

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК 616-002.5-071-078

КУЗНЕЦОВ
Олег Евгеньевич

**КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
ТУБЕРКУЛЕЗА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
АМИНОКИСЛОТ И НЕБЕЛКОВЫХ МОДУЛЯТОРОВ
МЕТАБОЛИЗМА**

(экспериментально-лабораторное исследование)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 14.00.46 – клиническая лабораторная диагностика

Научный руководитель
доктор медицинских наук,
профессор Гельберг И.С.

Минск, 2009

Работа выполнена в учреждении образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Гельберг Илья Самуилович**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фтизиатрии с курсом профпатологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Чиркин Александр Александрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой учреждения образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»,

Никандров Виталий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией государственного научного учреждения «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится «21» апреля 2009 г. в 14 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.02 Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» г. Минск, ул. П. Бровки д. 3, тел.: (+375 17) 292 03 64; e-mail: ndkolomiets@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Автореферат разослан «20 марта» 2009 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций



Коломиец Н.Д.

Выделение микобактерий туберкулеза (МБТ) и установление их лекарственной чувствительности являются важнейшим и обязательным условием постановки диагноза туберкулеза и выбора надлежащей тактики его лечения. В настоящее время с этой целью используется комплекс плотных питательных сред различного химического состава, однако их применение не решает проблему лабораторной диагностики туберкулеза, особенно при снижении жизнеспособности штаммов МБТ в условиях химиотерапии (А.И. Гайович, Т.В. Яхница, 1992; G.W. Comstock, 1992; П. Фармер и др., 1998; А.Г. Хоменко и др., 1999; И.Б. Зеленкевич, 1998).

Для более надежного выращивания МБТ в специализированных лабораториях системы практического здравоохранения необходимы специальные, богатые питательными веществами среды, к которым предъявляются такие требования, как возможность изготовления из доступных компонентов, простота в приготовлении, обеспечение достаточного накопления бактериальной массы (Р.А. Нуратинов, Э.А. Вердиева, Д.С. Юзбеков, 2002; Р.Э. Финн, 1973; Е.А. Финкель, 1985).

В основном используются плотные питательные среды (Левенштейна-Йенсена, реже Финн-II). При этом лабораторное культуральное исследование занимает не менее 3-8 недель – именно в эти сроки появляется рост МБТ на плотной питательной среде; отрицательным же результатом считается отсутствие роста в течение 10-12 недель после поступления образца в лабораторию (E. Lowenstein, 1931; Е. Чичибабин, 1982; А. Ткаченко, 1998). Для сокращения времени диагностики туберкулеза применяются жидкие питательные среды (Е.А. Школьников, 1948). Однако использование жидких питательных сред осложнено их высокой контаминацией микроорганизмами окружающей среды; к тому же, работа с ними небезопасна для персонала (J.F. MacFaddin, 1985; G. Middlebrook, 1985; И. Бардисявичене, А. Сосновская, 1996).

Основным направлением совершенствования методов бактериологической диагностики туберкулеза является создание сред, позволяющих в более короткие сроки выявить МБТ и установить их чувствительность к химиопрепаратам. Немаловажным представляется и снижение себестоимости их производства. Системы ВАСТЕС, а также метод полимеразной цепной реакции не нашли широкого применения в лечебно-профилактических организациях из-за высокой себестоимости исследования, необходимости использования специального дорогостоящего оборудования, а также выполнения посева на плотную питательную среду для окончательного решения вопросов идентификации возбудителя заболевания и интерпретации результатов (А. Lassence, D. Leccossier, 1992; V. Mizrahi, 1997; М.В. Альварес Фигероа, Л.Н. Лепеха, Б.В. Никоненко и др., 2000; А. Марьяндышев, О. Тунгусова, Д. Кауган, П. Сандвен, 2001).

В состав МБТ входят вода (85,9%), белки, углеводы, липиды и минеральные соли. Липиды составляют от 10 до 40% сухого вещества. В состав туберкуло-протеинов входят почти все известные аминокислоты, которые активно участвуют в метаболизме клетки и стимулируют процессы биосинтеза белка. В МБТ содержится до 15,3% углеводов большей частью в виде полисахаридов, свободных и в соединениях с фосфатидами и белками. Минеральные вещества МБТ составляют около 6% массы клетки. К ним относятся кальций, фосфор, магний, калий, железо, цинк и марганец в основном в виде химических соединений (З.К. Гончарова, 1989; В.И. Гольшевская, 1996; Ю.Г. Степаншин, В.Н. Степаншина, И.Г. Шемякин, 1998).

Таким образом, разработка технологий ускорения роста и накопления МБТ (особенно при их пониженной жизнеспособности), т.е. повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза при культуральном исследовании, создание питательной среды, проявляющей повышенную чувствительность к МБТ (с позиции метаболизма и структуры МБТ весьма актуальным является присутствие в питательной среде количественно преобладающего в клетках микобактерий лизина и ответственного за протекание ключевых метаболических реакций кофермента ФАД-зависимых (флавинадениндинуклеотид) процессов витамина В₂ (Р.Ф. Булатова, А.И. Шепелин, В.Я. Волков, 1997), представляется важной задачей. Все это и определяет необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на ускорение, удешевление и повышение надежности лабораторной диагностики туберкулеза, разработку новых и усовершенствование ранее известных методов, обеспечивающих высокую интенсивность и скорость роста МБТ, что является важным условием более широкого их применения в клиничко-лабораторной практике.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований в области медицины и биологии. Исследование проведено в соответствии с планом НИР на кафедре фтизиатрии с курсом профпатологии УО «Гродненский государственный медицинский университет» в рамках задания Государственной научно-технической программы «Разработать новые и усовершенствовать имеющиеся методы медико-социальной реабилитации больных туберкулезом с наличием факторов риска в современных условиях» (номер госрегистрации 2002845).

Цель и задачи исследования

Цель работы – повысить эффективность лабораторной диагностики туберкулеза на основе разработки и внедрения в клиничко-лабораторную

практику новых культуральных методов исследования, основанных на использовании аминокислот и небелковых модуляторов метаболизма в составе питательных сред для культивирования МБТ.

Задачи исследования:

1. Разработать новые плотные питательные среды для выращивания микобактерий туберкулеза на основе аминокислоты лизин, витамина В₂, растительных и солевых компонентов.

2. Оценить влияние состава разработанных плотных питательных сред на скорость и интенсивность роста на них музейных и клинических штаммов МБТ (мокрота бактериовыделителей) в сравнении с аналогичными показателями, достигаемыми с использованием среды Левенштейна-Йенсена.

3. Изучить возможность использования эффекта «замораживания и размораживания» для активации роста микобактерий туберкулеза.

4. Оценить диагностическую и экономическую эффективность, специфичность и чувствительность разработанного бактериологического метода лабораторной диагностики туберкулеза на основе использования новых и усовершенствованных плотных питательных сред.

