

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТЕЙ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ІМУНОЛОГІЧНИХ РЕАКЦІЙ

Т.М. Бойчук, І.П. Бурденюк, В.Ф. Мислицький, І.І. Заморський

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

Ключові слова:

*активність,
антимікробні
препарати,
імунологічні
реакції.*

Клінічна та
експериментальна
патологія Т.17, №1
(63). С.17-22.

DOI:10.24061/1727-
4338.XVII.1.63.2018.70

E-mail: if_dermven
@ukr.net

Мета роботи - виготовлення пристрою для отримання серій стандартних живильних агарових блоків, призначених для дослідження антимікробної активності розчинів біологічно активних речовин: антимікробних хіміопрепаратів і антибіотиків. **Матеріал і методи.** Вузол виготовлений із органічного скла і тефлону і який сумісно з чашкою Петрі утворює пресформу. Кришка-корпус, із центральним різьбовим отвором, виготовлена з органічного скла, призначена для щільного закриття чашки Петрі з розрахованою кількістю розплавленого живильного агару, в процесі виготовлення живильних агарових блоків, а також для фіксації у потрібному положенні робочого диска зі штирами за допомогою з'єднувального гвинта-рукоятки. **Результати.** Принцип роботи пристрою: у чисту стерильну чашку Петрі вносять розраховану необхідну (частіше 18-20 мл) кількість розплавленого і охолодженого до 45-43°C стерильного живильного агару. Потім у субстрат занурюють збірний вузол пристрою з необхідним для цього дослідження змінним робочим диском. Стерилізація вузла досягається зануренням його робочої частини (пуансонів) у чашку Петрі з 20-25 мл 96° етанолу на 10-15 хвилин до початку роботи. Через 5-7 хвилин при кімнатній температурі після затвердіння агару підняттям рукоятки штамп легко вивільнюється із субстрату і готовий до чергового його використання. В агаровій пластинці залишаються чітко сформовані стандартні лунки об'ємом від 0,1 до 0,5 мл. Геометрична форма і об'єм лунок залежить від форми штирів- пуансонів та глибини їх занурення з'єднуючим гвинтом рукоятки. Провівши посіви культур мікроорганізмів на поверхню утворених у такий спосіб живильних блоків, у лунки вносять відомі кількості досліджуваних антибіотиків або ж інших антимікробних препаратів. Об'єм центральної лунки дозволяє вивчати поєднану дію різних комбінованих антибактеріальних препаратів та антибіотиків. Уже через 6-8 годин термостатування посівів при 37°C чітко визначаються зони затримки росту, розміри яких пропорційні ступеню активності досліджуваного препарату. Кінцеві результати враховують через 18-24 год. **Висновки.** За допомогою пристрою можна: проводити відбір антибактеріальних препаратів з використанням т-культур стандартних штамів мікроорганізмів; за малий проміжок часу визначати чутливість свіжовиділених, або ж музейних штамів мікроорганізмів до розчинів антимікробних препаратів. Визначати сумісну антимікробну дію антибіотиків та інших протимікробних препаратів у одному досліді, вирішувати проблему дефіциту необхідних стандартних дисків антибіотиків, особливо нових вітчизняних та імпортованих препаратів. Виключати можливість проникнення капілярним шляхом розчинів досліджуваних препаратів між пластиною живильного агару та поверхнею чашки Петрі та їх нерівномірного розподілу внаслідок наявності даного прошарку в сформованих лунках. Виявляти наявність гаптенів у досліджуваних матеріалах, або ж виявити наявність специфічних преципітуючих антитіл у сироватці хворих або вакцинованих людей із застосуванням реакцій преципітації в аґіризованих гелях типу реакції Оухтерлоні (подвійної дифузії). Економити час, препарати, поживні середовища, лабораторний посуд, розчинники, антисептичні препарати, електроенергію та ряд інших матеріалів.

