

202-006

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

На правах рукописи

УДК 616.981.25

МЫРЗАКУЛОВА АДАЛЯТ ЖУМАШОВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СУХОЙ
СУБЛИМИРОВАННОЙ МОЛОЧНО-ЖЕЛТОЧНО-СОЛЕВОЙ
ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СТАФИЛОКОККОВ**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Бишкек – 2002

Работа выполнена в Кыргызском научно-исследовательском институте туберкулеза

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Е.А. Финкель

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Т.А. Тыналиева
кандидат медицинских наук
Ж.А. Байызбекова

Ведущая организация: Национальный Центр проблем туберкулеза
Агентства Республики Казахстан по делам
здравоохранения (г.Алматы)

Защита состоится «25» июня 2002 г. 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета К.14.02.172 при Кыргызской Государственной Медицинской Академии (720061 г.Бишкек, ул.Ахунбаева, 92).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызской Государственной Медицинской академии (720061, г.Бишкек, ул.Ахунбаева, 92)

Автореферат разослан «15» мая 2002 г.



Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских
наук, доцент

М. А. Сабодаха

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Несмотря на огромные успехи, достигнутые в результате широкого применения антибактериальных препаратов в лечении инфекционных заболеваний, проблема стафилококковых инфекций остается актуальной во всем мире и в настоящее время.

В связи с возрастающей антибиотикорезистентностью происходит угрожающий рост числа стафилококковых заболеваний, протекающих более тяжело и с более высокой летальностью чем 20-30 лет назад. (Акатов А.А., Зуева В.С., 1983).

Ключевой проблемой в изучении микробиологических аспектов стафилококковых инфекций является раннее выявление возбудителя с определением его патогенности (Акатова Е.А. и соавт., 1993, Бухарин О.В. и соавт., 2000).

В бактериологических лабораториях крупных лечебно-профилактических учреждений идентификация *S.aureus* достигается с помощью полимеразной цепной реакции (Акатова Е.А. и соавт., 1993; Николаев В.Л., соавт., 2000) и иммуноферментными методами (Bennett R.W. et al.1986; Тлеулиева Р.Т. и соавт., 1997, Baric P.S. et al, 1999).

В условиях клинико-бактериологических лабораторий среднего звена для идентификации патогенных штаммов стафилококков проводят определение наличие коагулазы, ДНКазы и лецитиназы наряду с определением плазмокоагулазы (Генералова А.Г. и соавт., 1998). Для обнаружения фермента лецитиназы широко применяется нативная молочно-желточно-солевая среда (МЖСА), приготовляемая каждый раз перед исследованием.

Поиски способов повышения ее эффективности развиваются по линии введения молочно-желточной эмульсии в восстановленную новую питательную среду, высушенную методом распыления (Раскин Б.М., Штанчаева С.Л., 1980), добавления к существующей нативной питательной среде 0,25% глюкозы (Филичкин С.Е., Федоров В.И., 1987), солей магния (Генералова А.Г. и соавт., 1998, Cruz C.F., 2000).

В 1981 г. в лаборатории микробиологии Кыргызского НИИ туберкулеза была создана сухая сублимированная молочно-желточно-солевая среда (Финкель Е.А., Панова Т.С., А.с. РФ. 1992. 1791448). В процессе работы с экспериментальными сериями с сухой молочно-желточно-солевой среды нами была выявлена нестандартность ее, что не позволяло длительно использовать среду на практике.

Актуальной задачей являлось усовершенствование и стандартизация сухой среды. Это потребовало проведения специальных научных исследований для оценки и улучшения качества ингредиентов, входящих в состав среды.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: Усовершенствование молочно-желточно-солевой среды на основе стандартизации качества ингредиентов для обеспечения стабильности результатов идентификации стафилококков.

ЗАДАЧИ:

1. Исследовать качество входящих в состав среды ингредиентов для выявления и устранения причины её неполной стандартности.
2. Изучить ростовые качества усовершенствованной сухой молочно-желточно-солевой среды.
3. Выявить пигментообразование стафилококков на сухой усовершенствованной молочно-желточно-солевой среде.
4. Определить лецитиназную активность стафилококков на сухой усовершенствованной молочно-желточно-солевой среде.
5. Установить длительность сохранения специфической активности сухой усовершенствованной молочно-желточно-солевой среды.
6. Оценить эффективность определения показателей патогенности стафилококков (по лецитиназной активности), на сухой усовершенствованной среде в комплексе с другими факторами: плазмокоагуляцией, способностью ферментировать маннит в анаэробных условиях и вызывать гемолиз эритроцитов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

- Усовершенствован и стандартизован способ изготовления сублимационный молочно-желточно-солевой среды для идентификации стафилококков: разработан способ сухожаровой стерилизации порошкового агар-агара (заявка № 1239 от 18 апреля 2002 г.), обеспечивающий получение стабильных результатов исследования высокого качества.
- Установлено длительное в течение года сохранение ростовых качеств и специфической активности сухой сублимированной усовершенствованной молочно-желточно-солевой питательной среды.
- Высокие качества усовершенствованной среды обоснованы данными проверки патогенности стафилококков по лецитиназной активности на сухой усовершенствованной среде в комплексе с изучением коагуляции плазмы, ферментации манита в анаэробных условиях, гемолиза эритроцитов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Усовершенствованная стандартизованная сухая сублимированная питательная среда в готовом виде может централизованно выпускаться для снабжения бактериологических лабораторий широкого профиля.

