



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2502146

(22) 25.07.2025

(46) Бюл. 231, 2026

(71) Институт проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук (TJ)

(72) Саттори И. (TJ); Абдуллоев А.О. (TJ); Махмудов К.Б. (TJ); Шеров Н.Ф. (TJ); Саттори Ф.И. (TJ); Рахимов А.А. (TJ)

(73) Институт проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук (TJ)

(54) **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ПАТОГЕНОВ К АНТИМИКРОБНЫМ
ПРЕПАРАТАМ**

(56)

1.Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания (МУК 4.2.1890-04). – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

2.Brown DF, Brown L , Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity J Antimicrob Chemother,1991 Feb;27(2):185-90. doi: 10.1093/jac/27.2.185

3.Microbus.ru/neus/e-testy-dlya.otsenki antibioticoresistentnosti 19/04/2022

2

4 Патент №2505813 Российская Федерация, МПК G01N 33/48(2006.01), C12Q 1/18(2006.01). Способ определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным веществам: №2012147280/15: заявл. 06.11.2012: опубл. 27.01.2014 / Тец В.В., Тец Г.В.

(57) Изобретение относится к ветеринарной медицине и микробиологии и предназначено для количественного определения чувствительности патогенов к антимикробным препаратам. Способ обеспечивает повышение эффективности и доступности определения чувствительности микроорганизмов из патологического материала или чистой монокультуры, в том числе при комбинированном применении препаратов. Сущность способа заключается в предварительном культивировании бактерий в бульоне Китта–Тароцци, обогащённом белково-минеральными веществами, с последующим внесением стандартизированной суспензии микроорганизмов в тёплый агар Китта–Тароцци и введением восьми концентраций антимикробного препарата. Для грибов используют бульон и агар Сабуро, обогащённые минеральными веществами, с аналогичным введением антигрибковых препаратов. После инкубации чувствительность определяют по диаметрам зон подавления роста и значениям минимальной подавляющей концентрации.

Изобретение относится к способам количественного определения чувствительности патогенов, вызывающих болезни животных и птиц, к отдельным антимикробным препаратам и их сочетаниям, может быть использовано в ветеринарной медицине и микробиологии.

Инфекционные болезни, возбудителями которых являются патогенные микроорганизмы (бактерии, вирусы, грибы), распространенные среди поголовья животноводческих и птицеводческих хозяйств различных форм собственности, в том числе личных подсобных хозяйств Республики Таджикистан. Возбудителей инфекции диагностируют как в отдельности, так и в различных ассоциациях, а доминирование последних обуславливает необходимость комплексности лечебно-профилактических мероприятий, эффективность которых определяется чувствительностью патогенов к антимикробным препаратам. При проведении ветеринарных мероприятий особую значимость имеет проблема широкого распространения антибиотикорезистентных штаммов среди животных и птиц в результате бессистемного применения различных классов и поколений этих препаратов.

Чистую культуру возбудителя болезни выделяют и идентифицируют в течение не менее 5 сут, тогда как инфекционный процесс в зависимости от вирулентности патогена может развиваться значительно быстрее, учитывая плотность поголовья, особенно в птицеводстве, в котором ежедневный падеж может превышать несколько тысяч птиц. Поэтому разработка доступного и экономичного, в том числе ускоренного способа количественного определения чувствительности патогенов к антимикробным препаратам и их комбинациям имеет научно-практическую, включая экономическую значимость.

Известны методы серийных разведений в агаре или в бульоне, причем в зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют способы серийных макро- и микроразведений. В автоматизированных системах для определения чувствительности микроорганизмов используется способ, основанный на использовании только пограничных значений МПК [1].

Несмотря на точность и информативность, постановка в практических лабораториях методов серийных разведений сопряжена со значительными методическими трудностями, являющимися недостатками этих методов: использование субстанций антибиотиков с известным уровнем активности, строгое соблюдение режимов хранения и тщательный контроль качества питательных сред, определение чувствительности только чистой культуры патогена, невозможность определения помесячно-устойчивых патогенов

Известен диффузионный метод – Е-тест – для количественного определения чувствительности, основанные на диффузии из носителя в плотную питательную среду антибактериального препарата (АБП), подавляющего рост испытуемой чистой

монокультуры патогена в зоне, в которой концентрация АБП превосходит МПК [2,3].

Недостатками этого метода являются недоступность по цене, определение чувствительности только чистой монокультуры патогена, невозможность применения способа при определении чувствительности микроорганизмов и их ассоциаций из патматериала, бактерицидной активности антибиотиков при комбинированном использовании

Известен способ, взятого в качестве прототипа настоящего изобретения, определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным веществам, при котором осуществляют забор биологического материала, инкубацию содержащихся в нем микроорганизмов на обогащенной плотной питательной среде, введение в питательную среду исследуемого антимикробного вещества до начала культивирования микроорганизмов в концентрации, близкой к максимально достижимой в месте забора биологического материала, оценку результата после появления видимого роста микроорганизмов в контрольном посеве [4].