Исходя из поставленных задач в качестве объекта исследования служили штаммы МБТ, выделенные из биологического материала больных туберкулезом бактериовыделителей, музейные штаммы МБТ, плотная питательная среда для выращивания МБТ Левенштейна-Йенсена, среда Финн-П и разработанные новые плотные питательные среды. При выполнении диссертационной работы исследован характер роста музейного штамма Н₃₇RV, лекарственно-устойчивого (ЛУ) и лекарственно-чувствительного (ЛЧ) штамма МБТ (*M. tuberculosis*) и МБТ из биологического материала (мокрота) бактериовыделителей 108 больных туберкулезом легких. Произведен 3791 посев материала, в том числе патологического материала (мокроты бактериовыделителей) – 1322 посева, музейного штамма Н₃₇RV – 1713 посевов, лекарственно-чувствительных штаммов МБТ, полученных от больных туберкулезом – 388 посевов, лекарственно-устойчивых штаммов МБТ, полученных от больных туберкулезом – 368 посевов.

Предмет исследования: определение интенсивности и скорости роста МБТ, оценка диагностической и экономической эффективности, специфичности и чувствительности метода выделения МБТ с использованием разработанных питательных сред.

Методы исследования: в работе использовался комплексный научно-методический подход, основанный на статистическом анализе данных бактериологического и бактериоскопического методов исследования музейного, лекарственно-чувствительного, лекарственно-устойчивого штаммов МБТ, а также МБТ из биологического материала (мокроты бактериовыделителей) с учетом интенсивности и скорости роста микобактерий

на традиционно используемых, усовершенствованных и разработанных новых питательных средах.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Включение в питательные среды аминокислоты лизин, витамина В₂, растительных и солевых компонентов повышает надежность выращивания микобактерий туберкулеза, ускоряя процесс их культивирования.

2. Разработанные плотные питательные среды обеспечивают скорость и интенсивность роста МБТ музейных штаммов и клинических изолятов и превосходят традиционно используемую в лабораторной диагностике среду Левенштейна-Йенсена.

3. Применение эффекта «замораживания и размораживания» при бактериологическом исследовании позволяет увеличить скорость и интенсивность роста микобактерий туберкулеза.

4. Использование разработанных и усовершенствованных плотных питательных сред повышает аналитическую чувствительность, диагностическую и экономическую эффективность бактериологического метода лабораторной диагностики туберкулеза.

Личный вклад соискателя

Все основные научные результаты, изложенные в диссертации и отраженные в научных положениях, выносимых на защиту, представляют собой результаты исследований, самостоятельно выполненных автором на базе кафедры фтизиатрии с курсом профпатологии Гродненского государственного медицинского университета и ГОКЦ «Фтизиатрия».

В статьях [1, 2, 3] показано повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза при использовании в качестве активатора роста МБТ аминокислоты лизин, витамина В₂, растительных и солевых компонентов. Диссертант самостоятельно осуществлял подбор больных и контроль взятия материала для лабораторного исследования, подготовку питательных сред, выполнял посевы биологического материала, контролировал скорость и интенсивность роста микобактерий туберкулеза, проводил бактериоскопию материала, статистическую обработку и анализ собранной информации [7, 9, 10, 12, 13, 14]. Публикация [15] основана на осуществленном совместно с Л.А. Кузнецовой изучении влияния аминокислоты лизин и рибофлавина на свойства питательных сред; публикации [8, 11], выполненные совместно с И.С. Гельбергом, свидетельствуют об эффективности культурального метода при использовании новых сред и получаемом при этом экономическом эффекте. Статья [6] основана на совместных с Д.В. Шевчуком материалах исследований образцов разработанных питательных сред с приведением результатов их испытаний на музейном штамме МБТ, лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых изолятах микобактерий, мокроте

бактериовыделителей, а также данных оценки экономической эффективности их применения; статьи [4, 5] основаны на совместных с И.С. Гельбергом бактериологических исследованиях.

Апробация результатов диссертации

Материалы диссертации доложены на VI съезде специалистов клинической лабораторной диагностики РБ (Брест, 2002); научно-практической конференции молодых ученых, посвященной памяти Ю.М. Островского (Гродно, 2003); конференции к 45-летию Гродненского государственного медицинского университета (Гродно, 2003); юбилейной научно-практической конференции «Актуальные проблемы фтизиатрии и пульмонологии» (Минск, 2003); международной научной конференции молодых ученых (Польша, Белосток, 2003); международной научной конференции молодых ученых (Украина, Днепропетровск, 2003); международной научной конференции молодых ученых (Польша, Белосток, 2004); международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной памяти профессора С.И. Гельберга (Беларусь, Гродно, 2004); конференции республиканского общества специалистов клинической лабораторной диагностики (Минск, 2005); международной научно-практической конференции по проблеме пенитенциарной медицины (Минск, 2006); VII съезде специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь (Минск, 2007).

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах, объемом 2,1 авторских листа, включенных в перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, 2 статьи в сборниках научных трудов, 4 публикации в материалах конференций и 3 тезисов докладов. Общий объем опубликованных материалов составил 3,78 авторских листа, из которых 2,2 листа в единоличном авторстве (4 статьи, 2 тезисов, 3 публикации в материалах конференций).

По теме научно-исследовательской работы получено 5 патентов на изобретение Национального центра интеллектуальной собственности Республики Беларусь и утверждена инструкция по применению Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана на русском языке. Состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 4 глав (описание материалов и методов исследования, результатов собственных исследований), заключения, практических рекомендаций, библиографического списка (список

использованных источников, список публикаций соискателя) и приложений. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 6 рисунками и содержит 22 таблицы. Объем, занимаемый иллюстрациями, таблицами и приложениями – 25 страниц. Библиографический указатель включает 258 источников, включая работы автора (15), из них 62 – на языках дальнего зарубежья.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Материал и методы исследования

Исследованы плотные питательные среды на музейном штамме $H_{37}RV$ (разведение 10^3 , 10^5 , 10^7 МБТ/1 мл), ЛУ и ЛЧ штаммах МБТ (*M. tuberculosis*) и биологическом материале (мокрота бактериовыделителей) от 108 больных туберкулезом. Произведен 3791 посев материала: музейный штамм $H_{37}RV$ – 1713 посевов, лекарственно-чувствительный штамм МБТ, полученный от больных туберкулезом – 388 посевов (3-х штаммов), лекарственно-устойчивый штамм МБТ, полученный от больных туберкулезом – 368 посевов (3-х штаммов), биологический материал (мокрота бактериовыделителей) – 1322 посева.

В исследование включались пациенты, у которых диагноз туберкулеза легких (инфильтративный, очаговый, фиброзно-кавернозный, диссеминированный) подтверждался лабораторно (бактериоскопически и бактериологически). Средний возраст больных туберкулезом легких составил $49,1 \pm 1,4$ года, минимальный – 32 года, максимальный – 62 года. Обследованные были лицами мужского (87,0%) и женского (13,0%) пола. Контрольные группы исследований составили посева музейной культуры $H_{37}RV$, ЛУ, ЛЧ штамма МБТ и посева мокроты бактериовыделителей, выполненные на рекомендованной ВОЗ среде Левенштейна-Йенсена.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакета STATISTICA 6.0 с использованием параметрических и непараметрических методов. При нормальном распределении изучаемого признака данные статистики представлялись с помощью среднего арифметического и его средней ошибки ($\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$). Статистическая достоверность изменений определялась путем расчета t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни (U-test) и точного критерия Фишера (F). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05 (различие признавалось достоверным при 95% и более: $p \leq 0,05$).

