

(19) **KG** (11) **325** (13) **C1**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁶ **G01N 33/50**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(11) 325

(21) 970154.1

(22) 19.11.1997

(46) 30.06.1999, Бюл. №2, 1999

(76) Якель Э.В. (KG)

(56) Материалы VII конференции молодых ученых Ленинградского НИИ антибиотиков. - Ленинград. - 1975. - С. 74-75.

(54) Способ определения чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к микробиологии и может быть использовано при определении чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида. С целью разработки малотрудоемкого, доступного и экономичного способа, определение чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида проводят методом диффузии в стандартной питательной среде (АГВ) с добавлением в нее 4 % глюкозы, с бумажных дисков, содержащих один из полистовых антибиотиков в определенном количестве, засева на среду грибов рода Кандида, выделенных от больных, инкубирования в термостате в течение 1-2 суток, оценки зоны задержки роста и определения степени чувствительности данной культуры. При большей удаленности края зоны задержки роста от центра диска судят о высокой чувствительности, при наименьшей - о нечувствительности. 1 табл., 2 ил.

Изобретение относится к медицине, а именно к микробиологии и может быть использовано при определении чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида.

Известен способ определения активности полиеновых антибиотиков методом диффузии в твердой питательной среде при помощи тест-культуры. (Материалы VII конференции молодых ученых Ленинградского НИИ антибиотиков. - Ленинград, 1975. - С. 74-75).

Но он применим только в эксперименте, не связан с клинической микробиологией и не используется для дифференциации чувствительности к тем или иным полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида, выделенных у больных с кандидозами.

Задача - расширение способа и возможность применения его для дифференциации

чувствительности к тем или иным полиеновым антибиотикам, грибов рода Кандида, выделенных у больных с кандидозами.

Задача решается тем, что определение чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида проводят методом диффузии в твердой питательной среде с добавлением в нее 4 % глюкозы, с бумажных дисков, содержащих один из полистовых антибиотиков в определенном количестве, засева на среду грибов рода Кандида, выделенных от больных, инкубирования в термостате в течение 1-2 суток, оценки зоны задержки роста и определения степени чувствительности данной культуры. При большей удаленности края зоны задержки роста от центра диска судят о высокой чувствительности, при наименьшей - о нечувствительности.

На фиг. 1 приведен график линии регрессии, выражающая зависимость между $\log_2$ МПК нистатина и диаметрами зон задержки роста тест-культур грибов рода Кандида вокруг дисков, содержащих 300 единиц нистатина; на фиг.2 - график линии регрессии, выражающая зависимость между $\log_2$ МПК леворина и диаметрами зон задержки роста тест-культур грибов рода Кандида вокруг дисков, содержащих 300 единиц леворина.

Способ осуществляется следующим образом. Вначале готовят инокулят из чистой 2-х суточной культуры изучаемого штамма, выросшей на поверхности твердой питательной среды. Для этого 2-3 изолированных колоний эмульгируют в 1-2 мл жидкой питательной среды Сабуро. Суспензию разводят физиологическим раствором хлорида натрия до плотности оптического стандарта мутности ГИСК имени Л.А. Тарасевича на 10 единиц, а затем полученную взвесь разводят еще в 10 раз. Инокулят засевают на стандартную твердую среду АГВ, выпускаемую НПО "Питательные среды" (г. Махачкала), дополнительно содержащую 4 % глюкозу для повышения ее питательности и ускорения роста грибов рода Кандида.

Растопленную среду разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм. Перед нанесением инокулята среду просушивают в течение 30-40 минут при комнатной температуре с приоткрытыми крышками. Затем инокулят в объеме 1.5-2 мл пастеровской пипеткой наносят на поверхность среды, равномерно распределяя ее на поверхности путем покачивания чашки. Избыток жидкости удаляют. Приоткрытые чашки с инокулятом опять просушивают при комнатной температуре 10-15 минут. Приготавливают бумажные диски из фильтровальной бумаги диаметром 6 мм (номенклатурный № 39003 ТУ 6-09-16-78-77, поглощаемость влаги 1 диском 0.006 мл) и пропитывают их одним из полиеновых антибиотиков (например, нистатином или леворином), предварительно растворенных в небольшом количестве 96 % этилового спирта и доведенных до необходимого объема стерильной дистиллированной водой (на 0.006 мл раствора по 300 единиц антибиотика). После чего бумажные диски накладывают на поверхность приготовленной питательной среды, чашки помещают в термостат в положении вверх дном и инкубируют 18-24 ч при температуре 37 °С. Вынимают из термостата и помещают вверх дном на темную матовую поверхность. С помощью линейки с точностью до 1 мм измеряют диаметр зоны задержки роста вокруг дисков. При наличии больших колоний по периферии зоны границу определяют по местоположению внутреннего края этой группы колоний.

