



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119030** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 02080</p> <p>(22) Дата подання заявки: 06.03.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.09.2017, Бюл.№ 17</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кондратюк Вячеслав Миколайович (UA), Ковальчук Валентин Петрович (UA), Палій Гордій Кіндратович (UA), Кондратюк Олена Петрівна (UA), Буркот Віта Михайлівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 (UA)</p>
--	---

(54) ДИСКО-ДИФУЗІЙНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО БЕТА-ЛАКТАМНИХ АНТИБІОТИКІВ У СТАФІЛОКОКІВ

(57) Реферат:

Диско-дифузійний спосіб визначення механізму резистентності стафілококів до бета-лактамних антибіотиків, при якому на висіві досліджуваної культури стафілококів на м'ясо-пептонному агарі розташовують диск з оксациліном і на відстані 12-15 мм від нього диск фільтрувального паперу, просякненого 0,1 % спиртовим розчином декаметоксину, та визначають наявність зони затримки росту у ділянці зустрічної дифузії оксациліну і декаметоксину у штамів стафілококів, які утворюють бета-лактамазу.

UA 119030 U

Корисна модель належить до медичної мікробіології, зокрема до способів лабораторної діагностики бактерійних інфекцій, а саме є способом виявлення механізму резистентності до бета-лактамних антибіотиків у клінічних штамів стафілококів.

5 Препаратами вибору для лікування стафілококових інфекцій є бета-лактамі антибіотики. Сстійкість стафілококів до цих препаратів пов'язана або з продукцією руйнівних ферментів бета-лактамаз, або з наявністю додаткового пеніцилінзв'язуючого білка (ПЗБ2а), притаманного метицилінрезистентним штамам стафілококів. Синтез пеніцилінзв'язуючих білків кодуються хромосомним геном *tesA*. Цей ген присутній тільки у метицилін- та оксацилінрезистентних штамів стафілококів (як у *S.aureus*, так і у коагулазонегативних (КНС). Вагається, що штам *Staphylococcus spp*, які мають ПЗБ2а, клінічно стійкі до всіх бета-лактамних антибіотиків. Бета-лактамазу продукуючі штамів стафілококів зберігають чутливість до захищених бета-лактамних антибіотиків.

15 Диференціація цих двох механізмів резистентності є важливою, оскільки дозволяє прогнозувати ефективність усього переліку бета-лактамних антибіотиків без оцінки чутливості клінічного штаму до кожного з цих препаратів. Також це впливає на вибір препарату для лікування хворого [Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review / J. Polisena, S. Chen, K. Cimon [et al] // BMC Infectious Diseases. - 2011. - Vol. 11. - P. 336.].

20 Фенотипова резистентність до оксациліну може бути обумовлена кожним з означених вище механізмів, оскільки стійкими до антибіотика є не лише ті варіанти стафілококів, що несуть ген *tesA*, але й штамів здатні до гіперпродукції бета-лактамаз (так звані BORSA-borderline-oxacillin-resistant *S.aureus* - гранично-резистентні штамів). Серед MRS, що стали причиною інфекцій, пов'язаних з необхідністю надання медичної допомоги, частка варіантів BORSA сягає 25 % [Khorvash F. Frequency of *tesA* gene and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* in nosocomial acquired methicillin resistance *Staphylococcus aureus* infections / F. Khorvash., K. Mostafavizadeh, S. Mobasherizadeh // Pak J. Biol Sci. - 2008. - Vol. 1, № 11(9). - P. 1282-1285.].

25 Детекція метицилінрезистентних штамів стафілокока без з'ясування механізму стійкості основана на виявленні фенотипового прояву резистентності при визначенні чутливості штамів диско-дифузійним методом (ДДМ), скринінгом на агарі з оксациліном [Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 "Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів". - К: МОЗ України, 2007. - 63 с.]. Чутливість цих методів становить близько 80 % і більше 95 % відповідно, однак, тестування займає досить багато часу. Встановлення механізму резистентності потребує додаткових лабораторних досліджень і додаткового часу.

35 Золотим стандартом визначення *tesA*-гена вважається ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), однак цей спосіб дослідження доступний тільки для окремих спеціалізованих лабораторій.

