



УКРАЇНА

„UA,,, .1.12.13 „ч СІ

(51)5 COI N33/48: A61 B 17/26; C 12 K 1/06

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДМОВСТВО

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТІЙКОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБІОТИКУ

1

(20)96240140,26 08 93

(21)4954189/SU

(22) 14.05 91

(24)25.12.96

(46)25.12.96. Бюл. №4

(56)Навашин Р М., ФоминаЧ.П Справочник по антибиотикам М., Медицина, с36-45.

(72) Даценко Борис Макарович, Дикий ігор Леонідович, Щур Валерій Анатолійович, Лоевський Марк Михайлович, Гладух Євгеній Володимирович, Щур Світлана Василівна

(73) Щур Валерій Анатолійович (UA)

(57) Способ определения устойчивости микроорганизмов к антибиотику, включающий инкубацию микроорганизма с антибактериальным препаратом при 37°C, отличающийся тем, что для инкубации используют суспензию микроорганизма к которой дополнительно добавляют радиоактивные изотопы /J-излучения, а устойчивость микроорганизма определяют по уровню включения радиоактивной метки в структуру микробной клетки через 50-60 минут инкубации причем уровень включения прямо пропорционален устойчивости микроорганизма к антибиотику.

Изобретение относится к медицине, а именно к лабораторной диагностике лекарственных устойчивости микроорганизмов, этиологически определяющих инфекционные, септические и гнойно-воспалительные заболевания.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ определения устойчивости микроорганизмов к антибиотику методом серийных разведений в жидкой питательной среде, согласно которому к серийным разведениям антибактериальных препаратов в мясопептонном бульоне добавляют взвесь бактерий, выращенных на мясопептонном агаре при 37°C в течение 16-18 часов и смывых мясопептонным бульоном до конечной концентрации 10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> клеток/мл. Результаты учитывают, определяя наличие или отсутствие роста бактерий в пробирках, содержащих различные разведения антибактериальных препаратов по мутности среды.

Однако, вышеперечисленные способы обладают рядом существенных недостатков к которым относятся длительность проведения бактериологического исследования (до 20-24 часов, а в случае определения бактерицидной активности до 48-72 часов), громоздкость методической постановки, необходимость использования специализированных кадров и аппаратуры. Одновременно данный способ рассчитан на определение антибиотикоустойчивости лишь изолированных из микробных ассоциаций компонентов и не позволяет проводить комплексную оценку антибиотикорезистентности ассоциантов и смешанных культур. Кроме этого, известный способ не позволяет непосредственно исследовать клинический материал (раневой биопат гнойное отделяемое и т.д.), что затрудняет оперативное применение этиотропной терапии при лечении гнойно-воспалительных заболеваний. Недостатком способа является отсутствие

СО

О

возможности устанавливать механизм действия антибактериальных препаратов.

Целью изобретения является повышение эффективности определения лекарственной устойчивости микроорганизмов в 5 нативном клиническом материале, с исключением бактериологических исследований и существенным сокращением сроков для получения результатов,

Суть заявляемого способа составляет 10 дифференцированное использование меченых радиоактивным изотопом аминокислот и нуклеотидов в зависимости от механизма действия антибиотика на бактериальную клетку для определения степени устойчиво- 15 сти микроорганизмов к антибиотику по угнетению уровня включения метки в структуру микробной клетки по сравнению с контролем.

Предварительными экспериментами 20 были обоснованы оптимальные параметры и моделирующие состояния, используемые в качестве контролен в способе. Экспериментально обоснованы оптимальные временные параметры инкубации в предложенном 25 способе. На рис. 1 представлен график зависимости включения Н-тимидина и  $^{14}\text{C}$ -глицина в структуру золотистого стафилококка (штамм 209) в зависимости от времени инкубации. Как видно из графика, процесс вклю- 30 чения  $^3\text{H}$ -тимидина выходит на плато к 40 мин, в то время как максимальное включение С-глицина наступает к 50 минуте. Таким образом оптимальное время инкубации 50-60 минут. 35

На рис.2 (столбик 1) сорбция метки на поверхности микробных клеток после их разрушения 1,5% раствором детергента тритона X-100 (20 мкл, 5 мин) по сравнению с включением метки интактными стафило- 40 кокками (рис.2 ст.4) и после криовоздействия (рис.2 ст.2). При посеве на чашки с плотной питательной средой и инкубации 18-24 часа при  $37^\circ\text{C}$  0,1 мл взвеси золотистого стафилококка после воздействия детер- 45 гентом, отмечено отсутствие роста бактерий, что позволяет использовать уровень сорбции метки на бактериях после воздействия на них тритона X-100 (20 мкл, 5 мин) как контрольный, моделирующий бак- 50 терицидное воздействие препаратов на микробные клетки.

