

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ МОКРОТЫ НА ВИТАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Ю. Д. РОДИОНОВА, О. А. ГУСЯКОВА, А. В. ЛЯМИН, Е. А. БОРОДУЛИНА, А. В. КОЗЛОВ

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Самара

Цель исследования: повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулезной инфекции за счет проведения ряда исследований влияния различных условий хранения клинического материала на ростовые свойства микобактерий туберкулезного комплекса.

Материалы и методы. Проанализировано 2 058 проб свободно собранной мокроты. Все образцы мокроты аликвотировались на 5 проб, которые хранили в различных условиях: в холодильнике при 7°C в течение 2 ч; в замороженном состоянии в течение 7 дней; при комнатной температуре в течение 48-72 ч; с использованием консервирующего 10% раствора натрия фосфорно-кислого трехзамещенного в течение 48 ч; в холодильнике при 7°C в течение 2 ч с последующей обработкой 1% раствором N-ацетил-L-цистеин.

Результаты. Оптимальным условием хранения мокроты является замораживание при -20°C, обеспечивающее максимальную сохранность возбудителя и минимальную контаминацию материала посторонней флорой. Хранение мокроты при комнатной температуре в течение 2-3 дней снижает количество положительных посевов на питательных средах. Использование при консервации материала 10% натрия фосфорно-кислого трехзамещенного обеспечивает высокий положительный результат бактериоскопического и культурального методов исследования. Увеличение продолжительности хранения биоматериала в консервирующем растворе свыше 72 ч ведет к гибели микобактерий туберкулеза.

Ключевые слова: условия хранения мокроты, ростовые свойства, микобактерии туберкулеза, питательная среда, лабораторная диагностика.

EVALUATION OF THE EFFECT OF SPUTUM STORAGE CONDITIONS ON THE VITAL PROPERTIES OF TUBERCULOUS MYCOBACTERIA

YU. D. RODIONOVA, O. A. GUSYAKOVA, A. V. LYAMIN, E. A. BORODULINA, A. V. KOZLOV

Samara State Medical University, Samara, Russia

Goal of the study: to enhance efficiency of laboratory diagnostics of tuberculous infection through investigating the effect of various storage conditions of samples on the growth properties of Tuberculosis complex mycobacteria.

Materials and Methods. 2058 samples of sputum collected by coughing were examined. All sputum samples were aliquoted into 5 parts stored under various conditions: in the fridge under +7°C for 2 hours; frozen for 7 days; by room indoor temperature for 48-72 hours; with the use preservative 10% solution of triple-substituted sodium phosphate for 48 hours; in the fridge under +7°C for 2 hours with consequent treatment by 1% solution of N-acetyl-L-cysteine.

Results. The most optimal sputum storage conditions are freezing by -20°C, providing maximum safety of mycobacteria and minimum contamination of the samples with foreign bacteria. Sputum storage by indoor room temperature for 2-3 days reduces the number of positive results of cultures on nutritive media. Using 10% solution of triple-substituted sodium phosphate provides high positive results of bacterioscopic and cultural testing techniques. Time prolongation for biomaterials storage in the preservative solution for more than 72 hours results in the death tuberculous mycobacteria.

Key words: sputum storage conditions, growth properties, tuberculous mycobacteria, nutritive medium, laboratory diagnostics.

При микробиологической диагностике туберкулеза, как и при любом микробиологическом исследовании, залог успеха выделения искомым микроорганизмов из клинического материала напрямую зависит от качества его сбора и условий хранения и транспортировки, последующей подготовки пробы к исследованию. К основным методам прямого подтверждения наличия микобактерий в клиническом материале можно отнести микроскопическое исследование нативной мокроты и культуральное исследование (посев на селективные среды). Микробиологические методы обладают высокой специфичностью. Однако диагностическая чувствительность методов различна. Чувствительность метода посева достигает 80-90%, метода микроскопии ниже – не более 50% от всех больных туберкулезом [2, 3, 5]. Низкая чувствительность методов обусловлена рядом факторов, основными из которых можно считать преаналитические ошибки, обуславливаю-

щие изменение жизнеспособности микобактерий в полученном клиническом материале, а как следствие, получение ложноотрицательных и/или ложноположительных результатов. По сведениям ряда авторов, на преаналитический этап приходится от 57 до 68% всех диагностических ошибок, которые ведут к потере времени и средств на проведение повторных исследований, но, что еще более серьезно, неправильной постановке диагноза. Несмотря на то что современные лабораторные диагностические технологии в последние годы все шире внедряются, тем не менее классические микробиологические методы исследования остаются востребованными и используются в лабораторной практике [7].