Было исследовано 9 вариантов составов питательных сред для последующего отбора наиболее эффективных концентраций использованных ингредиентов и 8 вариантов разработанных плотных питательных сред. Питательные среды готовили в полном соответствии с утвержденной рецептурой, свертывание производили при $85^\circ C$ в течение 45 минут, придавая среде скос. Контроль питательных сред осуществлялся комплексно: визуально

(внешний вид, цвет, отсутствие пузырьковых включений); органолептически (определение запаха); определение pH. Контроль стерильности производился следующим образом: выдерживание 5% пробирок каждой вновь приготовленной партии среды в термостате 48 ч ($37\pm 0,5^\circ\text{C}$) – при изменении цвета среды, появлении проростов партию отбраковывали (количество питательных сред, имеющих проросты или несоответствующих требованиям, составило 0,5%, что было равным количеству проростов на среде Левенштейна-Йенсена); время появления роста колоний МБТ (среда обеспечивает рост тест-штамма *M. tuberculosis* H₃₇RV при посеве 0,1 мл микробной взвеси 10^5 микобактериальных клеток в 1 мл при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$) – среда считалась пригодной, если после засева культуры наблюдался рост характерных колоний микобактерий. Исследования проводили в асептических условиях.

Для приготовления суспензии МБТ выросшую на плотной питательной среде культуру (несколько колоний) снимали стерильной лопаткой, переносили в стерильную пробирку, куда добавляли 3 мл стерильного физиологического раствора, и при помощи микроцентрифуги-вортекс суспензировали. Выполняли разведения суспензии с помощью оптического стандарта мутности («NEPHELOMETER™» CRYSTAL SPECTR, Becton Dickinson (США)) до 10^3 – 10^7 МБТ в 1 мл. Засевали 0,2 мл готовой взвеси микобактерий в пробирку со средой, инкубировали (температурный оптимум инкубации – $37\pm 0,5^\circ\text{C}$) в наклонном положении для равномерного распределения суспензии микобактерий по поверхности среды в течение 3 суток, затем пробирки переводили в вертикальное положение. Мокроту засевали аналогичным образом (после необходимой обработки в соответствии с существующими инструкциями). Посев каждого разведения производили на 3 пробирки испытуемой среды и 2 пробирки среды Левенштейна-Йенсена (контроль). Пробирки с выполненными на них посевами инкубировали в течение 2,5 месяцев. При отсутствии к этому времени роста МБТ посев считался отрицательным. Результаты учитывали путем ежедневного, начиная с третьих суток инкубации, сравнения сроков появления роста, оценки скорости и интенсивности роста колоний МБТ – положительный ответ давали только после микроскопии выросших колоний с окраской по методу Циля-Нильсена. Взятие, обработку мокроты и прямую бактериоскопию мазков, окрашенных по методу Циля-Нильсена, проводили в соответствии с существующими инструкциями. Интенсивность роста устанавливалась путем подсчета колоний по 3-балльной системе (колониеобразующие единицы - КОЕ: величина высчитывалась как среднее из числа колоний, выросших на всех пробирках): (1+) – от единичных до 20 КОЕ на поверхности среды – скудное бактериовыделение; (2++) – от 21 до 100 КОЕ на поверхности среды – умеренное бактериовыделение; (3+++) – более 100 КОЕ на поверхности среды – обильное бактериовыделение.

Результаты собственных исследований

Изучены 9 вариантов питательных сред (основа – растительные и животные компоненты), различающихся составом и концентрацией лизина, L-аспарагина, рибофлавина, солевого раствора, а также влияние на рост МБТ эффекта «замораживания и размораживания».

Вариант 1: отвар (300 мл) белой фасоли, картофеля и моркови (по 300 г), 0,5 л яичной массы, 300 мл солевого раствора, 20 мл 2% раствора малахитовой зелени.

Вариант 2: тот же отвар (300 мл), но белой фасоли, картофеля и моркови по 400 г, 0,75 л яичной массы, 300 мл солевого раствора, 20 мл 2% раствора малахитовой зелени.

Вариант 3: тот же отвар (300 мл), но белой фасоли, картофеля и моркови по 500 г, 1,0 л яичной массы, 300 мл солевого раствора, 20 мл 2% раствора малахитовой зелени.

Вариант 4: 600 мл солевого раствора (однозамещенный фосфорнокислый калий – 2,4 г, магний сернокислый – 0,24 г, магний лимоннокислый – 0,6 г, лизин – 0,95 г, глицерин – 12 мл, вода дистиллированная – 600 мл), 1 л яичной массы, 20 мл 2% раствора малахитовой зелени.

Вариант 5: то же, что и в варианте 4 (600 мл), но с добавлением лизина в количестве 1,90 г.

Вариант 6: то же, что и в варианте 4 (600 мл), но с добавлением лизина в количестве 2,85 г.

Вариант 7: 600 мл солевого раствора (однозамещенный фосфорнокислый калий – 2,4 г, магний сернокислый – 0,24 г, магний лимоннокислый – 0,6 г, L-аспарагин – 3,6 г, глицерин – 12 мл, вода дистиллированная – 600 мл), 1 л яичной массы, 20 мл 2% раствора малахитовой зелени, рибофлавин из расчета 10 мг на 200 мл готовой среды.

Вариант 8: то же, что и в варианте 7 (600 мл), но с добавлением рибофлавина из расчета 20 мг на 200 мл готовой среды.

Вариант 9: то же, что и в варианте 7 (600 мл), но с добавлением рибофлавина из расчета 40 мг на 200 мл готовой среды.

Исследованы питательные среды Левенштейна-Йенсена (контроль), Левенштейна-Йенсена с рибофлавином, Левенштейна-Йенсена предварительно замороженная, яично-овощная среда, яично-овощная среда с рибофлавином, среда с лизином, среда с лизином и рибофлавином, яично-овощная среда с лизином и рибофлавином, среда Финн-И. Выполненные исследования включали оценку эффективности влияния на рост МБТ различной концентрации растительных компонентов, лизина, рибофлавина, компонентов солевого раствора, эффекта «замораживания и размораживания», культуральных свойств питательной среды и оценку диагностической и экономической эффективности использования сред.

Установлено достоверное влияние на время роста МБТ ($F=10,98$; $p<0,001$) изменения концентрации растительных компонентов (картофель, морковь, фасоль). Наибольшая скорость роста МБТ наблюдалась при посеве культуры Н₃₇RV на вариант среды 1 – $5,54\pm 0,43$ сут., в сравнении с вариантом среды 3 – $6,93\pm 0,46$ сут. ($p<0,05$). По этой причине для дальнейшего изучения был отобран вариант питательной среды 1, так как при наименьшем количестве ингредиентов обеспечивалась преимущественная эффективность культуральных свойств среды.

