



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54261

(13) A

(51) 7 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТУ КАЛАМУТНОСТІ

1

2

(21) 2002075344

(22) 01 07 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Мавров Іван Іванович, Шаповалова Ольга  
Вікторівна, Маніна Жанна Миколаївна, Бірюкова  
Світлана Василівна, Гринь Володимир Вікторович,  
Федорова Людмила Григорівна(73) ІНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ  
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ(57) Спосіб виготовлення стандарту каламутності,  
що включає розведення розчину барію хлориду  
дигідрату сірчаною кислотою, який відрізняється  
тим, що етапи розведення виконують під фото-  
метричним контролем рівня оптичної густини роз-  
чину та доводять її до  $D_{540\text{ нм}}$  0,150 - 155

Винахід відноситься до мікробіології, зокрема,  
до способів виготовлення стандартів каламутності,  
які застосовуються при приготуванні суспензії мік-  
роорганізмів

Може бути використаний у лабораторіях ме-  
дичного, фармакологічного та ветеринарного про-  
філю, які проводять дослідження чутливості мікро-  
організмів до хіміотерапевтичних препаратів та  
інші види досліджень з використанням суспензії з  
визначеною концентрацією мікроорганізмів

Відомі способи виготовлення суспензії мікро-  
організмів для постановки методу дифузії в агар з  
використанням паперових дисків Згідно наказу  
МОЗ СРСР №250 від 13 03 75 року ("Об унифика-  
ции методов определения чувствительности мик-  
роорганизмов к химиотерапевтическим препара-  
там"), як стандарт для виготовлення суспензії  
мікроорганізмів визначеної концентрації викорис-  
товують стандарт каламутності № 10, що вироб-  
ляється ПСК (Державним науково-дослідним ін-  
ститутом стандартизації і контролю медичних і  
біологічних препаратів, Росія) За одиницю кала-  
мутності умовно приймають каламутність завісі  
живих тифозних бактерій з концентрацією 100  
млн мікробних тіл в 1мл Еталон №10 (10 одиниць  
каламутності) відповідає 1 млрд , мікробних тіл в  
1мл За методичними вказівками ("По определе-  
нию чувствительности микроорганизмов к анти-  
биотикам методом диффузии в агар с использо-  
ванием дисков"), МЗСРСР № 2675-83, від  
10 03 1983, суспензію мікробів рекомендовано  
виготовляти із 18-24 годинної мікробної культури,  
що вирощена на щільному середовищі шляхом  
розведення до каламутності, що відповідає стан-  
дарту ПСК на 10 ОД або 5 ОД Потім одержану

завісі мікроорганізмів додатково розводять в 10  
разів ізотонічним розчином хлориду натрію

Недоліками даних способів виготовлення су-  
спензії мікроорганізмів є необхідність додаткового  
розведення, що значно збільшує час на постано-  
вку метода, можливість помилок в разі застосу-  
вання для роботи пробірок із скла іншої якості  
Крім того, дані стандарти каламутності є високо-  
коштовними і виготовляються за кордоном

Найбільш близьким до пропонуемого винаходу  
є спосіб виготовлення розчину стандартної кала-  
мутності, згідно якого стандарт каламутності виго-  
товляється шляхом доведення 0,6мл 1% (10г/л)  
розчину хлориду барію дигідрату ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) до  
об'єму 100мл 1% розчином (10мл/л) сірчаної кис-  
лоти ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) Цей розчин розливають у пробірки,  
аналогічні тим, що використовуються для зразків  
культур бактерій ("Основные методы лаборатор-  
ных исследований в клинической бактериологии",  
Vanderpitte J., Engbae K K., Plot P., Heuck C C., ВОЗ,  
Женева, 1994 )

Основними недоліками прототипу є те, що ка-  
ламутність стандарту не визначається за допомо-  
гою об'єктивних критеріїв, а тільки візуально, точ-  
ність виготовлення розчинів залежить від  
кваліфікації персоналу та якості вимірювального  
посуду, що використовується Густина суспензії  
бактерій, виготовленої за даним стандартом, не  
виражається кількісно

В зв'язку з вищевикладеним, в основу пропо-  
нуемого винаходу покладено задачу - підвищення  
якості стандарту каламутності

Задача, яку покладено в основу винаходу, ви-  
рішується у відомому способі виготовлення стан-  
дарту каламутності, що включає розведення роз-

(13) A

(11) 54261

(19) UA

чину хлориду барію дигидрату сірчаною кислотою. Згідно з винаходом, етапи розведення виконують під фотометричним контролем рівня оптичної густини розчину та доводять її до  $D/540\text{nm}$  0,150-0,155.

