



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **135262** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
G01N 21/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 00253**
(22) Дата подання заявки: **09.01.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.06.2019**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.06.2019, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):
**Бергілевич Олександра Миколаївна (UA),
Касянчук Вікторія Вікторівна (UA),
Шубін Павло Андрійович (UA),
Буцик Анна Сергіївна (UA),
Конєва Анастасія Олександрівна (UA),
Чернецький Ігор Володимирович (UA)**
(73) Власник(и):
**СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми,
40007 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЦИЛІНРЕЗИСТЕНТНОГО STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) НА ОСНОВІ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРЮВАННЯ РАДІУСА БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ РАСТРОВОГО МІКРОСКОПА

(57) Реферат:

Спосіб визначення метицилінрезистентного Staphylococcus aureus (MRSA) включає кількісне вимірювання розмірів бактеріальних клітин за допомогою растрового електронного мікроскопу. Вимірюють радіус п'яти бактеріальних клітин Staphylococcus aureus, відібраних випадковою вибіркою, та розраховують середні значення отриманих промірів, по яких визначають бактеріальні клітини Staphylococcus aureus з наявним чи відсутнім геном mecA. При цьому середнє значення радіусу бактеріальних клітин метицилінрезистентного Staphylococcus aureus з наявним геном mecA становить 0,397 мкм, що менше, порівняно зі метицилінчутливим Staphylococcus aureus з відсутнім геном mecA - 0,431 мкм. Похибка вимірювань становить для метицилінрезистентного Staphylococcus aureus з наявним геном mecA 0,068 мкм, для метицилінчутливого Staphylococcus aureus з відсутнім геном mecA - 0,058 мкм.

UA 135262 U

Корисна модель належить до медичної, ветеринарної, санітарної мікробіології і може бути використана для визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) у досліджуваних ізолятах (клінічний матеріал, об'єкти зовнішнього середовища, продовольча сировина та продукція). Спосіб призначений для застосування у медичних, ветеринарних та науково-дослідних лабораторіях, а також у наукових та навчальних закладах.

Запропонований спосіб полягає у вимірюванні радіусу бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus* за допомогою растрової електронної мікроскопії для визначення метицилінрезистентних *Staphylococcus aureus* (MRSA).

На сьогодні *Staphylococcus aureus* залишається одним із головних збудників інфекційних хвороб людини й тварин. Саме цей мікроорганізм з родини стафілококів належить до патогенних видів. Актуальною на даний час в усьому світі є проблема стійкості *Staphylococcus aureus* до антибіотиків. Найбільш часто для боротьби з інфекцією застосовуються антибіотики β-лактамною групи, до якої входить метицилін. Одним із найпоширеніших резистентних типів цього мікроорганізму є метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Стійкість до антибіотичних препаратів цієї групи обумовлюється наявністю гену *mecA*, який відповідає за продукування білку PBP2a. Цей білок вбудовується в клітинну стінку бактерії і, володіючи низькою аффінією до препаратів β-лактамною групи, дозволяє будувати клітинну стінку в їх присутності [1]. Бактерії *Staphylococcus aureus*, до складу генотипу яких не входить ген *mecA*, є метицилінчутливими *Staphylococcus aureus*-Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Тривалий час вважалося, що MRSA спричиняє виключно внутрішньолікарняні хвороби, проте згодом бактерія набула поширеності як позалікарняна інфекція. Для запобігання поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів, необхідно якісно і швидко виявляти стійкі до антибіотиків штами [2]. Отже, виявлення та визначення антибіотикорезистентних штамів *Staphylococcus aureus* є актуальним питанням, яке потребує особливої уваги.

Відомі загальноприйняті лабораторні методи для визначення антибіотикорезистентності мікроорганізмів - це дискодифузний метод та метод серійних розведень. Крім того, до сучасних методів належить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка визначає наявність генів антибіотикорезистентності.

Аналогом корисної моделі є дискодифузний метод (ДДМ) визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотичних препаратів (АБП). В основі цього методу лежить здатність антибіотичних препаратів на паперових дисках дифузувати в поживне середовище, пригнічуючи при цьому ріст мікроорганізмів, попередньо засіяних на поверхні агару. Даний метод потребує певних умов для виконання тесту, а саме: (I) товщина поживного середовища в чашці Петрі повинна бути $4,0 \pm 0,5$ мм; (II) для проведення тесту слід використовувати тільки стандартизовані диски; (III) кількість досліджуваних бактеріальних клітин в дослідному зразку повинна бути щільністю 0,5 за стандартом каламутності МакФарланда і містити приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл [3].