Применение сухой усовершенствованной питательной среды по сравнению с нативной регламентированной средой повышает качество исследования и приводит к существенной экономии времени лаборантов.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Усовершенствование и стандартизация качества сухой сублимированной питательной среды.
2. Ростовые качества стандартизованной молочно-желточно-солевой среды.
3. Эффективность использования сухой восстановленной молочно-желточно-солевой питательной среды для выявления пигментообразования и лецитиназной активности стафилококков при исследовании различного патологического материала.
4. Высокая частота выявления патогенности стафилококков по пигментообразованию и лецитиназной активности в комплексе с другими факторами патогенности.
5. Длительное сохранение ростовых качеств и специфической активности сухой стандартизованной молочно-желточно-солевой среды, предназначенной для выделения и идентификации стафилококков.

Апробация работы.

Усовершенствованная сухая сублимированная питательная среда апробирована в бактериологическом отделении центральной клинко-диагностической лаборатории Национального госпиталя при МЗ Кыргызской Республики в течение с 1998 по 2000 гг.

Основные результаты доложены на конференции, посвященной 40-летию Кыргызского НИИ туберкулеза (Бишкек, 1998); заседании Ученого совета Кыргызского НИИ туберкулеза (2000 г.), заседании кафедры микробиологии КГМА (2001 г.).

Внедрение результатов исследования в практику.

Результаты работы внедрены в бактериологическое отделение центральной клинко-диагностической лаборатории Национального госпиталя при МЗ Кыргызской Республики.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 38 таблицами, 7 рисунками и 3 фотографиями. Список литературы содержит 304 наименования, из них 107 на русском и 197 иностранных языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились экспериментальные серии усовершенствованной сухой молочно-желточно-солевой питательной среды, изготовленной сублимационным методом. Специфическая активность сублимированных питательных сред проверялась сразу же после изготовления,

а также после хранения при температуре $+4^{\circ} - +8^{\circ}\text{C}$ в течение 6, 9 месяцев и одного года.

Материалом для исследования служили 1964 штамма стафилококков. Они были выделены при бактериологическом исследовании патологического материала, полученного у 170 больных желудочно-кишечными, 534 больных бронхолегочными, 703 - урогенитальными, 467 - гнойно-воспалительными заболеваниями, а также у 90 больных туберкулезом, осложненным неспецифической инфекцией (табл.1).

Таблица 1
Количество штаммов стафилококков,
изученных при различных заболеваниях

Заболевания	Изучено штаммов стафилококков
Желудочно-кишечные	170
Бронхолегочные	534
Урогенитальные	703
Гнойно-воспалительные	467
Туберкулез, осложненный неспецифической инфекцией	90
ВСЕГО	1964

Бактериологическое исследование диагностического материала проводили в соответствии с методическими указаниями 1985 «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Для оценки ростовых качеств восстановленной сублимированной сухой молочно-желточно-солевой питательной среды производили подсчет числа, выросших на ней колоний в посевах 0,1 мг взвеси культуры стафилококков, приготовленной по 5 стандарту мутности и разведенной до 10^{-7} степени. Эффективность использования сухой сублимированной среды оценивалось в сопоставлении с данными, полученными в параллельных посевах на регламентированной обычно используемой в клинико-бактериологических лабораториях свежизготовленную питательной среде в дальнейшем обозначаемой нами как нативная питательная среда. При учете результатов исследования обращали внимание на время появления и интенсивность роста.

Важными критериями являлась оценка качества сухой питательной среды по результатам пигментообразования и выявления лецитиназной активности стафилококков, а также способности выросших на сухой питательной среде лецитиназоположительных культур коагулировать плазму, сбрасывать маннит в анаэробных условиях, вызывать гемолиз эритроцитов.

При сопоставлении полученных результатов высчитывали процент полного совпадения их и проводили статистические исследования. При наличии различий в неодинаковой частоте определения изучаемых признаков использовали математический анализ с применением критерия χ^2 /ХИ квадрат/.

Показатель χ^2 вычисляли из абсолютных чисел. Для оценки расхождений при сравнении средних арифметических величин показателей применяли общеизвестный критерий Стьюдента. При этом доверительная вероятность исследования равная 95% соответствовала $P=0,05$.

В начале для выяснения причины нестандартности различных серий сухой питательной среды было проведено изучение качества ингредиентов, входящих в её состав.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Наряду с полученными нами данными, подтверждающими положительное значение порошкового агара и мясоептонного бульона на сублимацию молочно-желточно-солевой среды, все же она оставалась нестандартной в сопоставлении с нативной регламентированной средой (табл.2).

Таблица 2

Данные сравнительного испытания эффективности различных серий сухой молочно-желточно-солевой среды в сопоставлении с нативной регламентированной по высеваемости тест штамма *S-aureus*.

Методика изготовления среды	С е р и и				
	1	2	3	4	5
	$M_1 \pm m$	$M_2 \pm m$	$M_3 \pm m$	$M_4 \pm m$	$M_5 \pm m$
Сухая сублимированная	127 ± 6.4	106 ± 4.3	119 ± 10.7	82 ± 6.4	81 ± 5.3
	$p_{1-2} < 0.05$	$p_{1-3} > 0.05$		$p_{3-4} < 0.01$	$p_{1-5} < 0.01$
Нативная регламентированная	125 ± 6.4	119 ± 8.6	119 ± 10.7	122 ± 6.4	121 ± 7.5
	$p_{1-2} > 0.05$	$p_{3-4} > 0.05$		$p_{4-5} > 0.05$	

Как видно из таблицы серии сухой заявленной питательной среды существенно ($p < 0.05$; $p < 0.01$) отличаются между собой по количеству выросших колоний. ($p > 0.05$).