Стандарт виготовляється таким чином

1 етап. Виготовляють розчин №1 наважку  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  масою 1г розчиняють у 99,9мл дистильованої води. Розчин №2. Розчиняють  $\text{H}_2\text{SO}_4$  у дистильованій воді до одержання питомої ваги розчину 1,005.

2 етап. 0,6мл розчину  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (розчин №1) в мірній колбі місткістю 100мл доводять до міткі розчином  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (розчин №2). Отриманий таким чином розчин використовують в якості стандарту каламутності.

3 етап. Контролюють точність виготовлення стандарту каламутності на фотометрі фотоелектричному КФК-3 при довжині хвилі 540nm, з використанням кювети з робочою довжиною 10мм і контрольного розчину №2. Доводять оптичну густину стандарту каламутності до  $D/540\text{nm}$  0,150 -0,155 шляхом додавання в разі необхідності розчинів №1 або №2.

Спосіб, що пропонується, ілюструється дослідженням таких якостей стандарту

Протокол №1

Виготовляють стандарт каламутності з  $D/540\text{nm}$  0,150-0,155 (коефіцієнт пропускання,  $\tau=70,0-80,0$ ). Вирощують 24-годинну культуру штаму *Escherichia coli* ATCC 25923 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культури *E. coli* в ізотонічному розчині натрію хлориду ( $\text{NaCl}$ ), яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $1,03 \pm 0,13 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл}$  ( $n=12$ ).

Вирощують 24-годинну культуру штаму *St. aureus* ATCC 25923 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культури *St. aureus* в ізотонічному розчині  $\text{NaCl}$ , яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість КУО після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $2,14 \pm 0,14 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл}$  ( $n=15$ ).

Протокол №2

Виготовляють стандарт каламутності з  $D/540\text{nm}$  0,215-0,220 ( $\tau=60,0-70,0$ ). Вирощують 24-годинну культуру штаму *Escherichia coli* ATCC 25922 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культури *E. coli* в ізотонічному розчині  $\text{NaCl}$ , яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість КУО після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $1,16 \pm 0,08 \cdot 10^{10} \text{ КУО/мл}$  ( $n=12$ ).

Вирощують 24-годинну культуру штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культу-

ри *St. aureus* в ізотонічному розчині  $\text{NaCl}$ , яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість КУО після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $3,07 \pm 0,46 \cdot 10^{10} \text{ КУО/мл}$  ( $n=11$ ).

Протокол №3

Виготовляють стандарт каламутності з  $D/540\text{nm}$  0,090-0,095 ( $\tau=80,0-90,0$ ). Вирощують 24-годинну культуру штаму *Escherichia coli* ATCC 25922 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культури *E. coli* в ізотонічному розчині  $\text{NaCl}$ , яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість КУО після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $1,66 \pm 0,06 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл}$  ( $n=12$ ).

Вирощують 24-годинну культуру штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на м'ясо-пептонному агарі. Виготовляють суспензію культури *St. aureus* в ізотонічному розчині  $\text{NaCl}$ , яка візуально відповідає стандарту каламутності. Визначають кількість бактерій, що містить суспензія, методом послідовних розведень і наступним засівом на щільне середовище, підраховуючи кількість КУО після 24-годинної інкубації при  $37^\circ\text{C}$ . Щільність суспензії дорівнює  $1,28 \pm 0,03 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл}$  ( $n=9$ ).