О степени чувствительности культуры судят по удаленности края зоны, задержки роста от центра диска. При увеличении диаметра зоны возрастает минимальная подавляющая концентрация взятого антибиотика на изучаемый штамм гриба Кандида, т.е. повышается его чувствительность.

Изучено 100 различных культур грибов рода Кандида и определена их чувствительность, в частности, к таким полиеновым антибиотикам, как нистатин и леворин. В результате получены линии регрессии, отражающие зависимость $\log_2$ минимальной подавляющей концентрации (МПК) и диаметрами зоны задержки роста вокруг дисков, содержащих по 300 ед. нистатина и леворина (фиг. 1,2).

Указанные линии регрессии и их уравнения используют для непосредственного

перехода от диаметров зон задержки роста к МПК.

Например, если вокруг диска с нистатином получена зона задержки роста 14 мм, то подставив это значение в уравнение регрессии получим МПК равным 16 ед/мл. То же значение МПК можно найти путем интерпретации Y на X по прямой линии регрессии (фиг.1).

Интерпретацию результатов проводят по разработанной авторами оценочной таблице, по которой изучаемый штамм грибов рода Кандида можно отнести к чувствительному или не чувствительному в отношении изучаемого полиенового антибиотика.

Способ позволяет быстро и с высокой точностью отбирать лекарственные средства с противогрибковым действием для больных кандидозными заболеваниями.