Для отримання достовірних результатів ДДМ необхідно суворо дотримуватися правил зберігання і використання комерційних дисків. Довготривале зберігання дисків з антибактеріальними препаратами здійснюється в герметичній упаковці, в морозильній камері, при температурі - 18 °С і нижче. Інокулюм слід використовувати протягом 15 хвилин після приготування. Не пізніше, ніж через 15 хв. після інокуляції на поверхню живильного середовища наносять диски з АБП. Безпосередньо після аплікації дисків чашки Петрі поміщають у термостат дном угору та інкубують при температурі 35 °С протягом 18-24 год. Після закінчення інкубації, чашки поміщають дном угору на темну матову поверхню так, щоб світло падало на них під кутом в 45° (облік у відбитому світлі). Діаметр зон затримки росту вимірюють з точністю до 1 мм, тому краще користуватися штангенциркулем або кронциркулем. Таким чином, ДДМ - доволі довготривала та складна методика, яка потребує спеціальних умов для виконання.

Іншим аналогом корисної моделі може бути полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка базується на ампліфікації ділянки ДНК мікроорганізмів з використанням специфічних праймерів [4].

Постановка ПЛР проводиться в декілька етапів: виділення чистої культури мікроорганізму; екстракція ДНК з клітин мікроорганізму; приготування реакційної суміші; програмування температурного циклу і проведення ампліфікації заданого фрагмента ДНК в термоциклері; візуалізація одержуваних копій ДНК і реєстрація результатів реакції; аналіз та інтерпретація результатів реакції.

Вказана методика є досить складною та кошторисною. Більше того, недоліком даного методу є потреба у працівниках, які мають навички та компетенції для виконання усіх етапів дослідження, необхідність спеціальних реагентів, які потребують спеціальних умов для

зберігання, жорсткі вимоги до часу виконання тесту, довготривале очікування результатів та залежність інтерпретації результатів від конкретного виконавця.

Аналогом корисної моделі також є світлова мікроскопія, яка полягає у визначенні певних характеристик бактерій, зокрема їх форми, розміру, структури і локалізації після проведених методів фарбування мазків із цих мікроорганізмів [5].

Подібними ознаками даного методу із розробленим способом є визначення морфологічних особливостей та якісних характеристик клітин мікроорганізму.

Недоліком методу є недостатнє збільшення об'єкта дослідження, внаслідок чого стає неможливим визначення точних розмірів окремих бактеріальних клітин у мазку.

Найближчим аналогом корисної моделі є метод, в якому використовується растрова електронна мікроскопія, за допомогою якої можна визначити видову приналежність та більше точних характеристик бактеріальних клітин, порівняно зі світловою мікроскопією. Растрова електронна мікроскопія дозволяє визначити характеристики досліджуваних об'єктів у діапазоні збільшень від 15 до 300 000 крат та має розподільну здатність 4 нм. Крім того, використання комп'ютера для обробки результатів дозволяє зберігати зображення для подальшого дослідження та більш об'єктивно інтерпретувати отримані дані [6].

Недоліком найближчого аналога є те, що розмір окремих бактеріальних клітин не був використаний для диференціації метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA). Аналіз літературних джерел показав, що розмір окремих клітин *Staphylococcus aureus* досягає 0,5-1,5 μm у діаметрі ($r=0,25-0,75 \mu\text{m}$) [7].

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), шляхом вимірюванням радіусу досліджуваних клітин за допомогою використання растрового електронного мікроскопа, що забезпечує підвищення точності вимірювання та швидкості здійснення дослідження.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), що включає кількісне вимірювання розмірів бактеріальних клітин за допомогою растрового електронного мікроскопу, згідно з корисною моделлю, вимірюють радіус п'яти бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus*, відібраних випадковою вибіркою, та розраховують середні значення отриманих промірів, по яких визначають бактеріальні клітини *Staphylococcus aureus* з наявним чи відсутнім геном *mecA*, при цьому середнє значення радіусу бактеріальних клітин метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* становить 0,397 μm , що менше, порівняно зі метицилінчутливим *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* - 0,431 μm , а похибка вимірювань становить для метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* - 0,068 μm , для метицилінчутливого *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* - 0,058 μm .

Відмінною ознакою заявленого способу від найближчого аналога є те, що застосовується кількісний показник, а саме розмір радіусу окремої бактерії для підтвердження антибіотикорезистентності мікроорганізму.