Дефект нестандартности сухой молочно-желточно-солевой среды как было выявлено нами связан с использованием нестерильного порошкового агара-агара, обсемененного посторонней микрофлорой.

Проблема стандартизации качества агара была решена нами путем отработки оптимального метода его сухожаровой стерилизации.

Наиболее благоприятные результаты были получены при температуре в режиме 110-130 °С. (Заявка №1239 от 18 апреля 2002 года) в течении 30-10 минут соответственно.

Приведенные в табл.2 данные свидетельствуют, что усовершенствованная предлагаемым способом сухая питательная среда по высеваемости колоний тест штамма *S.aureus* и результатом определения лецитиназной активности не отличалась от нативной регламентированной среды.

Таблица 3

*Результаты испытаний качества усовершенствованной сухой питательной среды МЖСА в сопоставлении с нативной регламентированной (среднее количество колоний лецитиназная активность и пигментообразование в посевах тест штамма *S.aureus*).*

МЖСА Серия	нативная				сухая				р
	регламентированная				усовершенствованная				
	Кол-во посевов	Среднее кол-во колоний	Лецити наза +	Пигмент +	Кол-во посевов	Среднее кол-во колоний	Лецити и наза +	Пигмент +	
1	5	M ₁ ±m 111±6,4	5	5	5	M ₃ ±m 118±3,2	5	5	>0.05
2	5	118±6.4	5	5	5	114±3.2	5	5	>0.05
3	5	120±4.3	5	5	5	115±4.3	5	5	>0.05
4	5	119±3.2	5	5	5	120±2.1	5	5	>0.05
5	5	117±6.4	5	5	5	117±6.0	5	5	>0.05

Таким образом, в результате разработанного оптимального режима стерилизации порошкового агар-агара на сухой сублимированной питательной среде стали получаться надежные результаты.

В дальнейшем, эта среда была подвергнута проверки на большом клиническом материале.

Наши исследования показали преимущество ростовых качеств свежизготовленной сухой усовершенствованной молочно-желточно-солевой среды, на которой через 24 часа после посева культур *S.aureus* (рис. № 1)

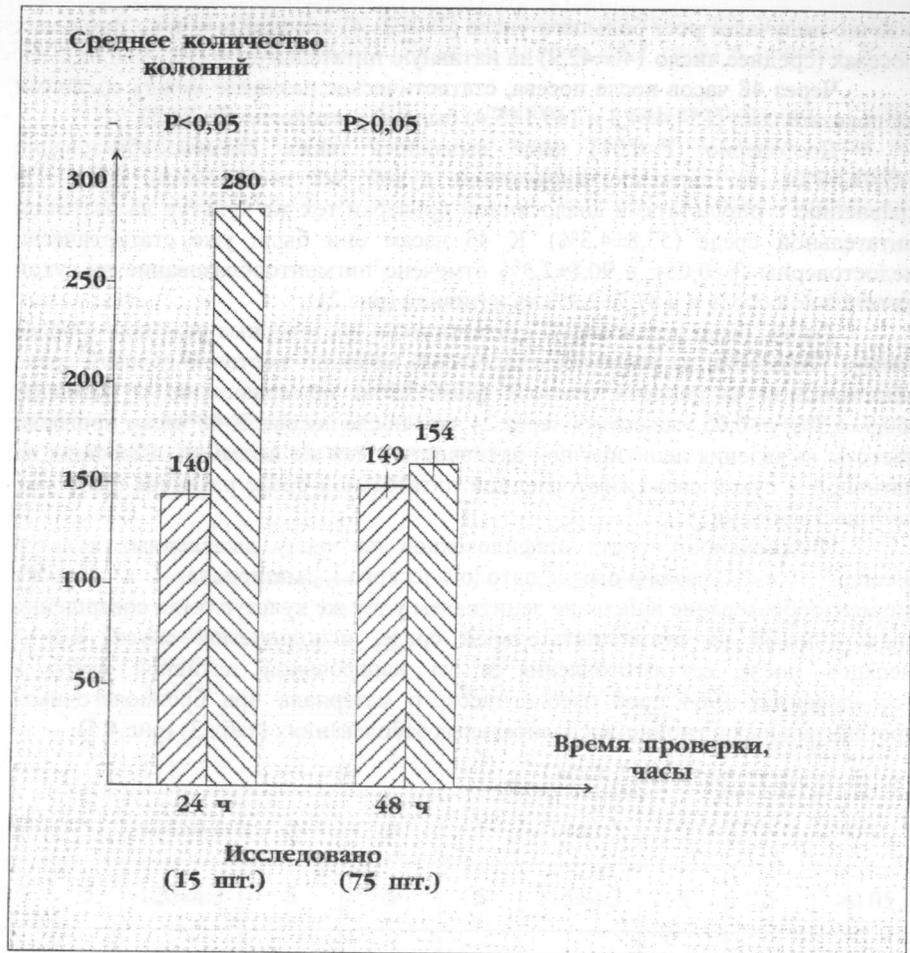
обычно получался рост большего числа (280±21,4) колоний чем в контрольных посевах (среднее число 140±42,9) на нативную питательную среду (P<0,05).

Через 48 часов после посева, статистическое различие между средними их показателями (154,4±4,8 и 149,1±5,4) было недостоверно (P>0,05).