Ключевые слова:

*активность,
антимикробные
препараты,
иммунологические
реакции.*

Клиническая и
экспериментальная
патология Т.17, №1
(63). С.17-22.

Клінічна та експериментальна патологія. 2018. Т.17, №1 (63)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИМУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Т.М. Бойчук, И.П. Бурденюк, В.Ф. Мыслицкий, И.И. Заморский

Цель работы - изготовление устройства для получения серий стандартных питательных агаровых блоков, предназначенные для исследования антимикробной активности растворов биологически активных веществ: антимикробных химиопрепаратов и антибиотиков. **Материал и методы.** Узел изготовлен из органического стекла и тефлона, который совместно с чашкой Петри составляет пресс-форму. Крышка-корпус с центральным резьбовым отверстием изготовлена из органического стекла предназначена для плотного закрытия чашки Петри с рас-

ISSN 1727-4338

<https://www.bsmu.edu.ua>

считанным количеством расплавленного питательного агара, в процессе изготовления питательных агаровых блоков, а также для фиксации в нужном положении рабочего диска со штырями с помощью соединительного винта-рукоятки. **Результаты.** Принцип работы устройства заключается в следующем. В чистую стерильную чашку Петри вносят расчетную необходимую (чаще 18-20 мл) количество расплавленного и охлажденного до 45-43°C стерильного питательного агара. После этого в субстрат погружают сборный узел устройства с необходимым для данного исследования сменным рабочим диском. Стерилизация узла достигается погружением его рабочей части (пуансонов) в чашку Петри с 20-25 мл 96% этанол на 10-15 минут до начала работы. Через 5-7 минут при комнатной температуре после затвердевания агар поднятением рукоятки штамп легко освобождается из субстрата и готов к очередному его использованию. В агаровой пластинке остаются четко сформированы стандартные лунки объемом 0,1 до 0,5 мл. Геометрическая форма и объем лунок зависит от формы штырей-пуансонов и глубины их погружения соединяющим винтом рукояткой. Проведя посевы культур микроорганизмов на поверхность при приготовленный таким образом питательных блоков, в лунки вносят известные количества исследовательских антибиотиков или других антимикробных препарат. Объем центральной лунки позволяет изучать объединенное действие различных комбинированных антибактериальных препаратов и антибиотиков. Уже через 6-8 часов термостатирования посевов при 37°C четко определяются зоны задержки роста, размеры которых пропорциональны степени активности исследуемого препарата. Конечные результаты учитывают через 18-24 часа. **Выводы.** С помощью устройства можно проводить отбор антибактериальных препаратов с использованием т-культур стандартных штаммов микроорганизмов; за малый промежуток времени определять чувствительность свежесыведенных, или музейных штаммов микроорганизмов к растворам антимикробных препаратов. Определять совместное антимикробное действие антибиотиков и других противомикробных препаратов в одном опыте, решать проблему дефицита необходимых стандартных дисков антибиотиков, особенно новых отечественных и импортных препаратов. Исключать возможность проникновения капиллярным путем растворов исследуемых препаратов между пластиной питательного агара и поверхностью чашки Петри и их неравномерного распределения благодаря наличию данного слоя в сложившихся лунках. Устройство позволяет выявить наличие гаптенов в исследовательских материалах, или же выявить наличие специфических прицепитующих антител в сыворотке больных или вакцинированных людей с применением реакций преципитации в агаризованных гелях типа реакции Оухтерлони (двойной диффузии). Экономит время, препараты, питательные среды, лабораторные сосуды, растворители, антисептические препараты, электроэнергию и ряд других материалов.

Key words:
activity,
antimicrobial
drugs,
immunological
reactions.

DETERMINATION OF ACTIVITY OF ANTIMICROBIC PREPARATIONS OF IMMUNOLOGICAL REACTIONS

T.M. Boichuk, I.P. Burdenyuk, V.F. Myslytsky, I.I. Zamorsky

The purpose of the work - the production of a device to obtain obtain a series standard nutrient agar blocks designed for studing the antimicrobial activity of solutions of biologically active substances: antimicrobial chemotherapies and antibiotics.

