



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114561**

(13) **U**

(51) МПК

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12R 1/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 09813**

(22) Дата подання заявки: **23.09.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.03.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.03.2017, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Тарасюк Олександра Олександрівна
(UA),
Мотика Олена Ігорівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ЛЬВІВСЬКИЙ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МОЗ
УКРАЇНИ",
вул. Зелена, 12, м. Львів, 79005 (UA)**

(74) Представник:

Буцяк Ганна Андріївна

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ДО
АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ**

(57) Реферат:

Спосіб визначення чутливості *Corynebacterium diphtheriae* до антибактеріальних препаратів на базі стандартного диско-дифузійного методу. Крім цього при постановці антибіотикограм бактеріальну суспензію для інокуляції щільного поживного середовища, яка відповідає оптичній густині 0,5 одиниць стандарту мутності McFarland, перед нанесенням на поверхню середовища розводять втричі.

UA 114561 U

Об'єкт: вдосконалений спосіб визначення чутливості *Corynebacterium diphtheriae* до антибіотиків шляхом модифікації диско-дифузійного методу.

Корисна модель належить до медичної мікробіології, а саме способів визначення чутливості бактерій до антибіотиків, і може бути використана при лабораторних дослідженнях штамів *C. diphtheriae* та для планування раціональної антибіотикотерапії всіх форм дифтерійної інфекції.

Стандартизація методів визначення чутливості збудників інфекційних захворювань до антимікробних препаратів на сьогодні є одним з найбільш важливих питань лабораторної діагностики. Визначення антибіотикочутливості патогенних мікроорганізмів в лабораторній практиці найчастіше проводять за допомогою методу паперових дисків (диско-дифузійного), який дозволяє визначати чутливість одночасно до багатьох препаратів, є суттєво простішим та дешевшим у застосуванні в порівнянні з іншими методами. Однак, методика постановки антибіотикограм диско-дифузійним методом, особливо мікроорганізмів із складними поживними потребами, все ще вимагає доопрацювання. Відомо, що одним із найбільш важливих чинників, які визначають остаточний результат, є концентрація бактеріальної суспензії бактерій для інокуляції чашок з поживним середовищем (інокулюмом).

Аналіз методичних документів, в яких описано техніку визначення антибіотикочутливості диско-дифузійним методом показав, що пропонуються виготовлення суспензії та різні посівні дози для постановки антибіотикограм. Чинні в Україні методичні вказівки не містять опису окремої методики визначення антибіотикочутливості для коринебактерій [МВ 9.9.5-143-2007 "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів". Методичні вказівки. Затверджені Наказом МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р. - [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <http://document.ua/viznachennja-chutlivosti-mikroorganizmiv-do-antibakterialnih-nor17545.html>]. Для всіх мікроорганізмів при тестуванні чутливості диско-дифузійним методом пропонується однакова (крім окремо зазначених випадків) величина інокулюму, яка відповідає стандарту мутності МакФарланда 0,5 одиниць; засів середовища проводиться даною бактеріальною суспензією без розведення. До введення в дію методичних вказівок МВ 9.9.5-143-2007 діяли нормативні документи, які регламентували для диско-дифузійного методу дві різні концентрації бактеріальної суспензії, в залежності від середовища [Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков: методические указания МЗ СССР № 2675-83 от 10.03.1983; Инструкция по применению дисков для определения чувствительности к антибиотикам: утверждена МЗ СССР 12.10.1984 г.]. Для застосування на середовищі агар Гівенталя-Вед'євської (АГВ) бактеріальну суспензію виготовляли за стандартом ДІСК ім. Тарасевича на 5 одиниць мутності, що для *C. diphtheriae* це відповідає приблизно 5×10^7 - 10^8 колонієутворюючих одиниць (КУО)/мл. Для щільного поживного середовища № 2 застосовували суспензію вдвічі більшої оптичної густини, яку виготовляли за стандартом 10 одиниць. Перед нанесенням на поверхню агару (не залежно від середовища) інокулюм розводили в 10 разів.

Широко використовувані в світі стандарти Інституту лабораторних клінічних стандартів (Clinical Laboratory Standard Institute, CLSI) США [Clinical and Laboratory Standards institute. 2006. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated of fastidious bacteria; proposed guideline. Vol. 25, № 26. CLSI document M45-P. Clinical and Laboratory Standards institute, Wayne, PA] пропонують визначати чутливість бактерій роду *Corynebacterium* (в т. ч. *C. diphtheriae*) лише за допомогою методу розведень, на підставі того, що техніка застосування диско-дифузійного методу для коринебактерій поки що не розроблена. Методичні документи Європейського комітету з визначення чутливості до антибіотиків (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [EUCAST Breakpoints Tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 6.0, valid from 2016.01.01] та Британського об'єднання з антимікробної хіміотерапії (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC) [BSAC. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, Version 12, April 2013] рекомендують для постановки антибіотикограм коринебактерій готувати суспензію за стандартом мутності МакФарланда 0,5 одиниць, яку наносять на поверхню агару без розведення. Для *C. diphtheriae* така суспензія відповідає приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл.