Достоверно (P<0,01) чаще выявилось также пигментообразование (75,4±3,8%) на свежевостановленной сухой восстановленной среде по сравнению с результатами аналогичной проверки тех же культур на нативной питательной среде (53,8±4,3%). К 48 часам они были уже статистически недостоверны (p>0,05): в 90,8±2,5% отмечено пигментообразование на сухой питательной среде и в 87.7±2.9% на нативной (рис.2).

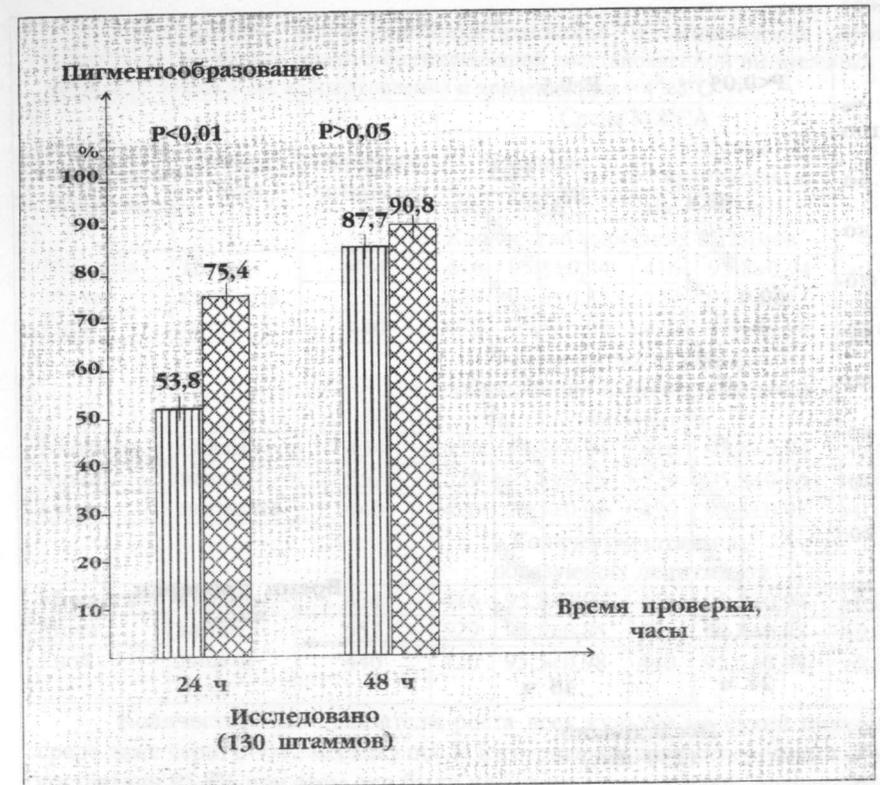
Также, были установлены статистически достоверные различия о более частом выявлении на усовершенствованной молочно-желточно-солевой среде лецитиназной активности *S.aureus* (80,4±3,5%) по сравнению с нативной (60,9±4,3%) p<0,05 уже спустя через 24 часа после посева. К 48 часам проверки частоты выявления лецитиназной активности у тех же штаммов, выросших на нативной и сухой свежизготовленной питательной среде различия были уже несущественными.

Интенсивность роста стафилококков по числу выделенных культур *S.aureus* из различного патологического материала, а также пигментообразование и наличие лецитиназы у тех же культур были совершенно аналогичными на сухой питательной среде, используемой спустя 6-9-12 месяцев после ее изготовления и на контрольной нативной среде в исследованиях 1964 проб патологического материала при бронхолегочных, урогенитальных и гнойно-воспалительных заболеваниях (табл.3) (рис.4,5).



- нативная (здесь и далее среда регламентированная)
- сухая свежизготовленная (здесь и далее среда сухая, усовершенствованная).

Рис. 1. Интенсивность роста колоний *S.aureus* на нативной и сухой свежизготовленных питательных средах МЖСА (штаммы выделены из мокроты больных туберкулезом)



- нативная
- сухая свежизготовленная

Рис. 2. Пигментообразование *S.aureus* на нативной и сухой свежизготовленных питательных средах МЖСА (штаммы выделены у больных при желудочно-кишечных заболеваниях)