Використання способу з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє забезпечити підвищення швидкості здійснення дослідження і точності встановлення антибіотикорезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), так як у дослідженні використовуються кількісні розрахунки. Цей спосіб має широку перспективу застосування медичними лабораторіями при необхідності швидкого визначення антибіотикорезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) для подальшого ефективного лікування пацієнтів; для проведення досліджень науковими лабораторіями, що вивчають стійкість до антибіотиків *Staphylococcus aureus*; організаціями, що займаються контролем безпеки продовольчої сировини та харчових продуктів.

Спосіб здійснюють за допомогою виконання наступних етапів:

1. Відбір матеріалів для виявлення ізолятів *Staphylococcus aureus*.
2. Підготовка зразків для растрової електронної мікроскопії, за методикою описаною у Electron Microscopy: Methods and Protocols [8].

3. Дослідження зразків методом растрової електронної мікроскопії, за допомогою скануючого мікроскопу (нами був використаний електронний мікроскоп фірми "SELM" - РЭМ-106И, Україна).

4. Кількісні вимірювання радіусу окремих бактерій *Staphylococcus aureus*. Отримані зображення клітин *Staphylococcus aureus* було оброблено за допомогою програми Djmaizer v.5.1.10, у якій були зроблені вимірювання та отримані первинні дані для подальшої обробки, що дозволяє чітко та швидко встановлювати кількісні показники об'єктів, зокрема бактеріальних клітин, такі як радіус, а також площа, довжина окружності бактеріальної клітини.

5. Аналіз отриманих результатів дослідження. Статистична обробка отриманих кількісних вимірів була здійснена за допомогою програмного забезпечення Statistica v.12.

Для отримання достовірних результатів було використано ізоляти, із проб матеріалу, що був відібраний з гнійних уражень людей, тварин, та з об'єктів навколишнього середовища (ґрунт, вода). Для виділення чистих культур було застосовано середовище агар Байрд-Паркера. Виділені культури мали позитивні результати на коагулазну та каталазну активність. Усі виділені чисті культури *Staphylococcus aureus* були досліджені на антибіотикорезистентність загальноприйнятим дискодифузним методом; а для підтвердження їх антибіотикорезистентності та віднесення до MRSA визначали наявність гену *mecA* - методом ПЛР. У дослідженні були використані чисті культури *Staphylococcus aureus*, з яких за допомогою вказаних методів визначені чисті культури метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Спосіб ілюструється графічними зображеннями, де на Фіг. 1 - представлено порівняння розмірів радіусів бактерій:

А - *Staphylococcus aureus* (MRSA) з наявним геном *mecA* ($r=0,397$ мкм);

Б - *Staphylococcus aureus* (MSSA) з відсутнім геном *mecA* ($r=0,431$ мкм).

При вимірюванні радіусу окремих бактерій цього виду виявилось, що метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA), з наявним геном *mecA*, має менші розміри порівняно з метицилінчутливим *Staphylococcus aureus* (MSSA) з відсутнім геном *mecA*. Ці розміри для *Staphylococcus aureus* (MRSA) становлять 0,397 мкм, а для *Staphylococcus aureus* (MSSA) 0,431 мкм.

На Фіг. 2 - відображено розподіл отриманих промірів, мінімальне, максимальне та середнє значення для кожної дослідної групи. Статистичний аналіз кількісних даних показав, що похибка вимірювань становить для метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* 0,068 мкм, для метицилінчутливого *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* - 0,058 мкм. Таким чином, спосіб, заявлений у даній корисній моделі, може бути достовірним альтернативним способом визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) та диференціювання його серед інших ізолятів даного виду мікроорганізму як такого, у якого наявний або відсутній ген *mecA*.

У Таблиці наведені результати вимірювань радіусів *Staphylococcus aureus* (MRSA) та *Staphylococcus aureus* (MSSA), що підтверджують вищезазначені дані.

Таблиця

Результати вимірювання радіусу бактеріальних клітин різних груп *Staphylococcus aureus* із застосуванням растрового мікроскопу

Статистичні показники	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) із наявним геном <i>mecA</i> , мкм	<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) із відсутнім геном <i>mecA</i> , мкм
Кількість промірів	125	125
Максимальне значення радіусу клітин	0,591	0,613
Мінімальне значення радіусу клітин	0,291	0,306
Середнє значення радіусу клітин	0,397	0,431
Похибка середнього	0,068	0,058

Отримані результати дослідження заявленої корисної моделі були підтверджені дискодифузним методом та ПЛР.

Аналіз та статистична обробка отриманих даних показали, що середні кількісні показники радіуса обох груп клітин *Staphylococcus aureus* (MRSA та MSSA) істотно різняться між собою.