Ефективність стандарту ілюструється наступними прикладами

Приклад №1

При визначенні чутливості штаму *Escherichia coli* ATCC 25922 до антибіотиків методом дифузії в агар з використанням паперових дисків для засіву газону використовують суспензії бактерій, виготовлені двома способами з 18-24-годинної культури

суспензія, що відповідає стандарту каламутності ПСК на 5 ОД, розведена у 10 разів ізотонічним розчином натрію хлориду (за методичними вказівками по «Определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков», (1983 г)),

суспензія, що відповідає стандарту каламутності, виготовленому за пропонуємим способом

На поверхню твердого середовища для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків АГВ в чашці Петрі наносять 0,1мл суспензії культури бактерій, виготовлених за одним з вище наведених способів, та рівномірно розподіляють нанесену суспензію по всій поверхні середовища мікробіологічним шпателем. Після підсихання газону на його поверхні стерильним пінцетом на відстані 2см один від одного та від краю чашки розкладають паперові диски, імпрегновані антибіотиками, виготовлені НДЦФ, м. Санкт-Петербург, Росія.

Використовують диски з ампіциліном, карбеніциліном, цефазоліном, цефотаксимом, сізоміцином, гентаміцином та еритроміцином. Засіяні чашки інкубують у термостаті 18-20 годин при  $37^\circ\text{C}$ . Оцінку результатів проводять у проходячому світлі на темній матовій поверхні шляхом виміру діаметру зон затримки росту бактерій з урахуванням

діаметру дисків з використанням вимірювальної лінійки. Результати вимірів відображені у табл 1

Таблиця 1

Діаметри зон затримки росту штаму *Escherichia coli* ATCC 25922 (мм)

Антибіотик	Стандарт, що пропонується	n	Стандарт ПСК	n
Ампіцилін	15,5 ± 0,3	24	15,8 ± 0,4	21
Карбеніцилін	25,0 ± 0,5	24	25,3 ± 0,4	24
Цефазопін	26,2 ± 0,9	24	25,7 ± 0,7	24
Цефотаксим	33,1 ± 1,0	18	32,3 ± 0,7	18
Сізоміцин	22,0 ± 0,4	24	21,2 ± 0,3	24
Гентаміцин	22,1 ± 0,4	27	22,5 ± 0,4	27
Еритроміцин	9,1 ± 0,4	27	8,8 ± 0,4	27

Таблиця 2

Діаметри зон затримки росту штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (мм)

Антибіотик	Стандарт, що пропонується	n	Стандарт ПСК	n
Ампіцилін	33,3 ± 0,4	18	33,6 ± 0,4	18
Карбеніцилін	36,1 ± 1,1	21	35,9 ± 0,8	21
Цефазопін	31,0 ± 1,3	21	29,9 ± 1,2	21
Цефотаксим	32,2 ± 1,1	21	31,7 ± 1,3	21
Сізоміцин	30,8 ± 1,4	21	30,8 ± 1,3	21
Гентаміцин	26,7 ± 0,6	21	26,5 ± 0,9	21
Еритроміцин	29,6 ± 0,5	21	30,0 ± 0,5	21

#### Приклад № 2

При визначенні чутливості штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 до антибіотиків методом дифузії в агар з використанням паперових дисків для засіву газону використовують суспензії бактерій, виготовлені двома способами з 18-24 годинної культури

суспензія, що відповідає стандарту капаунтності ПСК на 5 ОД, розведена у 10 разів ізотонічним розчином натрію хлориду (за методичними вказівками по «Определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков», (1983 г)),

суспензія, що відповідає стандарту капаунтності, виготовленої за пропонуємим способом

На поверхню твердого середовища для визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків АГВ в чашці Петрі наносять 0,1мл суспензії культури бактерій, виготовлених за одним з вище на-

даних способів, та рівномірно розподіляють нанесену суспензію по всій поверхні середовища мікробіологічним шпателем. Після підсихання газону на його поверхні стерильним пінцетом на відстані 2см один від одного та від краю чашки розкладають паперові диски, імпрегновані антибіотиками, виготовлені НДЦФ, м Санкт-Петербург, Росія

Використовують диски з ампіциліном, карбеніциліном, цефазопіном, цефотаксимом, сізоміцином, гентаміцином та еритроміцином. Засіяні чашки інкубують у термостаті 18-20 годин при 37°C. Оцінку результатів проводять у проходящому світлі на темній матовій поверхні шляхом виміру діаметру зон затримки росту бактерій з урахуванням діаметру дисків з використанням вимірювальної лінійки. Результати вимірів відображені у табл 2

Таким чином, створено вітчизняний стандарт високої якості