составитель описания Эралиев Дж.С.
Ответственный за выпуск Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03