Ее дальнейшее совершенствование было связано с проведением сравнительных исследований влияния аминокислот на рост МБТ: L-аспарагина (в среде Левенштейна-Йенсена) и нового, предложенного нами, конкурирующего ингредиента – лизина. При этом предпочтение было отдано лизину отечественного производства, поскольку результаты исследования могли иметь значение для оценки эффективности импортозамещающей технологии.

Более высокая скорость роста МБТ получена при посеве культуры на питательную среду 5-го варианта (содержание лизина – 1,9 г в 600 мл солевого раствора, время появления роста МБТ – $5,94\pm 0,44$ сут.) в сравнении с таковой при применении варианта 4 (время появления роста $7,48\pm 0,50$ сут.), различия статистически достоверны ($p<0,05$). Интенсивность роста культуры Н₃₇RV на питательных средах данных вариантов была практически одинаковой и не зависела от увеличения в них концентрации аминокислоты. Однако интенсивность в 1+ и 2++ была наибольшей при росте культуры в среде варианта 5 ($94,0\pm 2,2\%$) и наименьшей – в среде варианта 6 ($87,0\pm 3,2\%$). Для дальнейшего изучения был отобран вариант 5.

При анализе показателей роста культуры Н₃₇RV на средах с различной концентрацией рибофлавина наблюдалось статистически достоверное увеличение интенсивности роста при посеве материала на среду варианта 8 (20 мг в 200 мл среды) в сравнении с интенсивностью роста материала в среде варианта 7 (1+; $p=0,02$; 2++; $p=0,05$) и варианта 9 (1+; $p=0,03$; 2++; $p=0,01$). Различия скорости роста наблюдались при посеве суспензии культуры на среду варианта 8 ($5,80\pm 0,31$ сут.) и среду варианта 9 ($6,93\pm 0,38$ сут., $p<0,05$).

Сравнительный анализ интенсивности и скорости роста культуры МБТ позволил отобрать для дальнейшего изучения среду варианта 8 как наиболее эффективную, с оптимальной концентрацией рибофлавина (20 мг в 200 мл).

Нами также учтено, что одним из факторов, оказывающим влияние на живые организмы, является разность температур (низкая и высокая). Принимая во внимание, что вода как внутриклеточная и межклеточная среда при замерзании принимает жидкокристаллическую структуру, аналогичную таковой связанной воде живых тканей, и в течение некоторого времени данная структура сохраняется после таяния воды, повышая устойчивость и стимулируя размножение, дальнейшие исследования были выполнены с применением

эффекта «замораживания и размораживания». Полученные результаты позволили утверждать, что показатели скорости роста культуры $H_{37}RV$ на среде Левенштейна-Йенсена и среде Левенштейна-Йенсена, предварительно замороженной, достоверно не различались ($p > 0,05$), в то время как интенсивность роста была выше на среде, предварительно замороженной ($p < 0,05$). Установлено, что к одному и тому же сроку (5-е сут.) интенсивный рост наблюдался в $11,0 \pm 2,7\%$ случаев на контрольной среде и в $27,0 \pm 3,9\%$ - на испытуемой ($p < 0,05$); суммарный умеренный и интенсивный рост составил – $79,03 \pm 3,6\%$ и $92,0 \pm 2,4\%$, соответственно ($p < 0,05$).

Исследования скорости роста МБТ в растворах с 2- и 4-кратным уменьшением, а также 3-кратным увеличением содержания глицерина на фоне уменьшения концентрации в них солевых компонентов, а также контрольной по солевому составу среды позволили установить, что наибольшая скорость роста МБТ имеет место при посеве культуры на среду с 3-кратным увеличением содержания глицерина на фоне уменьшения концентрации солевых компонентов, в сравнении с контролем ($4,89 \pm 1,04$ сут. и $5,48 \pm 0,80$ сут. соответственно, $p = 0,01$).

На основании полученных результатов для дальнейшего изучения были отобраны питательные среды с концентрацией растительных компонентов (белая фасоль, картофель, морковь) по 300 г, лизин – 1,91 г и рибофлавин – 20 мг на 200 мл среды, соответственно, а также солевой раствор с трехкратным увеличением концентрации глицерина в его составе на фоне уменьшения содержания солевых компонентов, – как наиболее эффективные.

Время появления роста ЛЧ МБТ штамма колебалось от 5,4 до 6,75 сут. На контрольной среде оно составило $5,50 \pm 0,15$ сут., на среде с лизином и рибофлавином – $6,75 \pm 0,21$ сут. ($p = 0,001$). Анализ интенсивности роста колоний МБТ выявил преимущество яично-овощной среды с лизином и рибофлавином: рост КОЕ на ней составил $84,0 \pm 3,0\%$, что выше, чем на контрольных средах Левенштейна-Йенсена – $71,0 \pm 2,9\%$ ($p < 0,05$) и Финн-II – $73,0 \pm 3,0\%$ ($p < 0,05$).

Срок появления роста при посеве ЛУ штамма МБТ составил: при посеве материала на среду Левенштейна-Йенсена с рибофлавином – $11,46 \pm 0,35$ сут., что достоверно быстрее, чем при посеве на среду с лизином и рибофлавином – $16,37 \pm 0,28$ сут. ($p < 0,001$). Скорость роста на контрольной среде Левенштейна-Йенсена составила $13,0 \pm 0,30$ сут. На среде Финн-II рост микобактерий получен через $12,8 \pm 0,20$ сут., что также достоверно больше, чем на среде Левенштейна-Йенсена с рибофлавином ($p < 0,05$). Интенсивность роста культуры ЛУ штамма МБТ на вариантах питательных сред статистически достоверно не различалась.

Таким образом, рост ЛУ штамма МБТ, будучи в целом замедленным, по сравнению с таковым ЛЧ штамма, умеренно ускорялся при добавлении рибофлавина к питательной среде Левенштейна-Йенсена. Интенсивность роста МБТ $H_{37}RV$, лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного изолятов МБТ на питательных средах с лизином, яично-овощной с

рибофлавином, яично-овощной с лизином и рибофлавином на 24%, 23% и на 16% выше, чем в контроле ($p < 0,05$).

Наибольшее значение для лабораторной диагностики туберкулеза имеют результаты исследований биологического материала, полученного от больных туберкулезом, и в первую очередь, – мокроты (таблица 1).

