



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48941 (13) U
(51) МПК (2009)
A61B 10/00
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИСКОРЕНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ РАНОВОЇ МІКРОФЛОРИ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) u200910848

(22) 27.10.2009

(24) 12.04.2010

(46) 12.04.2010, Бюл.№ 7, 2010 р.

(72) ДАЦЕНКО БОРИС МАКАРОВИЧ, БІРЮКОВА СВІТЛАНА ВАСИЛІВНА, БОЛЬШАКОВА ГАЛИНА МИХАЙЛІВНА, ГВОЗДИК ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ХМИЗОВ РУСЛАН АНДРІЙОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯ-ДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

2

(57) Спосіб прискореного визначення чутливості ранової мікрофлори до сучасних антибактеріальних препаратів шляхом застосування індикатора, який відрізняється тим, що як індикатором величини зон затримки росту поверхню інфікованого травного середовища з дисками обробляють реактивом нейтральним червоним, по 4-5 мл на кожную чашку Петрі.

Корисна модель належить до медицини, а саме до хірургії, та може бути використана для прискореного визначення чутливості ранової мікрофлори до сучасних антибактеріальних препаратів. Швидке отримання результатів такого дослідження забезпечує можливість переходу у більш ранні терміни від емпіричної до спрямованої антибіотикотерапії, яка більш ефективна та потребує порівняно менших економічних витрат.

Відомі прискорені методи визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків, які дозволяють скоротити термін, протягом яких клініцисти здійснюють високовартісну емпіричну антимікробну терапію за допомогою антибіотиків широкого спектру дії. Так, для прискорення термінів отримання бактеріологічної відповіді Р. М. Навашин, І. П. Фомина («Справочник по антибиотикам», М.: Медицина, 1974. - С. 36-45.) пропонували робити посів ранового виділення з тампона відразу на 1 мл бульйону; отриману культуру засівали на чашку Петрі з агаром та накладали на нього стандартні паперові диски з антибіотиками. Результати дослідження могли бути отримані через 16-18 годин.

Відомий спосіб (Руфанов І. Г. та Сисоева Л. А. Краткое руководство по антибиотикотерапии. - М.: Медицина, 1964. - С.50-54.), при якому при додаванні в бульйон індикатора 2,6-діхлорфеноліндофенолу оцінюють результати вже через 5-6 годин з моменту виділення чистої культури; загальний термін отримання відповіді становить 18-20 годин. Відомий спосіб (Патент на изобретение по заявке 4954189/14 «Способ определения устойчивости микроорганизмов к антиби-

отик». - М. - ВНИИГПЭ. - 1992. - 19с.), при якому з метою скорочення термінів визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків використовують для інкубації суспензію мікроорганізмів, до якої додатково додають радіоактивні ізотопи β -випромінювання. Ступінь чутливості мікроорганізму до кожного антибіотика оцінюють за рівнем включення радіоактивної мітки до структури мікробної клітини через 50-60 хвилин інкубації, причому рівень включення прямо пропорціональний чутливості мікроорганізму до антибіотика.

Недоліками цих способів є порівняльна тривалість проведення бактеріологічного дослідження, а також значні труднощі їх технічного забезпечення (Стручков В. И. Общая хирургия. - М.: Медицина, 1978. - 544с.).

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є прискорений метод визначення чутливості до антибіотиків чистих та змішаних мікробних культур з хімічним RH_2 -індикатором трифенілтетразолхлоридом (ТТХ), регламентований наказом МЗ СРСР №250 від 13 березня 1975р. «Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам» та Постановою Кабінету Міністрів України №1109 від 22. 06. 99 «Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд в Україні». Суть способу полягає в тому, що суспензію біоптата гнійної рани в ізотонічному розчині натрію хлориду змішують з рідким (40-45°C) травним агаром та виливають у чашки Петрі. На застиглу поверхню агару накладають диски з антибіотиками. Чашки встановлю-

(13) U

(11) 48941

(19) UA

ють у термостат на 4-4,5 години при температурі 37°C, після чого обробляють поверхню агару індикатором ТТХ та знову поміщають у термостат на 20-30хв. (друга інкубація). Урахування результатів: ділянки травного агару, на яких є ріст бактерій, набувають буровато-червоного забарвлення, а зони пригнічення росту навколо дисків з антибіотиками залишаються безбарвними - їх замірюють в міліметрах.

Недоліками описаного способу є короткий (до 12 годин) термін придатності свіжевиготовленого розчину ТТХ (в умовах холодильника) та, головне, відсутність в теперішній час цього порівняно дорогого індикатора в бактеріологічних лабораторіях через припинення його закупівель.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу прискореного визначення чутливості ранової мікрофлори до антибактеріальних препаратів, в якому за рахунок зміни індикатора досягається суттєве (до 4-5 годин) скорочення термінів визначення чутливості ранової мікрофлори до сучасних антибактеріальних препаратів, який не поступається за ефективністю протеїну, але виключає його недоліки.

