



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104386** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61K 35/00
C12Q 1/04 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 07437	(72) Винахідник(и): Бабкіна Марія Михайлівна (UA), Тарасов Олександр Анатолійович (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.07.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.01.2016	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2016, Бюл.№ 2	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ АНТИБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб визначення антибактеріальної активності антибіотиків (антибактеріальних препаратів), що включає засів живильного середовища стандартною суспензією тестового мікроорганізму, інкубацію та облік результатів за ознаками росту, згідно з корисною моделлю, стандартизацію тестового мікроорганізму проводять в ізотонічному розчині натрію хлориду концентрації $1,5 \times 10^8$ мікробних тіл в 1 мл та вносять у лунки планшета, додають розчин антибіотиків (антибактеріальних препаратів) та після інкубації визначають антибіотикочутливість методом серійних мікророзведень за ознаками росту тестового мікроорганізму у лунках планшета.

UA 104386 U

Винахід належить до ветеринарної медицини, точніше - до мікробіології, і призначений для визначення ступеня антибактеріальної активності антибіотиків (антибактеріальних препаратів).

У ветеринарній медицині, зокрема у мікробіології, проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів та спосіб визначення чутливості для діагностики, оцінки ефективності лікування та прогнозування при лікуванні має дуже важливе значення.

Зазвичай антибактеріальну активність антибіотиків оцінюють за наявністю видимого росту тестового мікроорганізму [1].

Так, відомий спосіб визначення антибактеріальної активності, в якому використовують визначення антибактеріальної активності хімічної сполуки [2]. Результати такого дослідження дозволяють судити про стан неспецифічної резистентності, але одним із недоліків є відсутність чітких кількісних критеріїв, які б можна було використовувати з метою кількісного прогнозу та діагностики.

Найбільш близьким до даного способу (прототипом) є спосіб визначення антимікробної активності ефірних олій шляхом використання лунков в агарі з наступним засівом живильного середовища тестовим мікроорганізмом з інкубацією у відповідних умовах [3]. Облік результатів проводять за наявністю чи відсутністю ознак видимого росту тестового мікроорганізму. При цьому за мінімальну інгібуючу концентрацію ефірних олій приймають те найбільше розведення у живильному середовищі, яке затримує ріст мікроорганізму.

Суттєвими недоліками прототипу є його трудомісткість, громіздкість, відсутність чітких критеріїв для визначення ступеня антибактеріальної активності, дифузія антибіотика (антибактеріального препарату) в агар, що може впливати на об'єктивність результатів.

Винахід вирішує задачу визначення об'єктивних показників ступеня антибактеріальної активності антибіотиків (антибактеріальних препаратів) більш об'єктивним способом. Перевагами корисної моделі є економія витратних матеріалів та часу дослідження, відсутність дифузії в агар антибіотика (антибактеріального препарату), можливість одночасної постановки великої кількості зразків та вдала візуальна порівнюваність результатів.

Технічний результат від використання корисної моделі полягає в значному підвищенні об'єктивності і точності за рахунок використання більш об'єктивних результатів визначення антибіотикочутливості.

Вирішення здійснюється таким чином, що у даному способі використовується визначення чутливості до антибіотиків методом серійних мікророзведень.

Згідно з корисною моделлю, живильне середовище змішують із стандартною суспензією тестового мікроорганізму у концентрації $1,5 \times 10^8$ мікробних тіл в 1 мл у живильному середовищі й розливають його у лунки стандартного 96-лункового плоскодонного планшета у кількості 230 мкл на одну лунку. Потім вносять 10 мкл антибіотика (антибактеріального препарату) із відомою концентрацією. Ступінь антибактеріальної активності досліджуваного антибіотика визначають після інкубації при 36.7 ± 0.3 °C в залежності від наявності росту тестового мікроорганізму у лунці планшета.

Спосіб здійснюється таким чином:

На планшеті робиться розведення антибіотичної речовини (антибактеріального препарату) до необхідної концентрації. Попередньо, за стандартною методикою готують живильне середовище, яке вносять у лунки стандартного 96-лункового плоскодонного планшета. Також у лунки вносять суспензію тестового мікроорганізму з концентрацією $1,5 \times 10^8$ мікробних тіл у 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Така концентрація мікробних тіл є стандартною для мікробіологічних досліджень. Планшети з живильним середовищем, тестовим мікроорганізмом та антибіотиком (антибактеріальним препаратом) інкубують при 36.7 ± 0.3 °C протягом 22 ± 2 годин. Результати оцінюють шляхом наявності або відсутності росту тестового мікроорганізму у лунці планшета. Відсутність росту тестового мікроорганізму свідчить про антибактеріальну дію антибіотика (антибактеріального препарату) у досліджуваній концентрації.