На рис.2 ст.2, 3 графически представлено угнетение включения  $^3\text{H}$ -тимидина в структуру золотистого стафилококка после 55 криовоздействия (5 мин жидким азотом) и отсутствие угнетения включения метки в структуру микробной клетки после воздействия дистиллированной водой в течение 5 мин по сравнению с включением того же

изотопа интактными бактериальными клетками (рис.2 ст 4). Одновременно уровень включения метки в структуру стафилококка при криовоздействии отличается от сорбции метки на его поверхности при воздействии детергентом (рис.2 ст, 1), что указывает на наличие активного включения радиоактивной метки в структуру микробной клетки, как признак ее жизнедеятельности при криовоздействии. При посеве 0,1 мл взвеси золотистого стафилококка после криовоздействия на чашки с плотной питательной средой и инкубации 18-24 часа при  $37^\circ\text{C}$  наблюдается рост единичных колоний, что подтверждает выбор оптимального моделирования бактериостатического воздействия на микроорганизм с ингибированием их ферментных систем при воздействии на них жидким азотом в течение 5 минут.

Способ осуществляется следующим образом: раневой экссудат в объеме 1 мл или 1 г гомогенизированного биоптата из раны разводят изотоническим раствором поваренной соли из расчета 1:10 и центрифугируют при 1,5-2 тыс.об/мин в течение 5—10 мин при  $T+4+6^\circ\text{C}$ . Надосадочную жидкость декантируют и используют для исследования лекарственной устойчивости микроорганизмов. К супернатанту добавляют меченую изотопом аминокислоту или нуклеотид в зависимости от механизма действия исследуемого антибиотика из расчета 2 мккюри/мл и антибиотик в лимитной терапевтической концентрации. Полученную смесь инкубируют в термостате при  $37-37,5^\circ\text{C}$  в течение 50-60 мин. Невключившуюся метку удаляют трехкратным центрифугированием при 10 тыс.об/мин по 10 мин. В полученном осадке определяют уровень радиоактивности.

В качестве контролен берут:

~ максимальное включение метки микробной клеткой за время инкубации, которое определяют без внесения антибиотика в систему;

- минимальное включение метки при ингибировании ферментных систем стафилококка определяют после криовоздействия на него (5 мин. жидким азотом) и инкубации 50-60 мин;

- сорбцию метки на поверхности стафилококка определяют после его разрушения 1,5% раствором детергента тритона X-100 (20 мкл) и инкубации с меткой 50-60 мин.

Учет результатов проводят следующим образом:

- минимальная подавляющая концентрация антибиотика - первая доза в пробе с угнетением уровня включения радиоактивной метки, соответствующим минимальному ее включению после ингибирования фер-

ментных систем стафилококка в результате криовоздействия;

- минимальной бактерицидной концентрацией препарата является первая доза в пробе с уровнем включения, соответствующим сорбции метки на поверхности микробной клетки после ее разрушения детергентом (пробы с серийными разведениями антибиотика).

При соответствии определяемых бактерицидных и бактериостатических концентраций терапевтическим, культура чувствительна к антибиотику.

В случае, если уровень включения в структуру исследуемых бактерий в пробах с терапевтическими концентрациями антибиотиков достоверно не отличается от максимального уровня включения метки микробной клеткой в пробе с отсутствием антибиотика, можно говорить об устойчивости исследуемых культур к антибиотику, когда он не угнетает включение метки в структуру бактерии.

Изучение лекарственной устойчивости золотистого стафилококка к гентамицину проводилось параллельно предложенным способом и методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Результаты хорошо коррелировали между собой.