40 Згідно з діючою нормативною документацією, найбільш доступним та поширеним способом з'ясування механізму резистентності до бета-лактамних антибіотиків у загальній лабораторній практиці є диско-дифузійний спосіб з використанням дисків з оксациліном та нітроцефіном [Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007]. Поява реакції гідролізу нітроцефіну під дією бета-лактамаз з утворенням забарвленого продукту на паперових дисках вважається чутливим та специфічним тестом. Недоліком є необхідність попередньої індукції синтезу бета-лактамаз бактерій під впливом бензилпеніциліну та/або оксациліну, що збільшує тривалість дослідження на добу.

45 Найближчим до запропонованого способу в загальній лабораторній практиці є диско-дифузійний спосіб з цефокситином. Резистентні до оксациліну за рахунок гіперпродукції бета-лактамаз штамів стафілококів зазвичай чутливі до цефокситину. Цефокситин є сильним індуктором гену *tesA*. Тому, істинно резистентні до оксациліну варіанти цього виду бактерій водночас виявляють стійкість до цефокситину. Певний час ДДМ тест з цефокситином по ефективності прирівнювався до методу ПЛР [Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *tesA* gene for detection of MRSA / K.B. Anand, P. Agrawal, S. Kumar [et al.] // Indian Journal of Medical Microbiology. - 2009. - Vol. 27, № 1. - P. 27-29. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / B. Cauwelier, B. Gordts, P. Descheemaeker [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2004. - Vol. 23. - P. 389-392].

55 Спосіб передбачає виділення чистої культури збудника із клінічного матеріалу згідно зі стандартною процедурою, приготування стандартного інкулюма цієї культури (0,5 Од McF або $1,5 \times 10^8$ КУО/см³), його посів на щільне поживне середовище Мюллера-Хінтона. На підсушену

протягом 10-15 хвилин поверхню наносять стандартні паперові диски з антибактерійними препаратами.

Відразу після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і інкубують при температурі 35 °С протягом 18-24 годин. Врахування результатів проводиться шляхом вимірювання діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів навколо дисків.

До причин, що заважають отриманню бажаного технічного результату, належить те, що чутливість до цефокситину можуть виявляти не тільки штами, що продукують бета-лактамази, а і носії репресованого *tesA* гену, що ускладнює диференціювання механізмів резистентності. По-друге, низька чутливість тесту відносно до коагулазонегативних стафілококів збільшує вірогідність хибних результатів [Palazzo I.C. Evaluation of methods for detecting oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci including cefoxitin disc diffusion /I.C. Palazzo, A.L. Darini // FEMS Microbiol. Lett. - 2006. - Vol. 257. - P. 299-305.].

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виявлення механізму стійкості у метицилінрезистентних штамів стафілококів, в якому за рахунок впливу молекул катіоноактивної ПАР декаметоксину відбувається пряма інактивація мікробного ферменту бета-лактамази.

Декаметоксин - антисептичний препарат, який має широкий спектр антимікробної дії [Decamethaxinum. Декаметоксин. АНД. Реєстраційне посвідчення № П10.02/05401. Наказ МОЗ України від 09.10.02 № 367.].

Поставлена задача вирішується тим, що на висіві досліджуваної культури стафілококів на м'ясо-пептонному агарі розташовують диск з оксациліном і на відстані 12-15 мм від нього диск фільтрувального паперу, просякненого 0,1 % спиртовим розчином декаметоксину, та визначають наявність зони затримки росту у ділянці зустрічної дифузії оксациліну і декаметоксину у штамів стафілококів, які утворюють бета-лактамазу.

Вказані зміни відбуваються при дослідженні культури стафілокока стандартним диско-дифузійним способом з використанням дисків з оксациліном та дисків фільтрувального паперу, просякненого декаметоксином. У штамі, що продукує бета-лактамазу спостерігається зона затримки росту навколо диска з оксациліном в зоні дифузії декаметоксину. У штамі з іншим механізмом резистентності подібного явища не спостерігається, навколо диска з оксациліном чітка відсутність затримки росту.