Недостатками этого способа, являются значительные трудовые и материальные затраты, определение только чувствительности микроорганизмов из биологического материала к максимальной дозе антимикробного препарата, невозможность выявления промежуточно-устойчивых микроорганизмов, неиспользование метода при определении чувствительности чистых культур, определении активности антимикробных препаратов при комбинированном применении.

Настоящее изобретение позволяет количественно определить действенную дозу антимикробного препарата для повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий при инфекционных болезнях животных и птиц.

В соответствии с настоящим для определения чувствительности патогенов (бактерий) к антимикробным препаратам, патологический материал или чистую монокультуру патогена засевают в бульон Китта–Тароцци, обогащенный белково-минеральными веществами, 6 ч инкубируют (37°C), после чего суспензию культур микроорганизмов (концентрация – 10^5 м.к./мл) вносят в обогащенный белково-минеральными веществами теплый (48 – 50°C) агар Китта–Тароцци, перемешивают и разливают засеянную плотную питательную среду в чашки Петри по 25 мл, в которую (48 – 50°C) сразу по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга вводят 8 концентраций (по 0,1 мл) антимикробного препарата, 16 – 18 ч инкубируют (37°C).

При определении чувствительности патогенов (грибов) к антимикробным препаратам, патологический материал или чистую монокультуру патогена (гриба) засевают в бульон Сабуро, обогащенный минеральными веществами, культуральную суспензию грибов через 12 ч

инкубации (25°C) вносят в теплый (48 – 50°C) агар Сабуро, обогащенный минеральными веществами, разливают засеянную плотную питательную среду по 25 мл в чашки Петри, сразу вводя в нее (48 – 50°C) по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга 8 концентраций (по 0,1 мл) антигрибкового препарата, 36 – 48 ч инкубируют (25°C).

Результаты количественного определения чувствительности антимикробных препаратов интерпретируют по критериям соответствия пограничных значений диаметров зон подавления роста (мм) и минимальной подавляющей концентрации (МПК, мкг/мл).

Заявителем не выявлены способы определения чувствительности патогенов к антимикробным препаратам, идентичные заявленному, что позволяет сделать вывод о соответствии изобретения условию «Новизна».

Принципиально новой основой заявленного способа является оригинальный метод количественного определения чувствительности микроорганизмов из патологического материала и чистой монокультуры патогена к отдельным и комплексным антимикробным препаратам.

По разработанной методике при количественном определении чувствительности к антимикробным препаратам размножение патогенов – микроорганизмов патматериала или чистой монокультуры – происходит в благоприятных условиях: сначала в жидкой для достижения необходимой концентрации, затем в обеспечивающей равномерный рост плотной питательной среде. Введение восьми различных концентраций антимикробного препарата в теплую (48 – 50°C) засеянную плотную питательную среду в количестве 0,1 мл обеспечивает равномерное распределение.

Выявленные новые свойства заявленного способа свидетельствует, о его соответствии требованию патентоспособности «Изобретательский уровень».

Практическое применение заявленного способа подтверждают следующие опыты.

Пример 1. Содержимое кишечника и соскобы с её слизистой оболочки павшего от диареи теленка разводили физиологическим раствором (1:10), надосадочную жидкость засевали в бульон Китта–Тароцци, обогащенный белково-минеральными веществами, 6 ч инкубировали (37°C). В мазках из бульонной культуры, окрашенных по Граму, выявлены грамотрицательные и грамположительные палочки, кокки и стафилококки.

Указанную культуральную суспензию вводили в теплый (48 – 50°C) обогащенный белково-минеральными добавками агар Китта–Тароцци, засеянную плотную питательную среду по 25 мл разливали в чашки Петри; сразу по 0,1 мл вводили в нее по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга 8 концентраций (от 200 до 1,5 мг/мл) антибиотика оксипрол.

Контроль: а) чистый агар Китта–Тароцци, б) засеянный агар Китта–Тароцци без антибактериального препарата.

Через 16-18 ч инкубации зона задержки роста культур микроорганизмов при концентрации оксипрола 25 мкг/мл составила 23 мм, что свидетельствует о чувствительности к нему испытанных патогенов.

Пример 2. Опыт проводили аналогично примеру 1, используя комбинацию антибиотиков оксипрол и эритромицин (соотношении – 3:1) в концентрациях от 200 до 1,5 мг/мл.

Спустя 16- 18 ч инкубации зона задержки роста культур микроорганизмов при концентрации комбинации оксипрола и эритромицина 12,5 мкг/мл составила 24 мм: патогены оказались чувствительны к меньшей в сравнении с результатами примера 1 концентрации, что определяет целесообразность комплексного применения этих антимикробных препаратов.

Пример 3. Опыт проводили аналогично примеру 1, используя в качестве чистой культуры штамм ЕС 19 TJ *Escherichia coli*, зона задержки роста которого через 16-18 ч инкубации при концентрации оксипрола 12,5 мкг/мл составила 24 мм, что указывает на чувствительность этого штамма.

