



УКРАЇНА

(19) UA (11) 6967 (13) C1

(51)5 C 12 Q 1/18

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СПОЛУЧЕНОЇ АКТИВНОСТІ ПАРИ АНТИБІОТИКІВ

1

(21) 93080778

(22) 05.04.93

(46) 31.03.95. Бюл. № 1

(56) Сб. "Успехи в области изучения и производства антибиотиков". Труды ВНИИ антибиотиков, вып. XIII. М., 1982, с. 85.

(71) Мильштейн Эрнест Володимирович

(72) Мильштейн Эрнест Володимирович

(73) Мильштейн Эрнест Володимирович (UA)

(57) Способ определения сочетанной активности пары антибиотиков, предусматривающий размещение одинаковых по размеру субстратов с антибиотиками на некотором расстоянии друг от друга на поверхности засеянной культурой микроорганизмов плотной питательной среды, инкубирование и выявление характера взаимодействия зон задержки роста культуры между парами субстратов с антибиотиками, по которому судят

2

о наличии или отсутствии сочетанной активности, отличающийся тем, что субстраты с одним из антибиотиков пары размещают по дуге на расстоянии один от другого, равном 1,0–1,5 диаметров субстрата, субстрат с другим антибиотиком пары размещают внутри фигуры, ограниченной дугой и прямой, проходящей через концы дуги так, что расстояние между субстратами пары антибиотиков равномерно увеличивается, причем расстояние между наименее удаленными субстратами пары составляет 1,0–1,5 диаметра субстрата, а между наиболее удаленными – не менее 4-х диаметров субстрата, а вне упомянутых дуги и фигуры размещают по меньшей мере по одному субстрату с каждым из антибиотиков пары, причем расстояние между каждым из этих субстратов и любым другим составляет не менее 4-х диаметров субстрата.

Изобретение относится к медицинской микробиологии.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ определения сочетанной активности нескольких пар антибиотиков, согласно которому одинаковые по размеру субстраты с антибиотиками размещаются на некотором расстоянии (равном или несколько большем суммы радиусов зон задержки антибиотиков каждой пары) друг от друга на поверхности засеянной культурой микроорганизмов плотной питательной среды. При этом субстрат с одним из антибиотиков пары размещается в центре питательной среды, субстраты с другими антибиотиками, каждый из которых образу-

ет пару с центральным, – вокруг последнего. После инкубирования можно выявить характер взаимодействия зон задержки роста культуры между парами субстратов с антибиотиками. Так, если вокруг субстратов пары образуются две независимые зоны задержки роста – эффект аддитивный (нейтральный). Если наблюдается "урезывание" зон в частях, которыми они обращены друг к другу – можно говорить об антагонизме. Если зоны сливаются, образуя "мост", наблюдается синергизм, то есть сочетанная активность.

Тем не менее данный способ из-за порядка размещения субстратов на поверхности среды не позволяет использовать

(19) UA (11) 6967 (13) C1

принцип радиальности и автономности микробиологических реакций на отдельных секторах диффузии антибиотиков в области их сочетанного действия, благодаря которому можно выявить наличие или отсутствие эффекта сенсibilизации.

Сенсibilизация микроорганизмов — это новое понятие в учении об антибиотиках, химиотерапевтических веществ на бактериальную клетку, устойчивую или слабочувствительную культуры микроорганизмов к данным химиотерапевтическим веществам, а также, когда культура устойчива к одному химиотерапевтическому веществу и чувствительна к другому. При этом феномене одно химиотерапевтическое вещество сенсibilизирует культуру к действию на нее другого химиотерапевтического вещества. Явление сугубо индивидуальное, которое должно решаться в каждом отдельном случае. Этот феномен создает губительный эффект на микробную флору, действие препаратов возрастает в десятки раз, что уменьшает затраты на медикаменты. Используя предлагаемый метод, имея выделенную чистую культуру микроорганизмов, можно за сутки получить результат исследования и предложить рациональное лечение.

В основу изобретения поставлена задача разработать способ определения сочетанной активности, который благодаря особому порядку размещения субстратов с антибиотиками на поверхности питательной среды, позволил бы наряду с сочетанной активностью определять наличие или отсутствие эффекта сенсibilизации.

Поставленная задача решается тем, что в способе определения сочетанной активности пары антибиотиков, предусматривающем размещение одинаковых по размеру субстратов с антибиотиками на поверхности засеянной культурой микроорганизмов плотной питательной среды, инкубирование и выявление характера взаимодействия зон задержки роста культуры между парами субстратов с антибиотиками, по которому судят о наличии или отсутствии сочетанной активности, согласно изобретению субстраты с одним из антибиотиков пары размещают по дуге на расстоянии один от другого, равном 1,0–1,5 диаметра субстрата, субстрат с другим антибиотиком пары размещают внутри фигуры, ограниченной дугой и прямой, проходящей через концы дуги так, что расстояние между субстратами пары антибиотиков равномерно увеличивается, причем расстояние между наименее удаленными субстратами пары составляет 1,0–1,5 диаметра субстрата, а между наиболее удаленными — не менее 4-х диаметров субстрата вне упо-

мянутых дуги и фигуры размещают по меньшей мере по одному субстрату с каждым из антибиотиков пары, причем расстояние между каждым из этих субстратов и любым другим составляет не менее 4-х диаметров субстрата.