Приклад. Визначення чутливості мікрофлори, виділеної із зразка біологічного матеріалу (сперми кнура від відгодівельного комплексу) до антимікробних речовин із застосуванням запропонованого методу.

Для дослідження використовували МПБ. У 2 пробірки з 5 мл середовища МПБ робили бактеріологічний посів сперми від кнура. Після того, як концентрація мікробних клітин досягла значення приблизно $1,5 \times 10^8$ мікробних тіл у 1 мл у живильному середовищі, робили визначення антибіотикочутливості.

Дослід проводили у планшетах в об'ємі 0,25 мл. Поживне середовище вносили по 0,18 мл у кожен лунку планшета. Робили 4 розведення антибіотика.

Робочий розчин виготовляли із основного додаванням розчинника. Для цього робочий розчину кількості 0,01 мл переносили у лунку з 0,09 мл розчинника. Ретельно перемішували

вміст лунки. Далі з цієї лунки 0,01 мл переносили у наступну лунку з 0,09 мл розчинника. Цю процедуру повторювали 4 рази. Таким чином отримували ряд лунок планшета з розчинами антибіотика, концентрації якого відрізняються у 10 разів. Один ряд планшета із бульйоном та культурою мікроорганізмів залишали як негативний контроль, ще один ряд із чистим бульйоном - як позитивний.

Після цього планшети закривали кришками, робили маркування (дата, культура, який антибіотик та ін.).

Порядок внесення компонентів:

1. Живильне середовище (бульйон) - 0,18 мл
2. Культура мікроорганізмів - 0,05 мл
3. Антибіотик - 0,01 мл

Після проведення дослідів планшети інкубували у термостаті за температури 36.7 ± 0.3 °C протягом 20 ± 2 години.

Облік результатів проводили візуально, порівнюючи ріст мікроорганізмів у присутності антибіотика з ростом культури у лунках без антибіотика.

У лунках із чистим бульйоном, бульйон залишився прозорим в усіх лунках. У лунках із бульйоном та культурою був ріст мікроорганізму в усіх лунках. У лунках із бульйоном, культурою та антибіотиком бульйон був прозорим, що свідчить про дію антибіотика.

За мінімальну інгібуючу концентрацію приймають мінімальну концентрацію антибіотика, яка забезпечує повне пригнічення видимого росту культури мікроорганізму.

Отримані дані свідчать про ефективність запропонованого способу як в діагностичному аспекті, а також для оптимізації антибіотикотерапії.

Джерела інформації:

1. Методические указания МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: утв. Гл. гос. санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г. - Москва, 2004-5 с.

2. 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-3-(N-бензилпіролідиній)-2-пропанолу хлорид: деклараційний патент а 201205411 Україна, МПК C07D207/08, A61K31/40 / Ю.В. Короткий, І.О. Вринчану, Н.В. Вринчану, О.А. Сметренко. - № 103381 С2; заявл. 03.05.2012, опубл. 25.11. 2013, Бюл.№22. - 5 с.

3. Спосіб визначення антимікробної активності ефірних олій: декларац. пат. 2002187863 Україна, МПК 7 A61K35/78. / Г.В.Бородна, Т.В.Проценко, Ю.І.Ніколенко. - № 60475 А; заявл. 03.10.2002, опубл. 15.10.2003, Бюл. №10.-2 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення антибактеріальної активності антибіотиків (антибактеріальних препаратів), що включає засів живильного середовища стандартною суспензією тестового мікроорганізму, інкубацію та облік результатів за ознаками росту, який відрізняється тим, що стандартизацію тестового мікроорганізму проводять в ізотонічному розчині натрію хлориду концентрації $1,5 \times 10^8$ мікробних тіл в 1 мл та вносять у лунки планшета, додають розчин антибіотиків (антибактеріальних препаратів) та після інкубації визначають антибіотикочутливість методом серійних мікророзведень за ознаками росту тестового мікроорганізму у лунках планшета.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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