Таким образом, временные затраты, необходимые для определения лекарственной устойчивости микроорганизмов, сокращены до 1,5-2 часов (в 12-13 раз), а при определении бактерицидной концентрации - в 34 раза по сравнению с прототипом, причем бактериологические исследования исключены. Заявляемый метод позволяет в отличие от прототипа количественно оценить за короткое время влияние антибактериального препарата на жизнедеятельность микроорганизмов, а также оценить антимикробное действие близких доз антибактериальных препаратов.

Способ высоко эффективен, характеризуется объективностью результатов, позволяет исследовать как монокультуру, так и ассоциации микроорганизмов в нативном клиническом материале. Способ экономически эффективен.

**Пример 1.**

Исходя из того, что основным механизмом действия рифампицина на микроорганизмы является торможение зависимой от ДНК- и РНК-полимеразы и торможение включения урацила и других нуклеотидов в структуру микробной клетки, для определения устойчивости к рифампицину золотистого стафилококка в качестве радиоактивной метки выбора Н-тимидин.

Для определения устойчивости стафилококка к рифампицину к суспензии золотистого стафилококка (штамм 209) в конечной концентрации 10 в мп в объеме 0,2 мл с рифампицином в серийных разведениях добавляли по 5 мкл Н-тимидина (2 мкюри на мл; уд.активностью 350 ГБК на мл) и инкубировали 50-60 мин при 37°C. Максимальное включение метки стафилококком за время инкубации определяли без внесения антибиотика в систему. Минимальное включение метки при ингибировании ферментных систем стафилококка определяли после криовоздействия на него в течение 5 мин жидким азотом. Сорбцию метки на поверхности стафилококка определяли после его разрушения 1,5% раствором детергента тритона Х-100 (20 мкл). Невключившуюся метку удаляли трехкратным центрифугированием при 10 тыс. об/мин по 10 мин. Во все пробы вносили по 20 мкл 1,5% раствора детергента тритона Х-100 и образцы количественно переносили в сцинтиляционные флаконы, содержащие по 10 мл сцинтилятора ЖС-8. Пробы просчитывали на сцинтиляционном счетчике LS-7800 Веспап (Австрия) вычитанием фона флаконов. Захват метки бактериями получали в имп/мин.

Как видно из рис 3, стафилококк (штамм 209) не обладает лекарственной устойчивостью к рифампицину, так как определяемые бактериостатические и бактерицидные дозы соответствуют терапевтическим. Бактериостатическая доза рифампицина по отношению к золотистому стафилококку шт.209 0,0005 мг (столбик 5 на рис.3), так как захват метки стафилококком в пробе с 0,0005 мг соответствует минимальному включению метки после ингибирования ферментных систем криовоздействием. Бактерицидная доза препарата 0,01 мг (рис.3 ст.8), так как уровень радиоактивности в пробе 0,01 мг соответствует сорбции метки на поверхности стафилококка.

**Пример 2.**

Для сравнительной характеристики лекарственной устойчивости золотистого стафилококка шт.209 к гентамицину и его липосомальной форме (получена согласно методу А.Д Базавлюка, 1989) осуществляли манипуляции, описанные в примере 1, в результате которых по учету незначительной динамики в активности микроорганизмов было установлено, что стафилококк более устойчив к действию гентамицина, чем его липосомальной формы. Из рис.4 видно, что бактериостатическая и бактерицидная концентрации липосомальной формы гентамицина (ст.4 и 8 на рис 4) в 5 раз ниже,

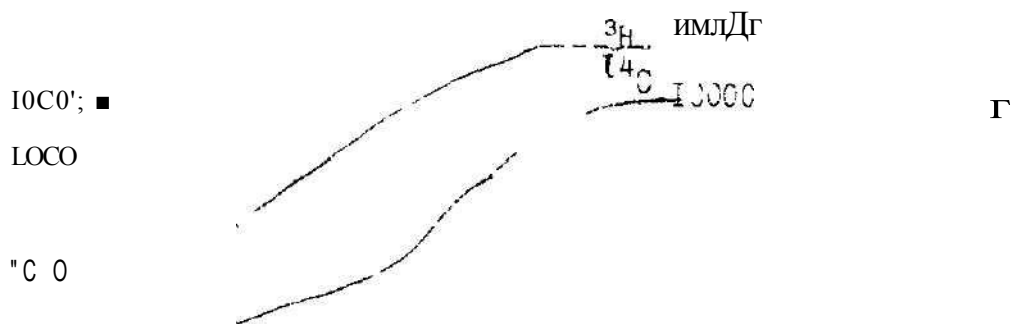
чем его нелипосомальной формы (ст.5 и 9 на рис.4).