Material and methods. The knot is made of organic glass and teflon, which, in conjunction with the Petri dish, forms a mold. The lid housing with a central threaded hole is made of organic glass designed for close-fitting of a Petri dish with a calculated amount of molten nutritive agar, in the process of producing nutrient agar blocks, as well as for fixing the working disk with pins using a connecting screw-handle in the desired position. **Results.** The principle of operation of the device is as follows. The calculated (more often 18-20 ml) amount of sterile nutrient agar melted and cooled to 45-43°C is brought into a clean sterile Petri dish. Subsequently, the combined knot of the device with the necessary working disk for the given study is immersed into substrate. The sterilization of the knot is achieved by immersing its working part (punches) into a Petri dish with 20-25 ml 96% ethenol for 10-15 minutes before starting work. After 5-7 minutes at room temperature after agar hardening, the stamp is easily released from the substrate by lifting the handle and ready for its next use. In the agar plate, standard holes with a volume of 0.1 to 0.5 ml are clearly formed. The geometric shape and volume of the holes

Clinical and
experimental
pathology. Vol.17,
№1 (63). P.17-22.

depends on the shape of the pivot-punches and the depth of their immersion by connecting the screw with the handle. After cultivating cultures of microorganisms on the surface with the nutrition blocks prepared in this way, known amounts of research antibiotics or other antimicrobial agents are introduced into the wells. The volume of the central well allows to study the combined effect of various combined antibacterial drugs and antibiotics. In 6-8 hours of crops thermostating at 37°C, zones of growth retardation are clearly defined, the sizes of which are proportional to the degree of activity of the investigated solid preparation. The final results are taken into account in 18-24 hours. **Conclusion.** Using the device, it is possible to select antibacterial preparations using t-cultures of standard strains of microorganisms; for a short period of time to determine the sensitivity of freshly isolated, or museum strains of microorganisms to solutions of antimicrobial agents. To determine the joint antimicrobial action of antibiotics and other antimicrobial agents in one experiment, to solve the problem of deficiency of the necessary standard antibiotic disks, especially new domestic and imported drugs. To exclude the possibility of capillary penetration of solutions of investigational drugs between the plate of nutrient agar and the surface of the Petri dish and their uneven distribution due to the presence of this layer in the formed wells. The device can detect the presence of haptens in the test materials, or detect the presence of specific susceptible antibodies in the serum of patients or vaccinated people with the use of precipitation reactions in agarized gel of the Ouchterlon reaction type (double diffusion). To save time, drugs, nutrients, laboratory utensils, solvents, antiseptics, electricity and a number of other materials.

Вступ

Для визначення активності і сили дії антимікробних препаратів використовують живильні середовища відповідних за своїм складом досліджуваному тест-мікроорганізму. Оцінка чутливості мікробів до антибіотиків та вивчення їх фармакокінетики в організмі хворого є основними лабораторними показниками, які при їх співставленні дозволяють прогнозувати ефективність антибактеріальної терапії. Крім того, результати визначення антибіочутливості використовують як маркер, що дозволяє виявляти та контролювати зміни антибіотикограми збудників у динаміці, використовувати детермінанти резистентності, які найчастіше зустрічаються, або їх сполучення як додаткові маркери при діагностиці внутрішньолікарняних інфекцій, для виявлення джерел інфікування та шляхів розповсюдження полірезистентних штамів. Як зазначають Е.А. Ведоміна, Н.М. Фурер [1] у живильних середовищах розводять досліджувальний препарат і у два рази зменшують його концентрацію, а потім у кожному із пробірок титраційного ряду додають однакову кількість мікроорганізмів і інкубують у термостаті. Однак метод двократних серійних розведень у рідкому живильному середовищі є досить трудомісткий і не економічний. У лабораторній практиці використовують визначення чутливості бактерій до антибіотиків у клінічних лабораторіях за допомогою стандартних панерових дисків виготовлених заводами медичних препаратів [2]. Даний спосіб не дозволяє визначати мінімальні інгібуючі концентрації препаратів в інтервалі між двома суміжними пробірками титраційного ряду. Застосування методу стандартних паперових дисків ускладнюється тим, що бактеріологічні лабораторії не забезпечені достатньою кількістю і асортиментом вказаних дисків антибіотиків. Для нових антибіотиків та інших антимікробних хіміопрепаратів диски взагалі відсутні, що виключає можливість використовувати даний метод. На результати дослідження стандартних дисків суттєво впливає вологість, товщина живильного агару, а також час виго-