Таблица 1 – Сроки появления роста МБТ из мокроты бактериовыделителей на питательных средах

Наименование среды	Кол-во посевов	Время появления роста в днях ($\bar{X} \pm s_x$)	Сроки роста (max- min; сут)
1. Левенштейна-Йенсена (контроль)	238	$38,7 \pm 0,70$	17- 67
2. Левенштейна-Йенсена с рибофлавином	145	$33,9 \pm 0,90$	16 – 59
3. Яично-овощная	205	$33,05 \pm 0,70$	13 – 54
4. Яично-овощная с рибофлавином	190	$29,15 \pm 0,60$	15 – 52
5. Питательная с лизином	191	$33,5 \pm 0,65$	17 – 57
6. Питательная с лизином и рибофлавином	161	$31,4 \pm 0,60$	17 – 55
7. Яично-овощная с лизином и рибофлавином	53	$30,7 \pm 0,70$	21 – 41
8. Финн-II	53	$36,9 \pm 0,73$	17 – 63

Время появления роста МБТ (таблица 1) колебалось от 67 суток при посеве на контрольную среду до 41 суток – при посеве на яично-овощную среду с лизином и рибофлавином. На последней получен наименьший интервал между минимальным и максимальным сроком (20 сут.), в отличие от контрольной среды – 50 сут. МБТ росли статистически достоверно быстрее на среде Левенштейна-Йенсена с рибофлавином ($33,9 \pm 0,90$ сут.; $p = 0,007$), яично-овощной среде ($33,05 \pm 0,70$ сут.; $p = 0,001$), яично-овощной с рибофлавином ($29,15 \pm 0,60$ сут.; $p < 0,001$), средах с лизином ($33,5 \pm 0,65$ сут.; $p = 0,004$), с лизином и рибофлавином ($31,4 \pm 0,60$ сут.; $p < 0,001$) и на яично-овощной среде с лизином и рибофлавином ($30,7 \pm 0,70$ сут.; $p < 0,001$), – по сравнению с ростом в контрольной питательной среде ($38,7 \pm 0,70$ сут.). Следует отметить, что время появления роста МБТ из мокроты на средах Левенштейна-Йенсена и Финн-II не различалось ($p > 0,05$). В то же время, микобактерии достоверно быстрее вырастали на яично-овощной среде с рибофлавином ($p < 0,001$), среде с лизином и рибофлавином ($p = 0,005$) и яично-овощной среде с лизином и рибофлавином ($p = 0,002$), в сравнении со скоростью роста МБТ на среде Финн-II ($36,9 \pm 0,73$ сут.).

Таким образом, более ранние сроки роста МБТ из мокроты бактериовыделителей получены на яично-овощной среде с рибофлавином ($29,15 \pm 0,6$ сут.) и на яично-овощной среде с лизином и рибофлавином ($30,7 \pm 0,7$

сут.), они оказались на 9,55 и 8,0 суток меньшими, чем в контроле ($p < 0,05$). Максимальный срок появления роста МБТ из мокроты бактериовыделителей при посеве на яично-овощную среду с лизином и рибофлавином сократился на 26 суток (с 67 до 41 суток), по сравнению с таковым на среде Левенштейна-Йенсена (эффективность 20%). Частота появления роста МБТ из мокроты бактериовыделителей была достоверно выше к 20-м, 30-м и 40-м суткам инкубации на питательной яично-овощной среде с рибофлавином и на яично-овощной среде с лизином и рибофлавином ($p < 0,05$).

Исследования по изучению влияния эффекта «замораживания и размораживания» на скорость и интенсивность роста МБТ из мокроты бактериовыделителей отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Характер роста МБТ из мокроты бактериовыделителей на среде Левенштейна-Йенсена, предварительно замороженной

Наименование среды	Кол-во посевов	Время появления роста в днях ($\bar{X} \pm s_x$)	Интенсивность роста по 3-балльной системе, в %		
			1 (+)	2 (++)	3 (+++)
Левенштейна-Йенсена (контроль)	43	36,58 \pm 3,40	39,0 \pm 4,3%	50,0 \pm 4,4%	11,0 \pm 2,2%
Левенштейна-Йенсена предварительно замороженная	43	27,02 \pm 1,14	10,0 \pm 2,6%	69,0 \pm 4,1%	21,0 \pm 3,6%
p		<0,05	=0,002	=0,03	>0,05

Установлено статистически достоверное увеличение скорости роста МБТ из мокроты бактериовыделителей (таблица 2) на среде Левенштейна-Йенсена, предварительно замороженной по сравнению с таковой в контрольной среде ($p < 0,05$). Кроме того, отмечено статистически достоверное увеличение интенсивности роста при КОЕ 1+ и 2++. В целом, умеренный и интенсивный рост МБТ на испытываемой среде составил 90,0 \pm 2,6%, а на контрольной – 60,0 \pm 4,3% ($p < 0,05$). Приведенные данные свидетельствуют о наличии преимуществ среды Левенштейна-Йенсена предварительно замороженной, перед контрольной. Таким образом, использование эффекта «замораживания и размораживания» позволяет повысить на 26,1% скорость роста МБТ ($p < 0,05$). Скорость роста ЛЧ и ЛУ штаммов МБТ на среде Левенштейна-Йенсена возрастала при использовании эффекта «замораживания и размораживания» на 12,5% и 14,7% ($p < 0,05$).

Результаты проведенных исследований показали, что колонии культур МБТ музейного, ЛУ и ЛЧ штаммов, МБТ из мокроты бактериовыделителей на разработанных питательных средах соответствовали таковым на контрольной среде: R-формы, сухие, морщинистые, цвета слоновой кости.

Известно, что ряд микобактерий дает рост только при длительных (более 40 суток) сроках инкубации. Полученные нами данные, отражающие скорость

роста МБТ (мокрота бактериовыделителей) на разработанных питательных средах при позднем исходном росте на среде Левенштейна-Йенсена (более 40 суток со дня посева), представлены в таблица 3.

Таблица 3 – Показатели скорости роста МБТ из мокроты бактериовыделителей на предложенных и контрольной питательных средах при позднем исходном росте на среде Левенштейна-Йенсена (более 40 суток)

Наименование среды	Исследуемый материал	Число посевов	Время появления роста, сут ($\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$)	p
1. Левенштейна-Йенсена (контроль)	Мокрота	62	50,0±1,04	$p_{1-2} < 0,05$
2. Яично-овощная		62	40,0±1,6	$p_{1-4} < 0,03$
3. Левенштейна-Йенсена с рибофлавином		62	43,9±1,1	$p < 0,01$
4. Яично-овощная с рибофлавином		62	33,6±1,6	
5. Финн-П		43	46,3±1,15	$p_{1-5} > 0,05$

Об эффективности разработанных питательных сред (таблица 3) в отношении сроков появления роста МБТ из мокроты бактериовыделителей при достаточно позднем исходном росте микобактерий (40 и более суток) на среде Левенштейна-Йенсена свидетельствует ускорение роста МБТ на 10-16 суток (20% – 32,8%; $p < 0,05$).

Оценка диагностической информативности лабораторного теста базируется на предварительном точном установлении диагноза заболевания. Для установления диагностической значимости лабораторных тестов используется методика оценки диагностической чувствительности, диагностической эффективности, что позволяет подобрать наиболее информативные лабораторные тесты для целенаправленного их использования.