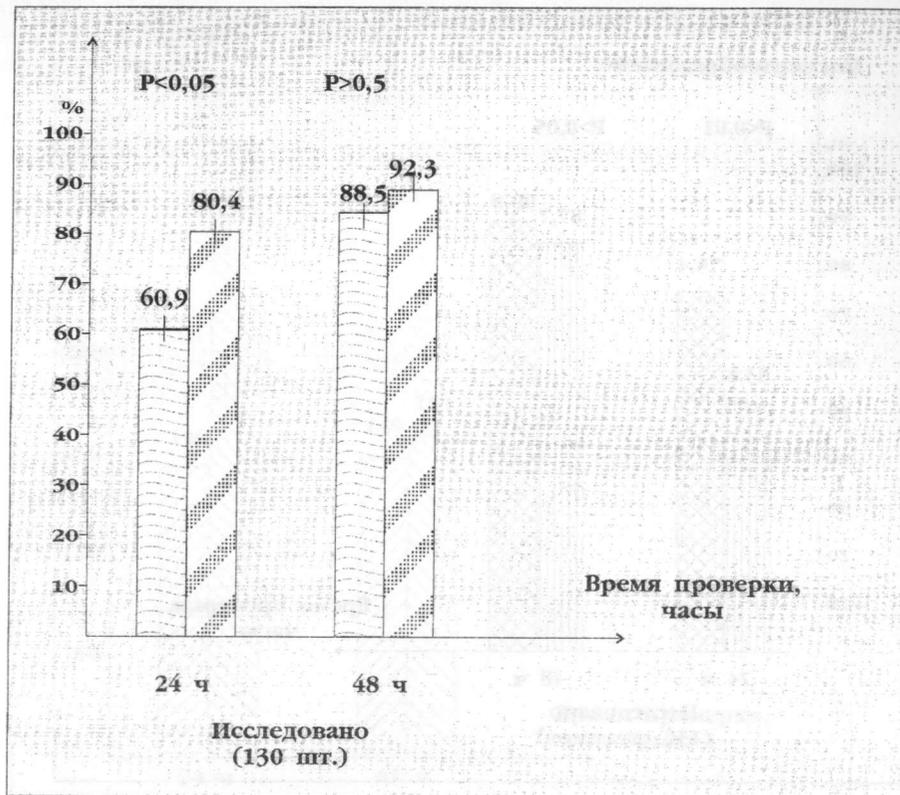


Рис. 3. Лецитиназная активность *S.aureus* на нативной и сухой свежизготовленных питательных средах МЖСА (130 штаммов выделены при желудочно-кишечных заболеваниях)

Таблица 4

Интенсивность роста, пигментообразование и лецитиназная активность *S.aureus* на нативной и сухой сублимированной восстановленной питательных средах через 6-12 месяцев после изготовления и хранения при $+4^{\circ}\pm 8^{\circ}\text{C}$

Патологический материал	Показатели	Испытано штаммов	Среда МЖСА				P
			Нативная		Сухая хранившаяся		
			абс	%±m	абс	%±m	
Количество выросших штаммов							
Мокрота	Интенсивность роста	434	416	95,8±0,94	416	95,8±0,94	>0,05
Моча		552	529	95,8±0,85	529	95,8±0,85	>0,05
Гной		440	420	95,5±0,98	420	95,5±0,98	>0,05
Количество штаммов, образующих золотисто-желтый пигмент							
Мокрота	Образование пигмента	434	416	95,8±0,94	416	95,8±0,94	>0,05
Моча		552	529	95,8±0,85	529	95,8±0,85	>0,05
Гной		440	420	95,5±0,98	420	95,5±0,98	>0,05
Количество штаммов, образующих лецитиназу							
Мокрота	Образование лецитиназы	434	416	95,8±0,94	416	95,8±0,94	>0,05
Моча		552	529	95,8±0,85	529	95,8±0,85	>0,05
Гной		440	420	95,5±0,98	440	95,5±0,98	>0,05

Количественные показатели роста всех культур на сухой питательной среде даже через 6-9-12 месяцев после изготовления при исследовании мокроты составляли 95,8% при этом они были идентичны показателям, полученным при изучении тех же самых культур на приготовляемой каждый раз свежей нативной среде 95,8%. Такое же полное совпадение результатов было получено при изучении культур, выделенных из мочи 95,8%, испытанных на сухой среде через 6-9-12 месяцев хранения ее и в 95,8% на нативной среде, свежизготавливаемой к этим срокам испытания сухой среды. Аналогичными были результаты роста культур, выделенных из гноя. Показатели выросших культур на сухой среде составили 95,5% через 6-9-12 месяцев хранения ее и 95,5% на свежизготовленной среде. В эти же сроки проверки сухой питательной среды после ее изготовления (6-9-12 месяцев) и хранения при $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}\text{C}$ показатели пигментообразования были аналогичны тем, которые получали в параллельных исследованиях на нативной питательной среде. Так при исследовании в указанные сроки 434 культур стафилококков *S.aureus*, выделенных из мокроты на обеих средах, получено полное совпадение результатов в 95,8%. При исследовании 552 культур *S.aureus*, выделенных из мочи, совпадение результатов имело место в 95,8%, а при исследовании в эти сроки сухой среды в посевах 440 культур, выделенных из гноя, совпадение результатов отмечено в 95,5% случаев. Практически является важным

полученный нами результат, устанавливающий стабильность выявления на сухой хранившейся 6-9-12 месяцев среде основного биологического свойства, определяющего патогенность стафилококков. Лецитиназная активность обнаруживалась на нативной и сухой восстановленной питательных средах в эти сроки у 416 культур (95,8%), выделенных из мокроты при исследовании 529 культур, выделенных из мочи (95,8%) и у 420 культур *S.aureus*, выделенных из гноя (95,5%). На сухой восстановленной питательной среде показатели роста *S.epidermidis* (табл. 4) через 6-9-12 месяцев хранения были в 96,0% случаев такими же, как на нативной свежесготовленной среде 96,0% при исследовании мокроты и 100% совпадений результатов при исследовании мочи: в 98,7% и 98,7% соответственно при исследовании гноя. На сухой сублимированной питательной среде, хранившейся в течение 6, 9 и 12 месяцев были установлены высокие показатели образования белого пигмента *S.epidermidis*. Они были полностью идентичны данным, полученным на нативной свежесготовленной питательной среде и составляли на обеих средах одни и те же числа: 96,0% при исследовании культур, выделенных из мокроты; 98,7% у культур, полученных при исследовании мочи и у 100% культур – из гноя. Все штаммы *S.epidermidis* (100, выделенные из мокроты, 151 – из мочи и 27 – из гноя) при росте на сублимированной сухой питательной среде спустя 6-9 и 12 месяцев после изготовления как и на контрольной нативной питательной среде давали отрицательную реакцию на образование фермента лецитиназы.

