

(19) **KG** (11) **618** (13) **C1**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)<sup>7</sup> **C12N 1/20**  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

---

(21) 20020020.1

(22) 18.04.2002

(46) 30.01.2004, Бюл. №1

(71)(73) Финкель Е.А (KG).

(72) Финкель Е.А., Мырзакулова А.Ж. (KG)

(56) А.с. №1791448, кл. C12N 1/02, 1993

(54) **Способ получения сухой питательной среды для идентификации стафилококков**

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к микробиологии. Задача изобретения - улучшение качества ингредиентов питательной среды для обеспечения ее стандартности. Задача решается тем, что предлагается способ получения сухой питательной среды для идентификации стафилококков путем использования порошкового агар-агара, натрий хлорида, желтка яичного, стерильного коровьего молока, мясопептонного бульона, их смешивании и лиофилизации, причем перед добавлением в состав среды порошковый агар-агар стерилизуют при температуре 110°C в течение 30 минут или 120 - в течение 20 минут, или 130 - в течение 10 минут. 1 п. ф-лы, 3 табл.

Изобретение относится к области медицины, а именно к медицинской микробиологии.

Известно получение сухой питательной среды для идентификации стафилококков (Раскин Б.М., Штанчаева С.М. Разработка и экспериментальное изучение сухой элективной среды для стафилококков // Эпидемиология и микробиология, 1980. - №9. - С. 39-43), изготовленная с включением гидролизина, аминокептида, витаминного препарата ЭКД с последующим высушиванием, распылением.

Однако перед использованием для идентификации возбудителя в среду после ее расплавления необходимо дополнительно добавить специально приготовленную молочно-желточную эмульсию, что многоэтапно и сокращает срок годности.

Известен способ получения среды для выделения и видовой идентификации стафилококков (патент SU №1791448, кл. C12N 1/02, 1993).

Заявленный способ характеризуется тем, что белый порошковый агар-агар смешивают с хлоридом натрия, желтком и молоком, гомогенизируют при комнатной температуре с мясопептонным бульоном, затем полученную смесь замораживают до -40-50°C в охлажденном спирте и лиофилизируют в течение 16-18 часов при температуре

продукта не выше 35°C, в вакууме 200-160  $\mu$ (0.026-0.013 кПа) в начале и 26-20  $\mu$ (0.003 кПа) в конце сушки.

В заявленной сухой питательной среде МЖСА дрожжевой гидрализат заменен порошковым агар-агаром и стерильным мясоептонным бульоном.

Недостатки способа были выявлены при использовании разных серий. Они обнаружались в неодинаковых результатах, полученных при выращивании стафилококков (см. табл. 1).

Как выяснилось, на качество изготавливаемой сухой питательной среды сказывалась обсемененность агар-агара различной посторонней микрофлорой.

Порошковый агар-агар при изготовлении известной среды не подвергался предварительной стерилизации. Посторонняя микрофлора давала рост в посевах порошкового агар-агара на чашке Петри с кровяным агар-агаром и на тиогликолевую среду, признанную ВОЗ одной из основных питательных сред для контроля стерильности медицинских препаратов. Опыты по отработке методики стерилизации агар-агара показали, что известный способ растапливания агар-агара или его стерилизация вместе с другими ингредиентами в автоклаве не могут быть использованы, поскольку при смешивании горячего агар-агара с яичным желтком в нем разрушался лецитин, сохранение которого возможно было только при условии, если порошковый агар-агар будет подвергаться стерилизации отдельно в сухом сыпучем виде.

И хотя заявленный способ продлевает срок хранения питательной среды, в процессе использования выявилась ее нестандартность, что демонстрируется в таблице 1.