Диагностическая чувствительность и эффективность культуральной лабораторной диагностики туберкулеза при использовании новых плотных питательных сред составила: контроль – 34,31%, среда Левенштейна-Йенсена с рибофлавином – 40,69% (+6,4% к контролю), яично-овощная среда – 45,04% (+10,7% к контролю), яично-овощная с рибофлавином – 54,56% (+20,25% к контролю), среда с лизином – 42,41% (+8,1% к контролю), среда с лизином и рибофлавином – 47,5% (+13,9% к контролю), яично-овощная с лизином и рибофлавином – 58,97% (+24,66% к контролю).

Одним из важных этапов любого диагностического исследования является снижение себестоимости выполняемого диагностического теста. Произведенный расчет стоимости разработанных питательных сред позволил выбрать наиболее выгодные с экономической точки зрения их варианты, имеющие наименьшую себестоимость производства в пересчете на один посев, с учетом количества выполняемых бактериологических исследований в Республике Беларусь, таблица 4.

Таблица 4 – Экономические затраты при применении питательных сред (в белорусских рублях) для бактериологической диагностики туберкулеза

Питательные среды	Стоимость 1 посева (пробирки)	Количество посевов в РБ			Экономические затраты, бел.руб.
		2005г.	2006 г.	2007 г.	
Левенштейна-Йенсена (контроль)	100,0	554111	573295	530000	53 000,0 – 57 329,5
Левенштейна-Йенсена с рибофлавином	100,4	554111	573295	530000	53 212,0 – 57 558,82
Яично-овощная	49,0	554111	573295	530000	25 970,0 – 28 091,46
Яично-овощная с рибофлавином	49,4	554111	573295	530000	26 182,0 – 28 320,77
С лизином	52,0	554111	573295	530000	27 560,0 – 29 811,34
С лизином и рибофлавином	53,0	554111	573295	530000	28 090,0 – 30 384,64
Яично-овощная с лизином и рибофлавином	48,0	554111	573295	530000	25 440,0 – 27 518,16
Финн-II	65,0	554111	573295	530000	34 450,0 – 37 264,18

Как видно из таблицы 4, экономические расчеты свидетельствуют о том, что наименьшую стоимость имеет культивирование МБТ на среде яично-овощной с лизином и рибофлавином, которое в 2 раза ниже стоимости использования контрольной среды Левенштейна-Йенсена и в 1,35 раза – среды Финн-II. Заметный экономический эффект создают также среда с лизином и среда с лизином и рибофлавином: в 1,88 и 1,22 раза, соответственно. Общий экономический эффект применения разработанных питательных сред позволит экономить на проведении лабораторных (бактериологических) исследований до 32 млн. белорусских рублей ежегодно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

В результате выполненных исследований впервые получены новые данные о жизнеспособности МБТ, а также новые сведения о стимулирующем влиянии на рост возбудителей таких компонентов среды, как аминокислота лизин, рибофлавин и эффект низких температур – «замораживание и размораживание»; показано, что L-аспарагин, являющийся неотъемлемым компонентом среды Левенштейна-Йенсена, может быть заменен аминокислотой лизин (отечественного производства) без ущерба для качества питательной среды [3, 5, 6, 10, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21].

Полученные результаты позволили предложить для лабораторной диагностики туберкулеза новые, более эффективные питательные среды: яично-овощную, яично-овощную с лизином, яично-овощную с рибофлавином,

ячно-овощную с лизином и рибофлавином, плотную питательную среду с лизином, усовершенствованную среду Левенштейна-Йенсена, а также рекомендовать к использованию эффект «замораживания и размораживания». Диагностическая эффективность и диагностическая чувствительность разработанных питательных сред на 24,6% выше диагностической чувствительности и диагностической эффективности контрольной среды ($p < 0,05$).

На основании статистического анализа результатов лабораторных методов исследования музейного (1713 посевов), лекарственно-чувствительного, лекарственно-устойчивого штаммов МБТ (756 посевов), а также МБТ из биологического материала (мокрота 108 бактериовыделителей, 1322 посева) были **сделаны следующие выводы:**

1. Использование в рецептуре приготовления плотных питательных сред растительных компонентов (картофель, фасоль, морковь), аминокислоты лизин, витамина В₂ на фоне изменения состава ингредиентов солевого раствора, позволяет получить новые питательные среды и повысить эффективность культивирования микобактерий туберкулеза на 24,6% ($p < 0,05$) [1, 2, 3, 4, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21].

2. Использование аминокислоты лизин в составе плотных питательных сред позволяет сократить срок появления роста МБТ из мокроты бактериовыделителей на 5,2 суток (13,4%): с $38,7 \pm 0,70$ суток на среде Левенштейна-Йенсена до $33,5 \pm 0,65$ суток на питательной среде с лизином ($p < 0,05$) [1, 2, 6, 8, 9, 10, 21].

3. Применение активаторов роста МБТ (рибофлавин, эффект «замораживания и размораживания») позволяет повысить в среднем на 26,1% ($p < 0,05$) эффективность питательной среды Левенштейна-Йенсена: сократить на 9,5 суток время роста МБТ из мокроты бактериовыделителей ($p < 0,05$) при высокой интенсивности роста ($p < 0,05$); увеличить скорость роста лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого штаммов МБТ на 12,5-14,7% ($p < 0,05$) и сократить максимальный срок появления роста МБТ из мокроты на 26 суток (с 67 до 41 суток), по сравнению с контролем ($p < 0,05$) [6, 9, 12, 17, 21].

4. Разработанные плотные питательные среды по скорости и интенсивности роста на них МБТ музейного штамма Н₃₇RV, лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного изолятов и МБТ, выделенных из мокроты бактериовыделителей, превосходят среду Левенштейна-Йенсена по скорости роста: при культивировании штамма Н₃₇RV на 1,34-1,96 суток ($p < 0,05$); МБТ мокроты бактериовыделителей – 8,0-9,55 суток ($p = 0,001$); МБТ мокроты бактериовыделителей при позднем (40 и более суток) исходном их росте в контроле на 10-16,4 суток (20-32,8%, $p < 0,05$). Интенсивность роста МБТ Н₃₇RV, лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного изолятов, мокроты бактериовыделителей выше, чем в контроле, на 16-24% ($p < 0,05$) [3, 5, 7, 8, 11, 21].

Рекомендации по практическому использованию результатов

На основании полученных данных установлено, что важнейшими свойствами разработанных питательных сред является более высокая диагностическая эффективность, ранний, быстрый и интенсивный рост МБТ, доступность (только отечественные компоненты), низкая стоимость по сравнению с импортными аналогами (стоимость разработанных питательных сред по сравнению с контрольной ниже в 2 раза). Их применение сокращает сроки проведения бактериологического исследования и служит основанием для рекомендации их к практическому использованию в клинической лабораторной практике.

Разработанные среды рекомендуются для практического использования в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений. Их применение позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики туберкулеза, сократить сроки проведения культурального исследования и получить тем самым значительный (до 32 млн. бел. рублей в год) экономический эффект [16, 17, 18, 19, 20, 21].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Кузнецов, О.Е. Плотная питательная среда для выращивания микобактерий туберкулеза с лизином и рибофлавином / О.Е. Кузнецов // Медицинские новости. – 2004. – №10 (112). – С. 91-93.