Таблица 4

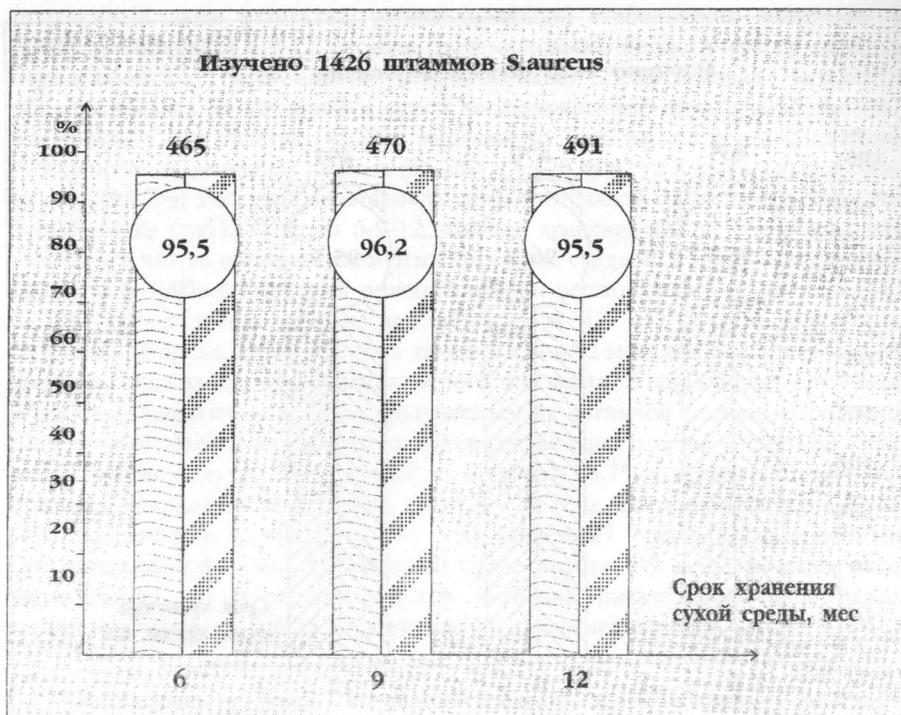
Интенсивность роста, пигментообразование и лецитиназная активность *S.epidermidis* на нативной и сухой сублимированной питательных средах МЖСА (данные проверки сухой среды через 6 – 12 месяцев после изготовления и хранения при +4° - +8° С)

Патологический материал	Показатели	Испытано штаммов	Среда МЖСА				Р
			Нативная		Сухая хранившаяся		
			Абс	%±m	абс	%±m	
			Количество выросших штаммов				
Мокрота	Интенсивность роста	100	96	96,0±1,95	96	96,0±1,95	>0,05
Моча		151	149	98,7±0,92	149	98,7±0,92	>0,05
Гной		27	27	100,0	27	100,0	0
			Количество штаммов, образующих белый пигмент				
Мокрота	Образование пигмента	100	96	96,0±1,95	96	96,0±1,95	>0,05
Моча		151	149	98,7±0,92	149	98,7±0,92	>0,05
Гной		27	100	100,0	100	100,0	0
			Количество штаммов образующих лецитиназу				
Мокрота	Образование лецитиназы	100	0		0		
Моча		151	0		0		
Гной		27	0		0		



 Нативная
 Сухая хранившаяся

Рис. 4. Наличие роста стафилококков на хранившейся при +4°С - +8°С сухой среде МЖСА (штаммы *S.aureus* выделены при бронхолегочных, урологических гнойно-воспалительных заболеваниях)



 **Нативная**
 **Сухая хранившаяся**

Рис. 5. Лецитиназная активность стафилококков на хранившейся при +4°С - +8°С сухой среде МЖСА (штаммы S.aureus выделены при бронхолегочных, урологических гнойно-воспалительных заболеваниях)

Учитывая значение и других свойств (способность образовывать плазмокоагулазу, вызывать гемолиз эритроцитов и сбраживать маннит в анаэробных условиях) для определения патогенности стафилококков мы регулярно проводили проверку их у выделенных штаммов стафилококков. При этом было установлено, что у всех 1426 лецитиназоположительных культур, имеющих золотисто-желтый пигмент на сухой питательной среде сохранились и названные биохимические свойства, определяющие патогенность выделенных штаммов стафилококков.

Это касалось 434 штаммов, выделенных из мокроты, 552 – из мочи и 440 – из гноя в параллельных посевах материала на нативной и сухой питательной средах, испытанных через 6, 9 и 12 месяцев хранения. Также положительно решался вопрос при испытании 278 лецитиназоотрицательных штаммов (100 из них выделены из мокроты, 151 из мочи и 27 из гноя), образующих белый пигмент. У всех у них отсутствовала плазмокоагулаза, они не ферментировали маннит в анаэробных условиях.

В исследованиях на кровяном агаре гемолиза не было выявлено у 74 из 100 (74,0%) лецитиназоотрицательных культур, выделенных из мокроты, у 98 (64,1%) лецитиназоотрицательных культур, выделенных из мочи, у 92 лецитиназоотрицательных культур (81,5%) из гноя, т.е. у 194 общего числа культур (69,8%) из общего числа 278 лецитиназоотрицательных штаммов.

Таким образом, частота обнаружения штаммов S.aureus и S.epidermidis на нативной и сухой питательной средах была совершенно одинаковой.