Действующие нормативные документы регламентируют следующие требования к условиям хранения и транспортировки диагностического материала. До момента отправки в лабораторию герметично закрытые флаконы с материалом хра-

няться в холодильнике. Срок хранения материала в холодильнике без добавления консервирующих средств не должен превышать 48-72 ч. При более длительном хранении необходимо применить консервирующие средства. Во время транспортировки материал следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. Если транспортировка и хранение занимают не более 48-72 ч, материал можно пересылать без консервации. Допускается пересылка материала в замороженном состоянии без консервации. Недопустимо после размораживания повторное замораживание диагностического материала, что ведет к нарушению структуры и тинкториальных свойств бактериальных клеток [6]. Таким образом, идеальным условием хранения и транспортировки мокроты для микробиологического исследования является охлаждение пробы в холодильнике в случае отсутствия доставки ее для исследования сразу после сбора. Целью создания данных условий является снижение вероятности размножения контаминирующей микрофлоры в образцах мокроты. Однако хранение мокроты без консерванта в течение 48-72 ч при температуре 4-8°C не исключает возможности размножения в образцах психрофильной условно патогенной микрофлоры. Использование же деконтаминантов при любых условиях косвенно или напрямую влияет на ростовые свойства микобактерий. Любой из известных деконтаминантов уничтожает и часть популяции туберкулезных микобактерий. В результате обработки может погибнуть до 90% микобактерий [1]. Кроме того, микобактерии, выделяющиеся из дыхательных путей больного, как правило, окружены большим количеством слизи, затрудняющей их концентрирование. В связи с этим необходимо использовать щадящие методы обработки, позволяющие, с одной стороны, подавить быстрорастущие условно патогенные микроорганизмы, а с другой – максимально сохранить жизнеспособность присутствующих в материале микобактерий [1, 5].

Цель исследования: определить влияние различных условий хранения клинического материала на ростовые свойства микобактерий туберкулезного комплекса.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе клинко-диагностической и бактериологической лаборатории Самарского областного противотуберкулезного диспансера и в клинко-диагностической лаборатории клиники Самарского государственного медицинского университета. Изучено бронхиальное содержимое пациентов с различными формами туберкулеза с бактериовыделением и пациентов, не выделяющих микобактерии. Под наблюдением находилось 686 человек. Из них женщин – 168, мужчин – 518. Проанализировано 2 058 проб свободно собранной мокроты.

Все собранные образцы мокроты аликвотировались на 5 проб, к которым применялись различные способы хранения и консервации:

- 1-я проба: хранились в холодильнике при 7°C в течение 2 ч, после этого были обработаны 10% раствором натрия фосфорно-кислого трехзамещенного (10% НФКТЗ);
- 2-я проба: хранились в замороженном состоянии в течение 7 дней и после этого были обработаны 10% НФКТЗ;
- 3-я проба: хранились при комнатной температуре в течение 48-72 ч и были обработаны 10% НФКТЗ;
- 4-я проба: хранились с использованием консервирующего 10% НФКТЗ в течение 48 ч;
- 5-я проба: хранились в холодильнике при 7°C в течение 2 ч и были обработаны 1% раствором N-ацетил-L-цистеин (1% NALC).

Все реактивы, используемые при приготовлении растворов для обработки диагностических материалов, имели степень очистки не менее категории «химически чистый».

Затем с помощью пастеровской пипетки брали 1,0-1,2 мл осадка и инокулировали на плотные питательные среды Левенштейна – Йенсена и Финна II. Посев производили с соблюдением стерильных условий. Оставшийся осадок в объеме 0,2 мл использовали в целях приготовления препарата для микроскопии.