Було встановлено, що мінімальна кількість значень для отримання достовірних результатів складає 5 промірів радіусів бактеріальної клітини *Staphylococcus aureus*. Згідно статистичних показників достовірність отриманих результатів є високою ($p=0,001$). Отже, результати дослідження вважаються достовірними.

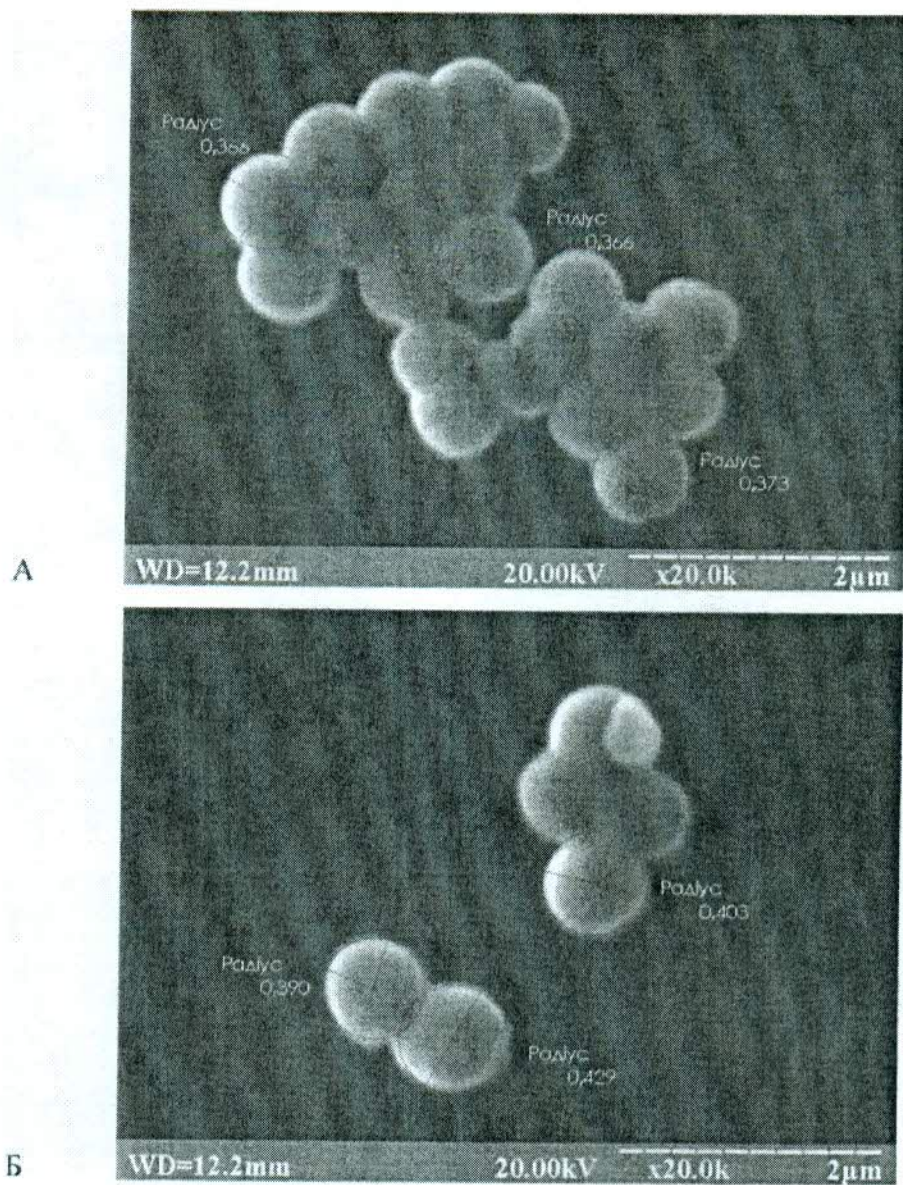
Джерела інформації:

1. Levinson, Warren. Review of medical microbiology and immunology. 13th ed., int. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2014. p. 211.