Таблица 1

*Результаты испытания различных серий сухой сублимированной среды МЖСА*

Методика изготовления среды	№ опыта	Количество колоний в посеве 0.1 мл взвеси, изготовленной по стандартности 10 000 ед. в разведении $10^{-7}$				
		Серии				
		1 Л.П.	2 Л.П.	3 Л.П.	4 Л.П.	5 Л.П.
Сухая	1	120 ++	110 ++	135 ++	70-+	70 -+
	2	130 ++	120 ++	120 ++	80-+	80 -+
	3	125 ++	10 ++	110++	100++	70 -+
	4	140 ++	100 ++	90++	100++	90 ++
	5	110 ++	100 ++	140++	60++	95 ++
Итого:		635	530	595	410	405
	M $\pm$ m	127 $\pm$ 6.4	106 $\pm$ 4.3	119 $\pm$ 10.7	82 $\pm$ 6.4	81 $\pm$ 5.3
	P	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01
Нативная регламентированная	1	110 ++	135 ++	140 ++	120 ++	135 ++
	2	120 ++	125 ++	120 ++	140 ++	135 ++
	3	125 ++	140 ++	125 ++	110 ++	120 ++
	4	130 ++	100 ++	100 ++	115 ++	115 ++
	5	140 ++	95 ++	110 ++	125 ++	100 ++
Итого:		625	495	595	610	605
	M $\pm$ m	125 $\pm$ 6.4	119 $\pm$ 8	119 $\pm$ 10.7	122 $\pm$ 6.4	121 $\pm$ 7.5
	P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Как видно из данных, представленных в таблице 1, серии сухой питательной среды МЖСА существенна ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) отличаются между собой по количеству выросших колоний, а также в сопоставлении с нативной регламентированной средой.

Задача изобретения - улучшение качества ингредиентов питательной среды для обеспечения ее стандартности.

Задача решается тем, что получении сухой питательной среды для идентификации стафилококков достигается путем стерилизации порошкового агар-агара при температуре 110, 120 и 130°C в течение 30, 20 и 10 мин в соответствии с температурой.

Способ осуществляется следующим образом.

Исходные ингредиенты питательной среды смешивают с порошковым агар-агаром, после его сухожаровой стерилизации при установленных оптимальных режимах (температура 110, 120 и 130°C в течение 30, 20 и 10 мин).

Температура ниже 110°C не обеспечивала полной стерильности, а выше 130°C сопровождалось ухудшением физических свойств среды. Она не желировалась или принимала бурый цвет и плохо растворялась.

Пример конкретного приготовления питательной среды МЖСА по предлагаемому способу.

Для приготовления среды используются следующие компоненты (вес. %). Предварительно простерилизованный при 120°C - 20 мин - порошковый агар-агар 1.8-2.0; натрия хлорид - 7.5-10; желток яичный - 1.2-1.5; молоко коровье стерильное - 18.0-20.0; мясопептонный бульон - остальное.

Все компоненты в указанной последовательности тщательно растирают в стерильной емкости и постепенно добавляют мясо-пептонный бульон.

Смесь разливают по 100 мл в стерильные бутылки емкостью 250 мл, и после замораживания при -40-50°C, сушат в течение 18 ч при температуре продукта не выше 35°C.

По окончании сушки флаконы с питательной средой закрывают стерильными пробками и герметизируют металлическими колпачками.

Эксперименты по оценке качества установленного оптимального метода стерилизации агара были проведены на пяти сериях усовершенствованной сухой питательной среды. В качестве контроля использовали нативную регламентированную питательную среду МЖСА и сухую питательную среду по прототипу.

Данные сравнительного испытания разработанной сухой, нативной регламентированной и сухой питательных сред МЖСА по прототипу в посевах тест штамма St-aureus представлены в табл. № 2.

Таблица 2.