Клінічна та експериментальна патологія. 2018. Т.17, №1 (63)

товлення дисків. У фармакокінетиці оцінка чутливості мікробів до антибіотиків в організмі хворого є основним лабораторним показником, який при їх співставленні дозволяє прогнозувати ефективність антибактеріальної терапії [3-5].

Мета роботи

Виготовлення пристрою для отримання серій стандартних живильних агарових блоків, призначених для дослідження антимікробної активності розчинів біологічно активних речовин: антимікробних хіміопрепаратів і антибіотиків.

Матеріал і методи дослідження

Вузол виготовлений із органічного скла і тефлону, який сумісно з чашкою Петрі складає пресформу. Кришка-корпус з центральним різьбовим отвором виготовлена із органічного скла призначена для щільного закриття чашки Петрі з розрахованою кількістю розплавленого живильного агару, в процесі виготовлення живильних агарових блоків, а також для фіксації у потрібному положенні робочого диска зі штирями за допомогою з'єднувального гвинта-рукоятки.

Результати та їх обговорення

Пристрій являє собою збірний вузол виготовлений із органічного скла і тефлону, який сумісно з чашкою Петрі складає пресформу. На рисунку показано пристрій для визначення активності антимікробних препаратів та імунологічних реакцій у розбірному вигляді.

Кришка-корпус 1 з центральним різьбовим отвором виготовлена із органічного скла призначена для щільного закриття чашки Петрі 4 з розрахованою кількістю розплавленого живильного агару, в процесі виготовлення живильних агарових блоків, а також для фіксації у потрібному положенні робочого диска 2 зі штирями за допомогою з'єднувального гвинта-рукоят-

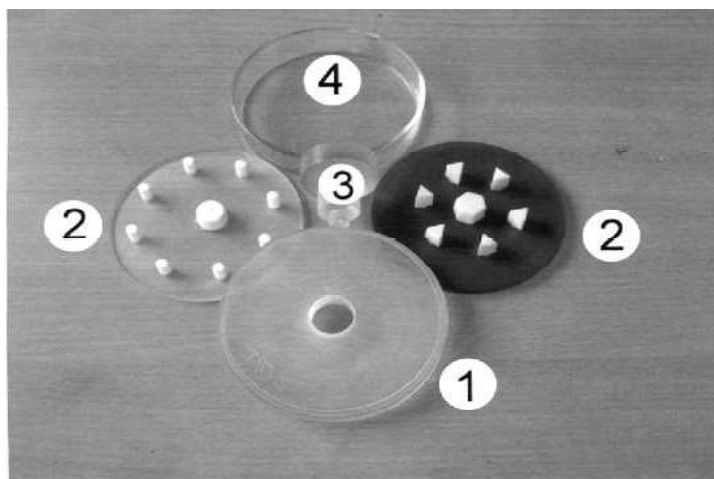


Рисунок. Пристрій для визначення активності антимікробних препаратів та імунологічних реакцій: 1- кришка-корпус; 2 - змінні робочі диски зі штирями-пуансонами; 3 - з'єднуючий гвинт-рукоятка; 4 - чашка Петрі