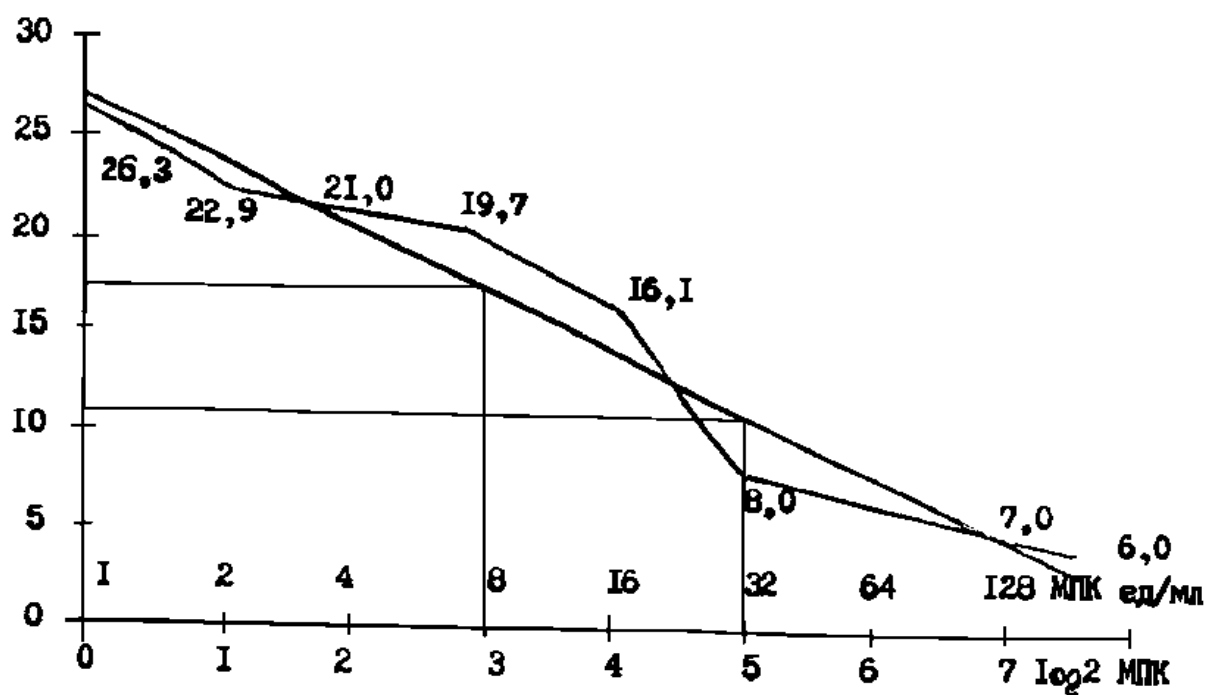
Таблица

Распределение по категории чувствительности грибов рода Кандида

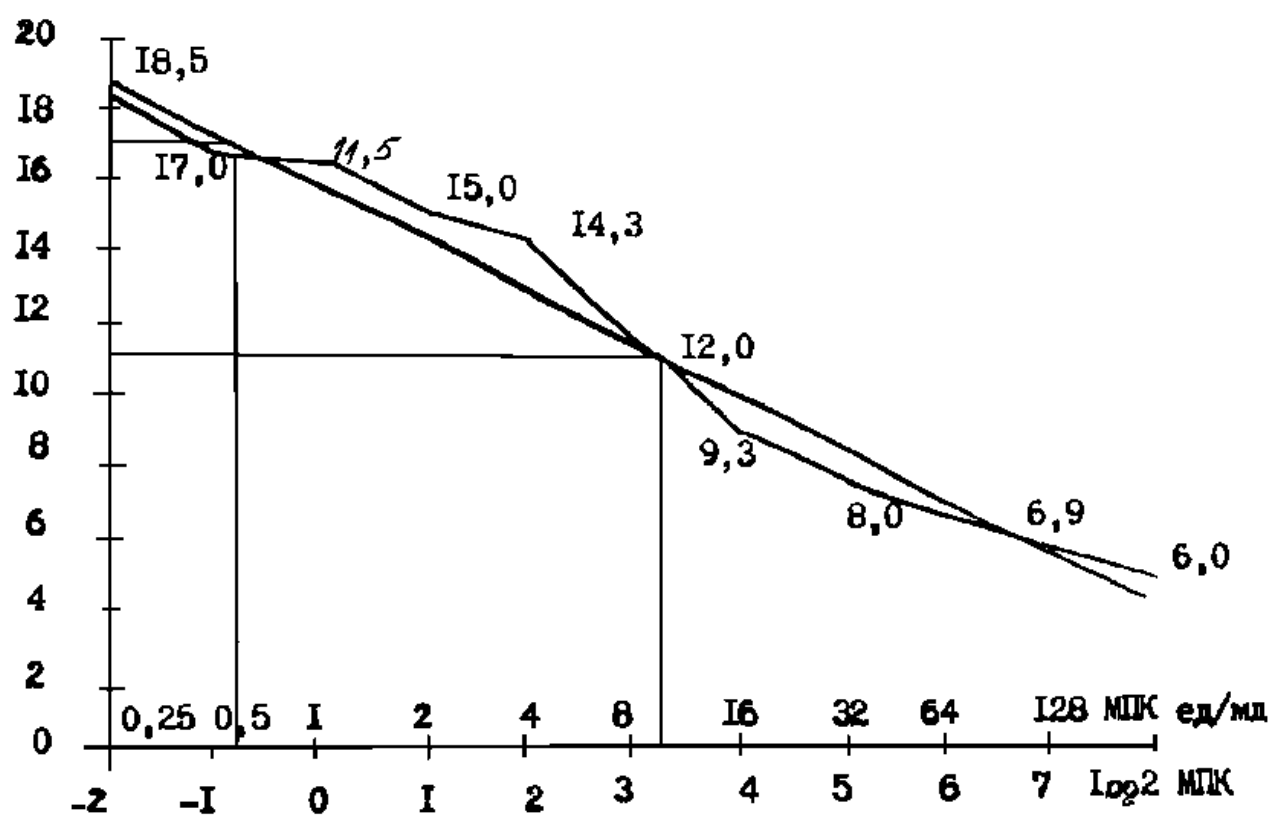
Полиеновый антибиотик	Содержание антибиотика в диске (ед.)	Пограничные значения диаметров зон (мм)		
		Не чувствительные	Промежуточные	Чувствительные
Нистатин	300	≤ 11	11-17	≥ 17
Леворин	300	≤ 12	12-18	≥ 18

Формула изобретения

Способ определения чувствительности к полиеновым антибиотикам грибов рода Кандида методом диффузии в твердой питательной среде, отличающийся тем, что диффузию проводят путем дополнения в твердую питательную среду 4 % глюкозы с бумажных дисков, содержащих один из полиеновых антибиотиков в определенном количестве, засева на среду грибов рода Кандида, выделенных от больных, инкубирования в термостате в течение 1-2 суток, оценки зоны задержки роста и определения степени чувствительности данной культуры, где при большей удаленности края зоны задержки роста от центра диска судят о высокой чувствительности, при наименьшей - о нечувствительности.



Фиг. 1



Фиг. 2

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Кожомкулова Г.А.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03