Спосіб здійснюють таким чином: із клінічного матеріалу виділяють чисту культуру стафілококу згідно зі стандартною процедурою. Готують стандартний інокулюм 40 (0,5 Од МсF), стерильним тампоном наносять його на поверхню агару Мюллера-Хінтона та накладають стандартний диск з оксациліном, а на відстані 12-15 мм диск фільтрувального паперу, просякнений 0,1 % спиртовим розчином декаметоксину і після того висушений. Після аплікації дисків чашки Петрі поміщають в термостат догори дном і інкубують при температурі 35 °С. Через 18 годин інкубації чашки Петрі виймають і в перевернутому положенні враховують наявність і діаметр зон затримки росту навколо дисків. Якщо резистентність до оксациліну обумовлена продукцією бета-лактамаз спостерігається зона затримки росту навколо диска з оксациліном в зоні дифузії декаметоксину. У оксацилінрезистентного штаму, з іншим механізмом резистентності, подібного явища не спостерігається, навколо диска з оксациліном зона затримки росту відсутня, а навколо диска, просякненого декаметоксином, утворюється чітко відмежована зона затримки росту діаметром 10-12 мм.

Технічний результат, якого досягають, полягає у прямому визначенні гіперпродукції бета-лактамаз, як причини метицилінрезистентності штамів стафілококу за рахунок прямої інактивації мікробної бета-лактамази катіоноактивною ПАР декаметоксином.

Для обґрунтування способу, що заявляється, проведено порівняння його специфічності та чутливості з ДДМ з цефокситином та оксациліном по визначенню механізму резистентності у штамів стафілококу з відомою наявністю *tesA* гену.

Вказаними методами встановлювали фенотип оксацилінрезистентності у 24 штамів у *S.aureus* серед яких 16 були *tesA* - позитивні та у 25 штамів коагулазо-негативних стафілококів серед яких були 15 *tesA* - позитивні. Результати тестувань наведені у табл. № 1.

Тест з цефокситином та заявлений спосіб при встановленні механізму резистентності до оксациліну *S.aureus* були однаково ефективні. Проте для визначення метицилінрезистентності серед коагулазо-негативних стафілококів заявлений спосіб виявився кращим за найближчий аналог.

Характеристика чутливості та специфічності способів наведена у табл. № 2. Заявлений спосіб виявив кращу чутливість та специфічність по виявленню метицилінрезистентності серед коагулазо-негативних стафілококів. Виявлення метицилінрезистентності серед *S.aureus* заявленим способом пов'язана з отриманням більшої кількості хибно позитивних результатів.

При цьому чутливість заявленого способу була вище, ніж у диско-дифузійному способі з оксациліном відносно до штамів *S.aureus*.

Таким чином, запропонований засіб є високо специфічним (100 %) та має кращу чутливість ніж існуючі способи для виявлення механізму резистентності у коагулазонегативних стафілококів. Вигідно відрізняється від існуючих способів прогностичною цінністю.

Може бути застосований а процесі лабораторної діагностики для визначення механізму резистентності у метицилінорезистентних штамів стафілокока.

Таблиця № 1

Визначення метицилінрезистентного фенотипу серед *S.aureus* та коагулазо-негативних стафілококів різними способами.

Штами з відомим генотипом, (n)	Кількість штамів, визначених як резистентні різними способами		
	ДДМ ОХС	ДДМ СЕФ	Заявлений спосіб
mecA+S.aureus, (16)	16	14	14
tesA - S.aureus, (8)	8	2	2
tesA + КНС, (15)	15	12	14
tesA-КНСДЮ)	10	2	0

ДДМ ОХС - диско-дифузійний спосіб з оксациліном
 ДДМ СЕФ - диско-дифузійний спосіб з цефокситином
 КНС - коагулазо-негативні стафілококи.

Таблиця № 2

Статистичний аналіз способів визначення метицилінрезистентного фенотипу серед *S.aureus* та CoNS

Спосіб	Чутливість, %		Специфічність, %		Прогностичність позитивного результату, %		Прогностичність негативного результату, %	
	<i>S.aureus</i>	CoNS	<i>S.aureus</i>	CoNS	<i>S.aureus</i>	CoNS	<i>S.aureus</i>	CoNS
ДДМ СЕФ	87,5	80	75	80	87,5	85,71	75	72,73
Заявлений спосіб	87,5	93,33	75	100	87,5	100	75	90,91

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Диско-дифузійний спосіб визначення механізму резистентності стафілококів до бета-лактамних антибіотиків, який **відрізняється** тим, що на висіві досліджуваної культури стафілококів на м'ясо-пептонному агарі розташовують диск з оксациліном і на відстані 12-15 мм від нього диск фільтрувального паперу, просякненого 0,1% спиртовим розчином декаметоксину, та визначають наявність зони затримки росту у ділянці зустрічної дифузії оксациліну і декаметоксину у штамів стафілококів, які утворюють бета-лактамазу.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601