Поскольку все исследования проводились всегда параллельно на сравниваемых средах, полученные данные позволяют утверждать, что использование сухой питательной среды МЖСА не оказывает неблагоприятного влияния на ростовые качества и биохимическую активность штаммов, выросших на ней культур S. aureus и S.epidermidis

Все это свидетельствует о том, что под влиянием высушивания и хранения при +4° - +8°С в течение года не происходит изменения специфических свойств сухой усовершенствованной молочно-желточно-солевой питательной среды, касающихся частоты появления роста стафилококков, определения их пигментообразования их лецитиназной способности, а также сохранения культурами, выросшими на сухой сублимированной питательной среде и через год после изготовления, коагулазной активности, способности сбраживать маннит в анаэробных условиях, гемолитических свойств. Вместе с тем, выявлено существенное положительное влияние высушивания на ускорение (через 24 часа вместо 48 часов) появления на свежизготовленной сухой среде роста стафилококков и возможность проявления у них пигментообразования и лецитиназной активности. Результаты этих исследований позволяют утверждать, что сублимационное высушивание сопровождается улучшением ростовых и дифференциально-диагностических качеств молочно-желточно-солевой питательной среды, проявляющемся через 24 часа.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован метод изготовления сухой питательной среды МЖСА. Разработанный нами оптимальный режим сухожаровой стерилизации порошкового агар-агара (температура 110° - 130° С в течение 30-10) обеспечил стандартность качества сухой сублимированной среды.
2. Усовершенствованная сухая сублимированная молочно-желточно-солевая среда обеспечивает появление уже (через 24 часа) большего числа колоний (среднее количество $280 \pm 2,4$) стафилококков по сравнению с числом их (среднее количество $140 \pm 42,9$), полученным на свежизготовленной нативной питательной среде ($p < 0,05$). Показатели роста стафилококков на обеих средах через 48 часов практически одинаковые.
3. На сухой свежизготовленной питательной среде достоверно ($p < 0,01$) в более ранние сроки (через 24 часа) у $75,4 \pm 3,8\%$ выявляется пигментообразование, тогда как на нативной свежизготовленной питательной среде, таких культур было $53,8 \pm 4,3\%$. Это различие через 48 часов значительно уменьшилось ($p > 0,05$).
4. На сухой свежизготовленной сублимированной питательной среде существенно увеличивалось ($p > 0,05$) выявление через 24 часа лецитиназной активности стафилококков ($80,4 \pm 3,5\%$) по сравнению с результатами, на нативной свежизготовленной питательной среде ($60,9 \pm 4,3$).
5. При использовании сухой питательной среды МЖСА через 6, 9 и 12 месяцев хранения при $+4^{\circ}$ С - $+8^{\circ}$ С показатели роста, пигментообразования и лецитиназной активности *S.aureus* полностью совпали с результатами, выявленными на свежеприготовленной к этому сроку нативной питательной среде ($p > 0,05$). Эти показатели составили для культур, выделенных из мокроты $94,5-96,4\%$, из мочи - $94,5-96,3\%$, из гноя - $94,2-96,2\%$. Полное совпадение результатов исследование было получено при изучении сухой сублимированной питательной среды через 6, 9 и 12 месяцев хранения и при посеве *S.epidermidis* по количеству выросших культур, образующих пигмент белого цвета и по отсутствию лецитиназы ($p > 0,05$). Показатели при исследовании мокроты установлены: $93,5-96,8\%$, мочи - $95,4-100\%$, гноя - $100-100\%$.
6. Культуры *S.aureus* и *S.epidermidis*, выросшие на сухой сублимированной питательной среде, сохранили свои типичные биологические признаки при исследовании плазмокоагулирующей способности, сбраживании маннита в анаэробных условиях и гемолитической активности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Сухая сублимированная молочно-желточно-солевая питательная среда рекомендуется для дифференциации патогенности выделенных культур стафилококков.
2. Использовать сухую питательную среду можно в течение года после изготовления и хранения при температуре $+4^{\circ}$ $+8^{\circ}$ С.

3. По своим качествам сухая сублимированная питательная среда может использоваться как стандартная питательная среда для унификации методики, повышения качества исследования и облегчения процесса выявления патогенности стафилококков.

СПИСОК

работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Результаты апробации сухой желточно-молочно-солевой среды с агаром, предназначенной для выделения и идентификации стафилококков. // Труды НИИ профилактики и медицинской экологии.: Окружающая среда и здоровье человека. - Бишкек, 1992.- Том 1. - С.291-294.
2. Разработка питательной среды для ускоренного обнаружения возбудителя туберкулеза // Сб. науч. тр. КНИИТ.: Туберкулез. - Бишкек, 1998. - С. 240-245. (соавт.: Финкель Е.А., Алишеров А.Ш., Михайлова Л.В. и др.)
3. Разработка методики получения сублимированных питательных сред на агаровой основе // Сб.науч.тр. КНИИТ.: Туберкулез. - Бишкек, 1998. - С. 240-245 (соавт.: Финкель Е.А., Алишеров А.Ш., Михайлова Л.В. и др.)
4. Результаты практического использования сублимированной сухой среды с агаром для диагностики стафилококковых заболеваний. //Сб.науч.тр.КНИИТ.: Туберкулез. - Бишкек, 1998.-С.252-257.
5. Дифференциация микобактерий туберкулеза //В кн. «Бактериологическая диагностика туберкулеза». - Бишкек, 1998. - С.217-234. (соавт.: Финкель Е.А., Михайлова Л.В., Соколова И.А. и др.)
6. Разработка способа получения сухой сублимированной молочно-желточно-солевой среды с агаром для видовой идентификации стафилококков //Сб.науч.тр. КНИИТ.: Туберкулез.- Бишкек, 2000. - С. 175-182.
7. Результаты испытания сухой молочно-желточно-солевой среды с агаром, свежизготовленной и в процессе хранения //Сб.науч.тр.КНИИТ.: Туберкулез. - Бишкек, 2000. - С. 182-189. (соавт.: Кочкорова М.М.).