Изучение лекарственной устойчивости золотистого стафилококка к гентамицину проводилось параллельно методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Результаты хорошо коррелировали между собой.

Пример 3.

Для определения антибиотикорезистентности микрофлоры в ране у больного Г. с диагнозом острый парапроктит к стрептомицину (при бактериоскопии нативного материала установлено наличие Грам палочек и кокков), 1 г гомогенизированной ткани из

биоптата раны разводят изотоническим раствором поваренной соли из расчета  $10^6$  и центрифугируют при 1,5-2 тыс. оборотов в течение 10-15 мин при  $T+4+6^\circ\text{C}$ , надосадочную жидкость декантируют, образуя из нее суспензионную систему (объем 0,2 мл) с терапевтической концентрацией стрептомицина и 5 мкл (2 мкюри на мл)  $^3\text{H}$ -тимидина и инкубируют 50-60 минут. Обработку и подсчет проб производят аналогично описанному в примере 1. Из рис.5 видно, что микрофлора в ране у больного Г. является резистентной к стрептомицину, так как терапевтическая концентрация его не действует на микроорганизмы.



Г

Рис.Б  
имп/мин

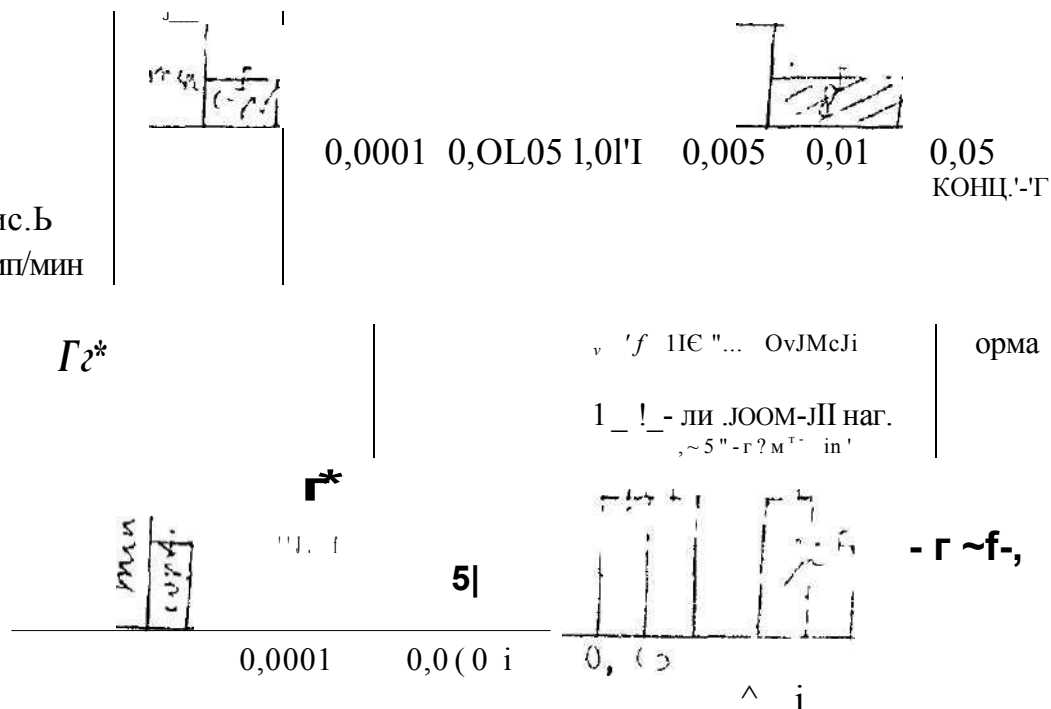


Рис.

"OhLi."T

У.ЯКС  $\begin{array}{c} 1 - I \\ | \\ \text{МИН} \end{array}$

---

Ї-П

Рис.

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор

Я. Филь

Замовлення 4053

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