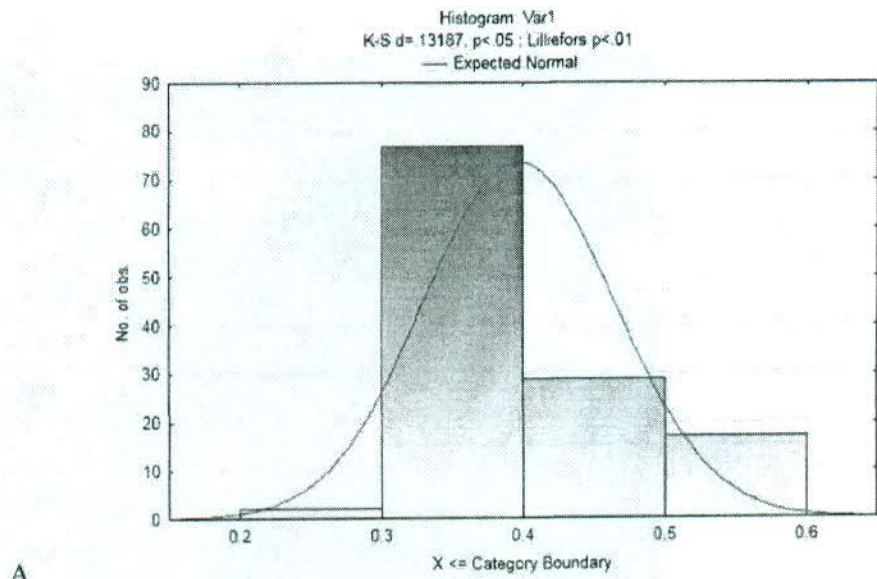
2. O.M. Berhilevych, V.V. Kasianchuk, M.D. Kukhtyn, I.M. Lotskin, T.O. Garkavenko, P.A. Shubin. Characteristics of antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms in Ukraine // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. - 2017. i - № 4. - p. 559-563.
3. Методы исследования в микробиологии: учеб.-метод, пособие / Ж.Г. Шабан [и др.]. - Минск: БГМУ, 2010. с. 95-96.
4. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, Edited by Arun K. Bhunia, 2008, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA. p. 132-133.
5. Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner. *Medical Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2013. p. 11-12.
6. Hogg, Stuart. *Essential Microbiology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005. p. 15-16.
7. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / под ред. А.А. Воробьева. - 2-е изд. испр. и доп. - М.: ООО "Медицинское информационное агенство", 2012. - 329 с.
8. *Electron Microscopy: Methods and Protocols Second Edition*, edited by John Kuo, 2007- Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, p. 11-18.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

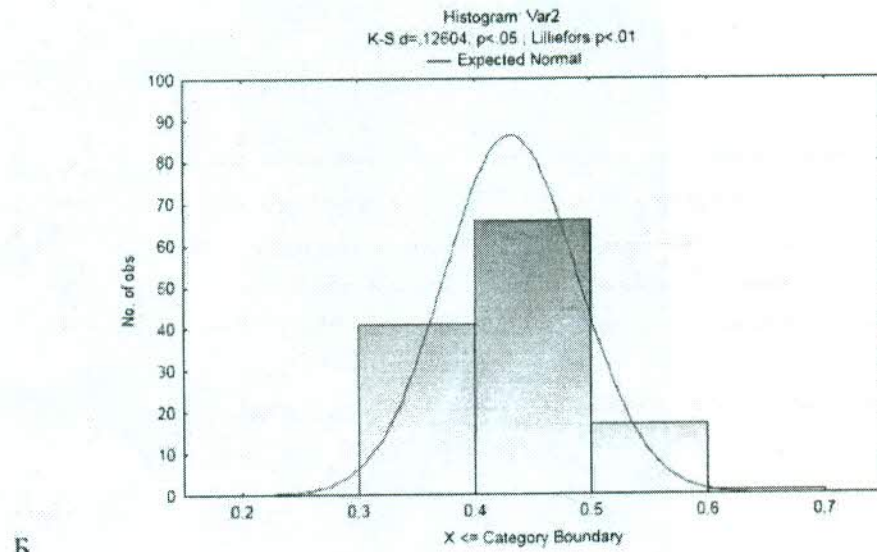
- Спосіб визначення метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), що включає кількісне вимірювання розмірів бактеріальних клітин за допомогою растрового електронного мікроскопа, який відрізняється тим, що вимірюють радіус п'яти бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus*, відібраних випадковою вибіркою, та розраховують середні значення отриманих промірів, по яких визначають бактеріальні клітини *Staphylococcus aureus* з наявним чи відсутнім геном *mecA*, при цьому середнє значення радіуса бактеріальних клітин метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* становить 0,397 мкм, що менше, порівняно із метицилінчутливим *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* - 0,431 мкм, а похибка вимірювань становить для метицилінрезистентного *Staphylococcus aureus* з наявним геном *mecA* 0,068 мкм, для метицилінчутливого *Staphylococcus aureus* з відсутнім геном *mecA* - 0,058 мкм.



Фиг. 1



A



Б

Фіг. 2

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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

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