ки 3. Робочий диск з пуансонами 2: у нього на однаковій відстані по радіусу і між собою по колу тефлонівими штирями-пуансонами виготовлений із органічного скла і служить для формування стандартних лунок в живильній агаровій пластинці. З'єднуювальний гвинт-рукоятка 5, який являє собою двохрізбовий стержень з головкою 6, з'єднуючий кришку-корпус 1 пристрою з робочим диском 2 і центральною гайкою-пуансоном 7. За допомогою гвинта 8 визначають глибину занурення тефлонових гідрофобних штирів 8 у агарову пластинку. Гайка-пуансон 7 виготовлена із тефлону з'єднує робочий диск 2 з ругуючим гвинтом 8 і формує центральну лунку в живильному агаровім блоці.

Принцип роботи пристрою полягає в наступному. У чисту стерильну чашку Петрі вносять розраховану необхідну (частіше 18-20 мл) кількість розплавленого і охолодженого до 45-43°C стерильного живильного агару. Після цього в субстрат занурюють збірний вузол пристрою з необхідним для даного дослідження змінним робочим диском. Стерилізація вузла досягається зануренням його робочої частини (пуансонів) у чашку Петрі з 20-25 мл 96° етанолу на 10-15 хвилин до початку роботи. Через 5-7 хвилин при кімнатній температурі після затвердіння агару підняттям рукоятки штамп легко вивільнюється із субстрату і готовий до чергового його використання. В агаровій пластинці залишаються чітко сформовані стандартні лунки об'ємом від 0,1 до 0,5 мл. Геометрична форма і об'єм лунок залежить від форми штирів-пуансонів та глибини їх занурення з'єднуючим гвинтом рукояткою.

Виготовлені таким способом живильні агарові блоки в чашках Петрі накриваються стерильними кришками і готові до частого використання, або ж зберігаються в холодильнику до чергового її використання.

Провівши посіви культур мікроорганізмів на поверхню при зготовлених таким чином живильних блоків, у лунки вносять відомі кількості досліджувальних антибіотиків або ж інших антимікробних препаратів. Об'єм центральної лунки дозволяє вивчати поєднану дію різних комбінованих антибактеріальних препаратів та антибіотиків. Вже через 6-8 годин термостатування посівів при 37°C чітко визначаються зони затримки росту, розміри

яких пропорційні ступеню активності досліджу вального препарату. Кінцеві результати враховують через 18-24 год.

Висновки

1. За допомогою пристрою можна проводити відбір антибактеріальних препаратів з використанням ентільних штамів мікроорганізмів; за малий проміжок часу визначати чутливість свіжовиділених, або ж музейних штамів мікроорганізмів до розчинів антимікробних препаратів.

2. Визначати сумісну антимікробну дію антибіотиків та інших протимікробних препаратів у одному досліді, вирішувати проблему дефіциту необхідних стандартних дисків антибіотиків, особливо нових вітчизняних та імпортованих препаратів.

3. Виключати можливість проникнення капілярним шляхом розчинів досліджу вальних препаратів між пластиною живильного агару і поверхнею чашки Петрі і їх нерівномірного розподілу завдяки наявності даного прошарку в сформованих лунках.

4. Пристрій дозволяє виявити наявність гаптенів у досліджувальних матеріалах, або ж виявити наявність специфічних прицепітуючих антитіл у сироватці хворих або вакцинованих людей із застосуванням реакцій преципітації в агіризованих гелях типу реакції Оухтерлоні (подвійної дифузії).

5. Економити час, препарати, поживні середовища, лабораторний посуд, розчинники, антисептичні препарати, електроенергію та ряд інших матеріалів.

Перспектива подальших досліджень полягає у використанні пристрою в лабораторних дослідженнях.