2. Кузнецов, О.Е. Питательная среда для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов // Медицинская панорама. – 2004. – №7 (42). – С. 23-25.

3. Кузнецов, О.Е. Усовершенствование плотных питательных сред для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов // Журн. Гродненского государственного медицинского университета. – Гродно, 2003. – № 4. – С. 89-92.

4. Кузнецов, О.Е. Плотная питательная яично-овощная среда для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг // Медицинская панорама. – 2004. – №7 (42). – С. 25-26.

5. Кузнецов, О.Е. Пути удешевления и улучшения питательной среды Левенштейна-Йенсена для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг // Здоровоохранение Беларуси. – 2005. – № 5. – С. 61-64.

6. Кузнецов О.Е. Использование аминокислоты лизин и витаминной добавки «Рибофлавин» в составе плотной питательной среды для выращивания микобактерий / О.Е. Кузнецов, Д.В. Шевчук // Медицинская панорама. – №10 (56). – 2005. – С. 77-78.

Статьи в сборниках научных трудов

7. Кузнецов, О.Е. Модификация среды Левенштейна-Йенсена для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов // Актуальные проблемы фтизиатрии и пульмонологии: сб. научных трудов к 75-летию НИИ пульмонологии и фтизиатрии / НИИ пульмонологии и фтизиатрии: под ред. Г.Л. Гуревича [и др.]. – Минск, 2003. – С. 169-171.

8. Кузнецов, О.Е. Плотная питательная среда микобактерий с лизином для выращивания туберкулеза / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг // Труды Гродненского государственного медицинского университета (к 45-летию университета) / Гродн. гос. мед. ун-т; редкол.: И.Г. Жук [и др.]. – Гродно, 2003. – С. 37-40.

Материалы конференций

9. Кузнецов, О.Е. Использование витаминных добавок и аминокислоты лизин в составе питательных сред для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов // Материалы 3-й международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы пенитенциарной медицины. ВИЧ/СПИД в местах лишения свободы / Департ. исполн. наказ. МВД РБ.: Э.А. Вальчук, Г.Л. Гуревич, М.Л. Доценко. – Минск, 2006. – С. 137-142.

10. Кузнецов О.Е. Использование растительных компонентов, лизина и рибофлавина, в составе питательных сред для выращивания микобактерий / О.Е. Кузнецов // Материалы VII съезда специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь «Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке»: Бел. мед. акад. последипл. образов.: В.И. Жарко [и др.]. – Минск, 2007. – С. 187-189.

11. Кузнецов, О.Е. Усовершенствование питательных сред для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг // Достижения медицинской науки Беларуси: науч.-практ. ежегодник. – Минск, 2003. – В. VII – С. 145-146.

12. Кузнецов, О.Е. Способ ускорения роста микобактерий туберкулеза на предварительно замороженной среде Левенштейна-Йенсена / О.Е. Кузнецов // Материалы VI съезда Республиканского научного общества специалистов клинической лабораторной диагностики / Медицинская панорама: редкол.: Г.М. Костин [и др.]. – 2002. – № 8 (23). – С. 40.

Тезисы докладов

13. Кузнецов, О.Е. Среда для выращивания микобактерий туберкулеза / О.Е. Кузнецов // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов, посвященная памяти академика Ю.М. Островского: тез. докладов / Гродн. гос. мед. ун-т; редкол.: И.Г. Жук [и др.]. – Гродно, 2003. – С. 112.

14. Kuznetsov, O. Modification of Levenshtein-Yensen ambience for growing mycobacterium of tuberculosis / O. Kuznetsov // Ogolnopolska konferencja naukova. Streszczenia / Akademia Medyczna w Bialystoku; part.: J. Gorski – Bialystok, 2003. – P. 27-28.

15. Kuznetsov, O. The thick nourishing ambience for growing mycobacterium of tuberculosis with lysine and riboflavin / O. Kuznetsov, A. Kuznetsova // Ogolnopolska konferencja naukova. Streszczenia / Akademia Medyczna w Bialystoku; part.: J. Gorski – Bialystok, 2004. – P. 31-32.

Патенты

16. Плотная яично-овощная питательная среда Кузнецова для выращивания микобактерий туберкулеза: пат. 8560 Респ. Беларусь, С 12Q 1/04, С 12N 1/20 // (С 12Q 1/04, С 12R 1:32) / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг; заявитель Гродн. гос. мед. ун-т. – № а 20030159; заявл. 24.02.03; опубл. 30.09.04 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2006. – №5. – С. 84.

17. Способ приготовления питательной среды, ускоряющей рост микобактерий туберкулеза: пат. 8822 Респ. Беларусь, С 12N 1/20 / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг; заявитель Гродн. гос. мед. ун-т. – № а 20030329; заявл. 14.04.03; опубл. 30.12.04 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2006. – №6. – С.95.

18. Плотная питательная среда для выращивания микобактерий туберкулеза: пат. 8751 Респ. Беларусь, С 12N 1/00 / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг; заявитель Гродн. гос. мед. ун-т. – № а 20030923; заявл. 07.10.03; опубл. 30.06.05 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2006. – №6. – С. 95.

19.Плотная яично-овощная питательная среда с лизином и рибофлавином для выращивания микобактерий туберкулеза: пат. 9286 Респ. Беларусь, С 12Q 1/04, С 12N 1/20//(С 12Q 1/04, С 12R 1:32) / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг; заявитель Гродн. гос. мед. ун-т. – № а 20040656; заявл. 12.07.04; опубл. 07.02.07 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2007. – №3. С. 99-100.

20.Плотная яичная питательная среда для выращивания микобактерий туберкулеза: пат. 9287 Респ. Беларусь, С 12Q 1/04, С 12N 1/20//(С 12Q 1/04, С 12R 1:32) / О.Е. Кузнецов, И.С. Гельберг; заявитель Гродн. гос. мед. ун-т. – № а 20040657; заявл. 12.07.04; опубл. 07.02.07 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2007. – №3. – С. 100.

Инструкции по применению

21.Инструкция о повышении эффективности лабораторной диагностики туберкулеза на основе разработки и внедрения в клинико-лабораторную практику новых питательных сред для выращивания микобактерий туберкулеза: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь № 068-0706 23.05.08. – Минск: 2008. – 7 с.



РЕЗЮМЕ

Кузнецов Олег Евгеньевич

Культуральная лабораторная диагностика туберкулеза на основе использования аминокислот и небелковых модуляторов метаболизма (экспериментально-лабораторное исследование)

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза (МБТ), лабораторная диагностика, туберкулез органов дыхания (ТОД), плотные питательные среды (ППС), скорость роста, интенсивность, колониеобразующие единицы (КОЕ), лекарственно-устойчивый (ЛУ), лекарственно-чувствительный (ЛЧ).