АННОТАЦИЯ.

диссертации Мырзакуловой А.Ж. на тему: «Усовершенствование и стандартизация сухой сублимированной молочно-желточно-солевой питательной среды для идентификации стафилококков» на соискание ученой степени кандидата медицинский наук

03.00.07 - микробиология

На основании изучения 1964 штамма стафилококков, выделенных при неспецифической инфекции, сопутствующей туберкулезу, при желудочнокишечных инфекциях, бронхолегочных, урогенитальных и гнойно-воспалительных заболеваниях, дано обоснование возможности практического применения новой сухой сублимированной молочно-желточно-солевой питательной среды с агаром для идентификации *S.aureus*. Для исследования диагностического материала использовали стандартные бактериологические методы (Методические рекомендации, Москва, 1985), применяемые в клинко-диагностических лабораториях. Выявлено, что на свежееизготовленной сухой восстановленной сублимированной питательной среде раньше, чем на аналогичной нативной среде появляется рост колоний стафилококков, происходит пигментообразование и выявляется лецитиназная активность *S.aureus*. Установлено, что на сухой сублимированной питательной среде при использовании ее после хранения в течение одного-двух лет при $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С результаты определения показателей роста, пигментообразования и лецитиназной активности *S.aureus* и *S.epidermidis* полностью совпадали с результатами, выявленными на свежееизготавливаемой в эти сроки нативной среде. Показано, что штаммы *S.aureus* и *S.epidermidis*, выросшие на сухой сублимированной питательной среде сохраняли свои типичные биологические признаки при исследовании плазмокоагулирующей способности, способности сбрасывать маннит в анаэробных условиях и вызывать гемолиз эритроцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Сухая сублимированная молочно-желточно-солевая питательная среда рекомендуется для дифференциации патогенности выделенных культур стафилококков.

2. Использовать сухую питательную среду можно в течение года после даты выезда и хранения при температуре $+4^{\circ}$ - $+8^{\circ}$ С.

АННОТАЦИЯ.

Мырзакулова Адалят Жумашовна «Стафилококкторду окшоштуруучу кургак сублимирдик сүтүү саргыч туздуу азактандруучу чөйрө медицина илимдеринин кандидатык даражасын алуу үчүн диссертациясы»

03.00.07 - микробиология

Ар түрдүү ооруларды (туберкулез, ичеги-карын, бронх, өпкө жана жыныс органдарынын илдеттери, ириңдеген сезгенүүлөр ж.б.) жандаган спецификалык эмес инфекциялар учурунда бөлүнүп алынган 1964 стафилококк штамдарынын жаңы даярдалган кургак сублимациялык азыкта идентификациялоо багытында изилдөөлөр жүргүзүлгөн. Иликтенүүчү материалдарды изилдөө жалпы клиника-диагностикалык лабораторияларда колдонулуучу стандартык бактериологиялык метод (методикалык колдомо - Москва, 1985-жыл) менен жүргүзүлгөн. Натыйжада, жаңы даярдалган сублимациялык азыкта стафилококктун (*S.aureus*) нативдүү МЖСА азыгына салыштырганда анын өсүшү, ошондой эле пигменттин пайда болушу, лецитиназа активдүүлүгү эртерээк пайда болотургандыгы далилденген. Ошондой эле, дээрлик жаңы даярдалган сублимациялык азыгы 1-2 жыл бою $+4^{\circ}$ + 8° С та сакталган.

S.aureus, *S.epidermidis* стафилококкторунун өнүгүүсү, пигментти пайда кылуусу менен бирге лецитиназа активдүүлүгү толугу менен сактап калган.

Бул илимий эмгекте, кургак сублимациялык азыктагы *S.aureus* жана *S.epidermidis* стафилококкторунун плазмокоагуляциялык жөндөмдүүлүгүн иликтөөдө алардын негизги биологиялык белгилеринин сакталгандыгы, анаэробдук шартта маннит ачытуу жана эритроциттерди эритүү (гемолиз) касиеттеринин өзгөрүлбөгөндүгү далилденген.

ANNOTATION

Mirzakulova Adalyt Jymashovna "Dry nutrient media for isolation and identification of staphylococci" Dissertation for the degree of candidate of medical sciences.

03.00.07 – microbiology

The reasons for practical use of new dry sublimated dairy-yolk salt nutrient medium with agar was given for S-aureus identification on the base of syudy of 1964 staphylococcus strain excreted in nonspecific infection accompanied TB, gastrointestinal infections, bronchopulmonary, urogenital and pyo-inflamatory diseases. For the examination of diagnostic material standard bacteriological methods were used (methodical recommendations Moscow 1985). It is established that the growth of staphylococcus colonies emerge on fresh dry sublimated nutrient medium earlier then on the similar native, chromogenesis is ocured and lecithinase activity of S-aureus is marked. It is established that the results of determination of growth indices, chromogenesis and lecithinase activity of S-aureus and S epidermis, on dry sublimated nutrient medium using it after keeping it during 1-2 years in +4 +8 C, tally with the results, obtained on fresh native medium during this period. It is shown, that S aureus and S epidermidis strains, developed on this dry sublimated nutrient medium, keep their typical biological signs during the examination of plasmacoagolated ability, the ability to fermentate mannit in anaeribic conditions and to cause ecythrocyte hemolysis.

Отпечатано в тип. ПЛ № 3. Заказ 228. Объем 1.38 п.л.
Тираж 100 экз.