Список літератури

1. Жуков-Вережников НН, редактор. Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. В 10 т. Москва: Медицина; 1964. Т. ; Лабораторные исследования антибиотиков; 674 с.

2. Бюргер МО, редактор. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. 3-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина; 1982. 464 с.

3. Ситник Ю, Клименко СІ, Творко МС. Микробиологія, вірусологія та експериментальна патологія. 2018. Т.17, №1 (63)

сологія, імунологія: підручник. Тернопіль: Укрмедкнига; 1998. 391 с.

4. Пяткін КД, Кривошеїн ЮС. Мікробіологія з вірусологією та імунологією: підручник. Київ: Вища школа; 1992. 433 с.

5. Климнюк СІ, Ситник ІО, Творко МС, Широкобоков ВП. Практична мікробіологія: посібник. Тернопіль: Укрмедкнига; 2004. 440 с.

References

1. Zhukov-Verezhnikov NN, redaktor. Rukovodstvo po mikrobiologii, klinike i epidemiologii infektsionnykh bolezney [Manual on Microbiology, Clinic and Epidemiology of Infectious Diseases]. V 10 t. Moskov: Meditsina; 1964. T. ; Laboratornye issledovanie antibiotikov; 674 s. (in Russian)

2. Byurger MO, redaktor. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya [Handbook of microbiological and virological methods of research]. 3-e izd., pererab. i dopol. Moskov: Meditsina; 1982. 464 s. (in Russian)

3. Sytnyk IO, Klymniuk SI, Tvorco MS. Mikrobiolohiia, virusolohiia, imunolohiia [Microbiology, virology, immunology]: pidruchnyk. Ternopil': Ukrmedknyha; 1998. 391 s. (in Ukrainian)

4. Piatkin KD, Kryvoshein YuS. Mikrobiolohiia z virusolohiieiu ta imunolohiieiu [Microbiology with virology and immunology]: pidruchnyk. Kiev: Vyscha shkola; 1992. 433 s. (in Ukrainian)

5. Klymniuk SI, Sytnyk IO, Tvorco MS, Shyrokobokov VP. Praktychna mikrobiolohiia [Practical microbiology]: posibnyk. Ternopil': Ukrmedknyha; 2004. 440 s. (in Ukrainian)

Відомості про авторів:

Бойчук Т.М. - д.мед.н., професор, ректор Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет", професор кафедри гістології, цитології та ембріології.

Бурденюк І.П. - к.мед.н., ас. кафедри мікробіології та вірусології Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет".

Мислицький В.Ф. - д.мед.н., професор, професор кафедри патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет".

Заморський І.І. - д.мед.н., професор, зав. кафедри фармакології Вищого державного навчального закладу України "Буковинський державний медичний університет"

Сведения об авторах:

Бойчук Т.М. - д.мед.н., профессор, ректор Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинский государственный медицинский университет", профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии.

Бурденюк И.П. - к.мед.н., ас. кафедры микробиологии и вирусологии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинский государственный медицинский университет".

Мыслицкий В.Ф. - д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической физиологии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинский государственный медицинский университет".

Заморский И.И. - д.м.н., профессор, зав. кафедры фармакологии Высшего государственного учебного заведения Украины "Буковинский государственный медицинский университет"

Information about the authors:

Boychuk TM. - professor, rector of the State Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", professor of the Department of Histology, Cytology and Embryology.

Burdenyuk IP. - candidate of medical science, as. of the Department of Microbiology and Virology of the Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University".

Myslytskyi VF. - professor of the Department of Pathological Physiology of the Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University".

Zamorskyi II. - doctor of medical sciences, professor, head. Department of Pharmacology of the State Higher Educational Institution of Ukraine "Bukowina State Medical University"

Стаття надійшла до редакції 3.02.2018

Рецензент – доц. Н.П. Григор'єва

© Т.М. Бойчук, І.П. Бурденюк, В.Ф. Мислицький, І.І. Заморський, 2018