*Результаты испытания качества разработанной сухой питательной среды МЖСА, в которой порошковый агар подвергнут специальной температурной обработке (прогревание в сушильном шкафу при 120°C в течение 20 мин)*

Серия	№ опыта	Методика изготовления								
		Нативная			Способ по прототипу			Разраб. способ		
		Кол-во колоний	Лецитиназа	Пигмент	Кол-во колоний	Лецитиназа	Пигмент	Кол-во колоний	Лецитиназа	Пигмент
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	90	+	+	70	-	+	120	+	+
	2	120	+	+	76	-	+	125	+	+
	3	115	+	+	80	-	+	115	+	+
	4	120	+	+	90	+	+	120	+	+
	5	110	+	+	80	-	+	110	+	+
	M±m	111±6.4			79.2±4.3			118±3.2		
	P	>0.05			>0.05			>0.05		
2	1	100	+	+	90	+	+	105	+	+
	2	120	+	+	90	+	+	115	+	+
	3	125	+	+	100	+	+	120	+	+
	4	115	+	+	105	+	+	110	+	+
	5	130	+	+	95	+	+	120	+	+
	M±m	118±6.4			76±3.2			114±3.2		
	P	<0.05			<0.05			<0.05		
3	1	130	+	+	80	-	+	125	+	+
	2	115	+	+	90	+	+	120	+	+
	3	125	+	+	80	-	+	130	+	+
	4	110	+	+	70	-	+	110	+	+
	5	120	+	+	115	+	+	110	+	+
	M±m	120±4.3			87±9.6			115±4.3		
	P	<0.05			<0.05			>0.05		
4	1	110	+	+	100	+	+	120	+	+
	2	115	+	+	110	+	+	115	+	+

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	3	120	+	+	90	+	+	120	+	+
	4	125	+	+	105	+	+	125	+	+
	5	125	+	+	115	+	+	120	+	+
	M±m	119±3.2			104±5.3			120±2.1		
	P	>0.05			<0.05			>0.05		
5	1	100	+	+	130	+	+	100	+	+
	2	115	+	+	95	+	+	115	+	+
	3	118	+	+	90	+	+	120	+	+
	4	130	+	+	95	+	+	128	+	+
	5	125	+	+	100	+	+	125	+	+
	M±m	117±6.4			102±8.1			117.6±6.0		
	P	>0.05			>0.05			>0.05		

Данные, приведенные в таблице 2 свидетельствуют о том, что усовершенствованная предлагаемым способом изготовления сухая питательная среда МЖСА по высеваемости тест-штамма *St. aureus*, результатам определения лецитиназной активности не отличалась от нативной регламентированной среды.

Таким образом, положительный эффект изготовления питательной молочно-желточно-солевой среды в сравнении с прототипом проявился в увеличении высеваемости, улучшении результатов определения лецитиназной активности, тогда как не все серии сухой питательной среды по прототипу по этим показателям были тождественны нативной регламентированной среде. В результате отработки режима стерилизации порошкового агар-агара предложенная сухая питательная среда стала давать более надежные и стандартные результаты, что необходимо при диагностической работе.

Сухая молочно-желточно-солевая питательная среда, приготовленная по новой технологии прошла апробацию в бактериологическом отделении Центральной клинико-диагностической лаборатории Национального госпиталя при Минздраве КР.

С 1998 по 2000 гг. изучены 1426 штаммов *St. aureus* и 278 *St. epidermidis*. Апробация проводилась в сравнении с питательной средой МЖСА, регламентированной для этой цели, в которую молочно-желточная смесь вносилась перед ее употреблением в предварительно растопленную готовую агаровую среду. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3.

*Частота выявления St. aureus и St. epidermidis на нативной регламентированной и сухой усовершенствованной средах МЖСА.*

Вид стафилококка	Кол-во штаммов	Лецитиназоположительных на средах		Лецитиназотрицательных на средах	
		нативной	сухой	нативной	сухой
<i>St. aureus</i>	1426	1426	1426	-	-
<i>St. epidermidis</i>	278	-	-	278	278

**Формула изобретения**

Способ получения сухой питательной среды для идентификации стафилококков, заключающийся в использовании порошкового агар-агара, хлорида натрия, желтка яичного, стерильного коровьего молока, мясопептонного бульона, их смешивании и лиофилизации, отличающийся тем, что перед добавлением в состав среды порошковый агар-агар стерилизуют при температуре 110°C в течение 30 мин, 120°C в течение 20 мин и 130°C в течение 10 мин.

Составитель описания	Грунина И.Ф.
Ответственный за выпуск	Арипов С.К.

---

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03