Застосування інокулюму 0,5 одиниць стандарту МакФарланда без розведення для постановки антибіотикограм *C. diphtheriae* диско-дифузійним методом приводить до того, що в популяції виявляється велика кількість антибіотикорезистентних штамів [Antimicrobial resistance among brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains / G.A. Pereira, F.P. Pimenta, F.R. Wink dos Santos [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. - 2008. - V. 103, № 5. - P. 507-510.], що не відповідає літературним даним щодо клінічної чутливості *C. diphtheriae* та результатам дослідження антибіотикочутливості методами розведень в бульйоні чи агарі.

Задачею, на вирішення якої спрямована заявлена корисна модель, є адаптація стандартного диско-дифузійного методу до біологічних особливостей *C. diphtheriae* з метою одержання достовірних даних щодо рівня антибіотикочутливості.

Заявлений технічний результат досягається шляхом внесення модифікацій в процедуру постановки антибіотикограм, а саме зміни величини інокулюму,

Прототипом є відомі способи постановки антибіотикограм диско-дифузійним методом для бактерій роду *Corynebacterium*, які включають використання інокулюму, що відповідає стандарту мутності 0,5 McFarland [EUCAST Breakpoints Tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 6.0, valid from 2016.01.01; BSAC. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, Version 12, April 2013] і використовується для засіву поверхні агару без розведень.

Пропонується модифікація стандартної процедури постановки антибіотикограм *C. diphtheriae* на базі стандартного диско-дифузійного методу, яка полягає в тому, що інокулюм оптичної густиною 0,5 McFarland перед нанесенням на поверхню агару розводять втричі.

Підставою для внесення запропонованої модифікації є результати наших досліджень, в ході яких співставили результати визначення антибіотикочутливості *C. diphtheriae* диско-дифузійним методом з використанням інокулюму різних концентрацій, з результатами референс-методу, а саме стандартного методу розведень в бульйоні.

Постановку антибіотикограм диско-дифузійним методом проводили на агарі Мюллера-Хінтона з 5 % крові, з використанням стандартних паперових дисків з антибіотиками виробництва HIMEDIA (Індія). Підготовку культур *C. diphtheriae* до роботи, контроль якості поживних середовищ та паперових дисків з антибіотиками проводили, згідно з рекомендаціями EUCAST. Інокулюм наносили на поверхню агару по 1,5 мл з наступним відсмоктуванням зайвої рідини. Визначення чутливості *C. diphtheriae* методом розведень в бульйоні проводили, згідно зі стандартами EUCAST, у поживному бульйоні з 10 % кінської сироватки. Використана вибірка 60 штамів. Результати представлені в таблиці.

Таблиця

Відповідність результатів визначення чутливості *C. diphtheriae* за допомогою диско-дифузійного методу (стандартного та модифікованого) з результатами референс-методу (розведень в бульйоні)

| Антибіотик | Коефіцієнт кореляції (r) між результатами методу розведень та диско-дифузійного | |
|-----------------|---|----------------|
| | стандартного | модифікованого |
| Бензилпеніцилін | 0,42 | 0,51 |
| Оксацилін | 0,32 | 0,64 |
| Еритроміцин | 0,21 | 0,61 |
| Кларитроміцин | 0,35 | 0,61 |
| Азитроміцин | 0,34 | 0,53 |
| Гентаміцин | 0,39 | 0,61 |

Як видно з представлених в таблиці даних, при використанні нерозведеного інокулюму кореляція одержаних результатів з результатами референс-методу була низького чи середнього рівня, при використанні розведеного інокулюму - середнього чи високого. Результати визначення антибіотикочутливості *C. diphtheriae*, одержані при застосуванні стандартного та модифікованого диско-дифузійного методу, відрізнялись на рівні $P < 0,01$.

Вищий рівень відповідності результатів, одержаних за допомогою модифікованого диско-дифузійного методу, до результатів референс методу (розведень в бульйоні), дозволяє вважати запропоновану корисну модель доцільною до використання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення чутливості *Corynebacterium diphtheriae* до антибактеріальних препаратів на базі стандартного диско-дифузійного методу, який **відрізняється** тим, що при постановці антибіотикограм бактеріальну суспензію для інокуляції щільного поживного середовища, яка відповідає оптичній густині 0,5 одиниць стандарту мутності McFarland, перед нанесенням на поверхню середовища розводять втричі.

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