Пример конкретного выполнения способа.

Осуществление изобретения возможно в любой баклаборатории. В чашку Петри наливается расплавленный и остуженный до 50°C питательный агар с добавлениями (глюкоза, кровь и т.д.), необходимыми для оптимального роста исследуемых микроорганизмов. После застывания и выдерживания ее 20–30 мин в термостате при температуре 37°C пастеровской пипеткой наносится на поверхность среды 3–4 капли взвеси одномолилярной суточной агаровой культуры исследуемого микроорганизма и растирается стерильным шпателем по всей поверхности питательной среды. На поверхность засеянной питательной среды кладут пинцетом диски заводского приготовления с химиотерапевтическими веществами. Если нет дисков заводского приготовления, то можно их приготовить самим (Навашин С.М., Фомин Н.П. "Справочник по антибиотикам. Москва, "Медицина", 1974 г., с. 41).

На чашку Петри с питательным агаром посеяна сплошным газоном культура стафилококка, выделенная из конъюнктивного мешка больного глазной клиники 2-й ГКБ г. Одессы.

В правой стороне чашки кладут диск, содержащий мономицин. (Фиг. 1). На расстоянии 7–9 мм кладут диск с другим химиотерапевтическим веществом, к примеру, тетрациклин, веерообразно не удаляющихся расстояниях от диска с мономицином. Каждый диск с тетрациклином кладут на расстоянии 7–9 мм друг от друга, удаляя от мономицина на 2–4 мм. Это опытная сторона чашки. В верхней части чашки находится диск с тетрациклином — контроль тетрацилина. В левой части чашки диск с мономицином — контроль мономицином (диски заводского приготовления) (фиг. 1). Можно диски размещать по заготовленному ранее трафарету.

Как явствует из фигуры 1, радиус зоны задержки роста культуры мономицином, находящимся не в области сочетанного действия антибиотиков мономицин-тетрациклин (1), равен радиусу зоны задержки роста микрофлоры контроля мономицина. Радиус зоны задержки роста микрофлоры тетрациклином, находящейся не в области сочетанного действия этих двух антибиотиков (2), равен радиусу зоны задержки роста микрофлоры

контроля тетрациклина, что говорит о достоверности наблюдений без необходимости применения контролей.

В то же время на фигуре (1) видны увеличения зон задержки роста, постепенно увеличивающихся к диску тетрациклина (3), что свидетельствует о повышении активности сочетания на данный микроорганизм. Это может быть подтверждено титрованием в жидкой среде методом двукратных серийных разведений на фоновой дозе одного химиотерапевтического вещества, того, к которому сенсibilизируется культура. Интересно отметить, что сенсibilизирующее действие химиотерапевтических веществ выявляется только на секторах диффузии между ними, не смещается на противоположную сторону диска. Так что зона задержки роста не в области сочетанного действия химиотерапевтических веществ может служить контролем действия данного химиотерапевтического вещества на данную флору. Таким образом, очевидно, что сумма радиусов зон задержки роста мономицина-1 и тетрациклина-2 в опытной стороне так и в контролях меньше, чем максимальная зона задержки роста микроорганизмов между наиболее удаленными химиотерапевтическими веществами мономицин-тетрациклин (3). $1 + 2 < 3$.

Как явствует из фигуры 1, отчетливо видна радиальность и автономность микробиологических реакций на отдельных секторах диффузии химиотерапевтических

веществ в сочетании антибиотиков мономицин-тетрациклин на культуру стафилококка.

В фигуре 2 посеян тем же методом другой штамм стафилококка: в данном случае отсутствует сенсibilизирующее и синергидное действие антибиотиков мономицин-тетрациклин на культуру и мы видим, что $1 + 2 = 3$ — индифферентное действие сочетания на стафилококк.

То есть сумма радиусов зон задержки роста микроорганизмов мономицин, тетрациклин равна с наибольшей зоной задержки роста сочетания мономицин-тетрациклин. Измерение зон задержки роста микроорганизмов можно производить от центра диска, либо только измерять зоны задержки роста микроорганизмов, не учитывая диска, как в опыте, так и в контроле.

Отсутствие сенсibilизации к одному антибиотику, а также к их сочетанию не говорит о том, что данный микроорганизм не сенсibilизируется в других сочетаниях.

Таким образом, применение предлагаемого способа позволяет ускорить определение синергидного и выявить сенсibilизирующее действие химиотерапевтических веществ на микроорганизмы.

Благодаря предлагаемому способу создается возможность оптимального лечения больных, создание новых сочетанных форм фиксированных препаратов, повышение чувствительности антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов.



Фиг. 1



Фиг. 2

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор В.Петраш

Замовлення 4508

Тираж

Підписне

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