Пример 4. Штамм SD 05 TJ *Salmonella dublin* засевали в бульон Китта–Тароцци, обогащенный белково-минеральными веществами, 6 ч инкубировали (37°C); культуральную суспензию вводили в теплый (48 – 50°C) обогащенный белково-минеральными веществами агар Китта–Тароцци, засеянную плотную питательную среду по 25 мл разливали в чашки Петри, сразу по 0,1 мл вводили в нее по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга 8 концентраций (от 200 до 1,5 мг/мл) комбинации антибиотиков оксипрол и эритромицин (соотношение – 3:1). Контроль аналогичен описанному в примере 1.

Спустя 16-18 ч инкубации зона задержки роста испытанного штамма при концентрации испытанной комбинации антибиотиков 6,2 мкг/мл составила 26 мм, что свидетельствует о его чувствительности.

Пример 5. Штамм Cch 23 TJ *Clostridium chavoei* засевали в бульон Китта–Тароцци, обогащенный белково-минеральными веществами, 6 ч инкубировали (37°C); культуральную суспензию вводили в теплый (48 – 50°C) обогащенный белково-минеральными веществами агар Китта–Тароцци, засеянную плотную питательную среду по 25 мл разливали в чашки Петри, сразу по 0,1 мл вводили в нее по диаметру посуды на расстоянии 10 мм друг от друга 8 концентраций (от 200 до 1,5 мг/мл) комбинации антибиотиков оксипрол и эритромицин (соотношение – 3:1). Контроль аналогичен описанному в примере 1.

После 18 ч инкубации (37°C) в анаэробе зона задержки роста испытанного штамма при концентрации испытанной комбинации антибиотиков 12,5 мкг/мл составила 26 мм, что указывает на его чувствительность.

Пример 6. Изолят *Candida albicans* засевают в бульон Сабуро, обогащенный минеральными веществами, культуральную суспензию через 12 ч инкубации (25°C) вносят в теплый (48 – 50°C) агар Сабуро, обогащенный минеральными веществами, разливают засеянную плотную питательную среду по 25 мл в чашки Петри, сразу вводя в нее (48 – 50°C) по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга по 0,1 мл 8 концентраций (от 1000 до 15,6 ЕД /мл) нистатина.

Контроль: а) чистый агар Сабуро, б) засеянный агар Сабуро без антигрибкового препарата.

Через 36 – 48 ч инкубации (25°C) зона задержки роста испытанного изолята при

концентрации нистатина 62,5 ЕД/мл составила 19 мм (чувствительный).

Таким образом, доступность (не требуется специальное оборудование, исключаются специфические тесты) и экономичность (материальная и темпоральная) предложенного способа обуславливают его широкое практическое применение в ветеринарных лабораториях различных уровней. Заявленный способ применим при определении чувствительности патогенов и их ассоциаций к отдельным антимикробным препаратам, в том числе при комплексном их применении, что повышает эффективность лечебно-профилактических мероприятий при инфекционных болезнях животных и птиц.

Формула изобретения

1. Способ количественного определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, включающий культивирование микроорганизмов в питательной среде, введение антимикробного препарата и оценку чувствительности по подавлению роста, отличающийся тем, что патологический материал или чистую монокультуру патогена предварительно засевают в жидкую питательную среду и инкубируют до достижения концентрации микроорганизмов порядка 10^5 микробных клеток/мл, после чего полученную суспензию вносят в теплую плотную питательную среду при температуре 48–50°C, перемешивают, разливают по 25 мл в чашки Петри и в засеянную плотную питательную среду по диаметру чашки на расстоянии 10 мм друг от друга вводят пипеткой восемь различных концентраций антимикробного препарата по 0,1 мл каждая, затем инкубируют и определяют чувствительность микроорганизмов по диаметрам зон задержки роста, соответствующим минимальной подавляющей концентрации (МПК).

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для определения чувствительности бактерий в качестве жидкой и плотной питательной среды используют бульон и агар Китта–Тароцци, обогащенные белково-минеральными веществами, при инкубации при температуре 37°C в течение 16–18 ч.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для определения чувствительности грибов патологический материал или чистую монокультуру патогена засевают в бульон Сабуро, обогащенный минеральными веществами, инкубируют при температуре 25°C в течение 12 ч, после чего культуру пересевают в теплый агар Сабуро и инкубируют при температуре 25 °C в течение 36–48 ч.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что чувствительность микроорганизмов определяют в диапазоне концентраций антимикробного препарата, обеспечивающем выявление чувствительных, промежуточно-устойчивых и резистентных штаммов.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что количественно определяют чувствительность микроорганизмов, содержащихся в патологическом материале, а также чистых монокультур патогенов.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что определяют чувствительность микроорганизмов к отдельным антимикробным препаратам и их комбинациям.

Компьютерный набор: Газиев М.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а		