Відмінна ознака запропонованого рішення полягає в заміні індикатора ТТХ, який використовується в прототипі, на більш доступний та дешевий - нейтральний червоний.

Спосіб, що заявляється, дозволяє безпосередньо досліджувати клінічний матеріал - рановий біоптат або гнійне відділення ран та в короткі терміни визначити у порівняльному аспекті виразність пригнічувальної дії антибактеріальних препаратів, які використовуються в клініці, на життєздатність ранової мікрофлори як в монокультури, так і в асоціаціях.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Вміст гнійної рани або суспензію біоптата краю (дна) рани в ізотонічному розчині (1:10) вносять до пробірки зі середовищем Мілера-Хілтона з 10% розчином глюкози, ретельно перемішують та вливають у стерильні чашки Петрі, встановлені на горизонтальній поверхні. На застиглу поверхню середовища накладають диски з антибіотиками, а чашки встановлюють у термостат на 4-4,5 години при температурі 37°C. У кінці терміну інкубації чашки виймають, поверхню середовища обробляють індикатором нейтральним червоним (4-5мл на кожну чашку Петрі) та знову встановлюють у термостат на 20-30 хвилин (друга інкубація).

Індикатор: 100мл 0,001% водно-спиртового розчину, який складається із 0,1 граму нейтрального червоного, 40мл спирту та дистильованої води.

Урахування результатів: ділянки середовища Мілера-Хілтона, на яких є ріст бактерій, набувають яскраво-червоного забарвлення, а зони пригнічення росту навколо дисків з антибіотиками залишаються безбарвними. Термін отримання кінцевого результату становить 4-5 годин.

Для підтвердження правомочності способу прискореного визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, який пропонуємо, було проведено серію бактеріологічних досліджень з використанням, як індикатора ТТХ (прототип), так і нейтрального червоного (спосіб, що пропонується).

Дослідження показали, що розроблений спосіб за своєю ефективністю ідентичний прототипу: зони затримки росту навколо дисків з тим чи іншим антибактеріальним препаратом, які виявляються з використанням ТТХ, є рівновеликими зонам затримки росту, які встановлюються за допомогою запропонованого індикатора (нейтральний червоний).

Таблиця

Порівняльні результати прискореного визначення чутливості мікроорганізмів (клінічні штами) до антибактеріальних препаратів

Антибактеріальні препарати	Індикатор	Зони затримки росту (мм) навколо дисків з бактеріальним препаратом				
		S.aureus (n=6)	S.faecalis (n=10)	K.pneumoniae (n=9)	E.coli (n=6)	P.aeruginosa (n=7)
Гатіфлоксацин	ТТХ	30,05±0,11	22,07±0,13	20,37±0,10	33,09±0,1	22,05±0,13
	Нейтральний червоний	31,35±0,11	22,08±0,17	21,17±0,12	32,19±0,12	23,05±0,13
Цефотаксим	ТТХ	27,13±0,09	26,43±0,11	28,46±0,12	31,78±0,12	19,55±0,09
	Нейтральний червоний	26,13±0,49	27,23±0,16	28,27±0,11	30,78±0,13	19,42±0,07
Кларитроміцин	ТТХ	9,11±0,08	22,82±0,11	0	0	0
	Нейтральний червоний	28,11±0,18	23,12±0,13	0	0	0
Діоксидин	ТТХ	10,19±0,05	8,37±0,07	23,03±0,06	19,95±0,11	9,03±1,13
	Нейтральний червоний	11,01±0,05	8,12±0,01	23,13±0,16	20,05±0,10	7,08±0,19
Иодопирон	ТТХ	12,08±0,09	11,03±0,08	20,72±0,12	20,09±0,11	19,05±0,21
	Нейтральний червоний	12,69±0,09	10,83±0,07	21,12±0,02	20,26±0,13	18,09±0,11

Примітки: вірогідність показників $p \leq 0,05$

Як приклад приводимо результати прискореного визначення чутливості основних збудників гнійної хірургічної інфекції до сучасних антибіотиків - гатіфлюксацину (група фторхінолонів), цефотаксиму (група цефалоспоринов), кларитроміцину (група макролідів), а також антисептикам - діоксидину та йодопирону. Дані таблиці свідчать, що порівняльно більшу активність проти стафілококів мають фторхінолони, в той час як антисептики (діоксидин та йодопирон) не забезпечують дії, яка достатньо пригнічує їх ріст.

Кларитроміцин позбавлений активності у відношенні кишкових та сине-гнійних паличок, помітну дію на які мають фторхінолони та антисептики.

Таким чином, розроблений спосіб прискореного визначення чутливості ранової мікрофлори до сучасних антибактеріальних препаратів, де як індикатор використовується реактив нейтральний червоний, забезпечує отримання відповіді в короткий (через 5-6 годин) термін, ідентичний за ефективністю прототипу, але відрізняється від нього доступністю та більш низькою вартістю.