Объект исследования: 8 вариантов ППС, музейный штамм H₃₇RV, ЛУ и ЛЧ штамм МБТ, мокрота 108 больных ТОД - бактериовыделителей.

Цель исследования: разработать новые, экономически более эффективных плотные питательные среды для выращивания МБТ и усовершенствовать существующую среду Левенштейна-Йенсена.

Методы исследования: клинические, бактериологические, бактериоскопические, статистические.

Полученные результаты: В ходе исследования была усовершенствована среда Левенштейна-Йенсена, разработаны новые варианты плотных питательных сред для выращивания МБТ. Установлено, что предложенная рецептура приготовления и усовершенствования питательных сред для бактериологической диагностики туберкулеза с включением в их состав растительных компонентов, аминокислоты отечественного производства лизин (импортозамещающая технология), витамина В₂ (рибофлавин) и использование с целью стимуляции роста МБТ простого и доступного эффекта предварительного «замораживания и размораживания» среды может быть использовано в получении плотных питательных сред для выращивания МБТ. Усовершенствованные и разработанные ППС по диагностической эффективности (скорость и интенсивность роста МБТ музейного штамма H₃₇RV, ЛУ и ЛЧ изолятов и микобактерий, выделенных из мокроты бактериовыделителей) превосходят традиционно используемую среду Левенштейна-Йенсена и более чем в 2 раза экономичнее ее. Полученные данные комплексной оценки исследованных плотных питательных сред (оценка качественных характеристик на музейном штамме H₃₇RV, клинических изолятах ЛУ и ЛЧ штаммов МБТ и мокроте бактериовыделителей и их экономическая значимость) позволяют рекомендовать их к использованию.

Рекомендации по использованию: плотные питательные среды могут использоваться для выращивания МБТ в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений Республики.

Область применения: лабораторная диагностика.

Кузняцоў Алег Яўгеневіч

Культуральная лабараторная дыягностыка сухотаў на аснове выкарыстання амінакіслот і небялковых мадулятараў метабылізму (эксперыментальна-лабараторнае даследаванне)

Ключавыя словы: мікрабактэрыі сухотаў (МБС), лабараторная дыягностыка, сухоты органаў дыхання (СОД), шчыльныя пажыўныя асяродзі (ШПА), хуткасць росту, інтэнсіўнасць, калоніяўтвараючы адзінкі (КУА), лекава-ўстойлівы (ЛУ), лекава-адчувальны (ЛА).

Аб'ект даследавання: 8 варыянтаў ШПА, музейны штам Н₃₇RV, ЛУ і ЛА штам МБС, макрота 108 хворых на СОД – бактэрыявыдзяляльнікаў.

Мэта даследавання: распрацаваць новыя эканамічна больш эфектыўныя шчыльныя пажыўныя асяродзі для вырошчвання МБС і удасканаліць асяродзе Левенштэйна-Йенсана.

Метады даследавання: клінічныя, бактэрыялагічныя, бактэрыяскапічныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі: у працэсе работы было ўдасканалена асяродзе Левенштэйна-Йенсана, распрацаваны новыя варыянты шчыльных пажыўных асяродзяў для вырошчвання МБС. Выяўлена, што прапанаваная рэцэптура прыгатавання і ўдасканалення пажыўных асяродзяў для бактэрыялагічнай дыягностыкі сухотаў з уключэннем у іх склад раслінных кампанентаў, амінакіслоты айчыннай вытворчасці лізін (імпартазамыняльнай тэхналогіі), вітаміна В2 (рыбафлавін) і выкарыстанне з гэтай стымуляцыі росту МБС простага метад папярэдняга замарожвання і размарожвання асяродзя можа быць выкарыстана ва ўтрыманні шчыльных пажыўных асяродзяў для вырошчвання МБС. Удасканаленыя і распрацаваныя ШПА па дыягнастычнай эфектыўнасці (хуткасці і інтэнсіўнасці росту МБС музейнага штама Н₃₇RV, ЛУ і ЛА ізалятаў і мікрабактэрыі, выдзеленыя з макроты бактэрыявыдзяляльнікаў) перавышаюць традыцыйна выкарыстоўваемае асяродзе Левенштэйна-Йенсана і больш за 2 разы эканамічнае за яе. Атрыманыя даныя комплекснай ацэнкі даследаваных шчыльных пажыўных асяродзяў (ацэнка якасных характарыстык на музейным штаме Н₃₇RV, клінічных ізалатах ЛУ і ЛА штамаў МБС і макросе бактэрыявыдзяляльнікаў і іх эканамічнай значнасці), дазваляюць рэкамендаваць іх да выкарыстання.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: шчыльныя пажыўныя асяродзі можна выкарыстоўваць для вырошчвання МБС у бактэрыялагічных лабараторыях процісхотных устаноў Рэспублікі.

Галіна прымянення: лабараторная дыягностыка.

SUMMARY

Kuzniatsov Aleh Evgenievich

The laboratory diagnostics of the tuberculosis with the use of amino acids and the protein modulators of metabolism for in culture research (experimental-laboratory research)

Key words: mycobacterium of tuberculosis, laboratory diagnostics, pulmonary tuberculosis, thick (solid) nutrient medium, growth velocity, intensity, colony-forming unit, drug-resistant, drug-sensible.

Object of investigation: 8 variants of thick nourishing ambiances, museum culture H₃₇RV, drug-resistant and drug-sensible culture of mycobacteria tuberculosis, sputum of 108 patients with pulmonary tuberculosis - sputum of bacterium secreters.

The aim of the investigation: develop new economically more effective thick nourishing ambiances for growing micobacteria of tuberculosis and improve ambience Levenshtein-Yensen.

The methods of the investigations: clinical, bacteriological, bacterioscopy, statistical.

The obtained results: the medium of Levenshtein-Yensen was improved during work, new variants of thick nourishing ambiances for growing mycobacteria of tuberculosis were develop. It was determine, that proposed compounding of preparation and improvement of nutrient medium for bacteriological diagnostics of tuberculosis with inclusion to their composition plant components, amino acid – lysine, vitamin B₂ (riboflavin) and using simple method of preliminary freezing and thawing of medium may be used for receiving thick nourishing ambiances for growing mycobacteria of tuberculosis. Improved and developed the thick nourishing ambiances on diagnostic effectiveness (intensity and growth velocity of mycobacteria tuberculosis of museum culture H₃₇RV, drug-resistant and drug-sensible isolates and mycobacteria separated from the sputum of persons discharging bacteria) excel traditionally used medium of Levenshtein-Yensen and more than 2 times economical of it. Obtained data of complex assessment of investigated thick (solid) nutrient medium (assessment of qualitative characteristics on museum culture H₃₇RV, drug-resistant and drug-sensible isolates of mycobacteria tuberculosis) allow us to recommend them for using.

Recommendation for using: the thick nourishing ambience may be used for growing mycobacteria of tuberculosis in bacteriological laboratories in antituberculous institutions Republic.

The field of application: laboratory diagnostics.