После завершения посева всех проб пробирки укладывали в горизонтальном положении в «штативах-диванах» и помещали в термостат при температуре 37°C, поверхностью скола питательной среды в горизонтальной плоскости.

Далее проводили инкубацию в течение 12 нед. при обязательном еженедельном просмотре; во время еженедельного просмотра регистрировали следующие параметры для каждой питательной среды: «появление роста» – срок появления роста начиная со дня посева; «интенсивность роста» – суммарное число колониеобразующих единиц (КОЕ) на всех пробирках, засеянных данным материалом. Обработку мокроты с помощью 1% NALC проводили согласно стандартам, предусмотренным для обработки материала.

Результаты исследования

Биологический материал из первой аликвоты, собранный под контролем медицинского работника и в течение 2 ч доставленный в лабораторию для микробиологического исследования, подвергался обработке 10% НФКТЗ. Количество положительных результатов посева на плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена – 15,5%, количество положительных результатов посева на питательной среде Финна II – 23,3%. Следует отметить уровень контаминации на этих питательных средах. Рост посторонней флоры на питательной среде Левенштейна – Йенсена составил 4,6%, а на питательной среде Финна II – 3,9%.

Несмотря на то что и те и другие данные укладываются в оптимальный уровень проростов на плотной питательной среде 2-5%, количество проростов контаминантной микрофлоры на питательной среде Финна II оказалось меньше.

Вторые аликвоты проб хранились в замороженном состоянии (при температуре -20°C в течение 7 дней) и после этого были обработаны 10% НФКТЗ. На питательной среде Левенштейна – Йенсена количество положительных посевов составило 23,25%, уровень контаминации – 1,2%, количество отрицательных результатов посева – 75,55%. На плотной питательной среде Финна II количество положительных посевов составило 53,6%, уровень контаминации – 1,1% и количество отрицательных посевов – 45,3%.

Исследование третьей аликвоты, хранившейся при комнатной температуре в течение 48-72 ч и в последующем обработанной 10% НФКТЗ, показало следующие результаты. На плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена положительные результаты посевов составили 8,0%, уровень контаминации – 3,6%, отрицательные результаты посевов – 88,4%. На плотной питательной среде Финна II получены следующие данные: положительные посевы – 14,5%, что гораздо больше, чем на среде Левенштейна – Йенсена, уровень контаминации составил 4,0%, отрицательные результаты посевов – 81,5%.

Такое значительное снижение количества положительных результатов может быть связано с тем, что при длительном хранении мокроты в условиях комнатной температуры происходит размножение

быстрорастущей микрофлоры, которая потребляет оставшийся кислород и питательные вещества, быстрее, в отличие от медленно растущих микобактерий туберкулеза, которые оказываются в неблагоприятных условиях.

Анализ условий влияния консервирующего агента 10% НФКТЗ в течение 48 ч при комнатной температуре (исследование 4-й аликвоты проб) на результаты микробиологических исследований позволил получить высокий процент положительных результатов посевов на плотных питательных средах. На питательной среде Левенштейна – Йенсена положительные результаты посевов составили 15,5%, уровень контаминации – 4,6%, отрицательные результаты посевов – 79,9%. На среде Финна II положительные посевы – 23,3%, что значительно больше, чем на среде Левенштейна – Йенсена, уровень контаминации на питательной среде Финна II – 3,9%, отрицательные результаты посевов составили 72,8% (рис.).

При анализе результатов исследования из 5-й аликвоты проб, хранившейся в холодильнике при 7°C в течение 2 ч и обработанной 1% NALC, можно сделать следующие выводы. На питательной среде Левенштейна – Йенсена положительные результаты посевов составили 12,9%, уровень контаминации – 0,5%, отрицательные результаты посевов – 72,8%. На среде Финна II положительных посевов – 36,0%, что значительно больше, чем на среде Левенштейна – Йенсена, уровень контаминации на питательной среде Финна II – 3,2%, отрицательные результаты посевов составили 60,8%. Таким образом, выявлена

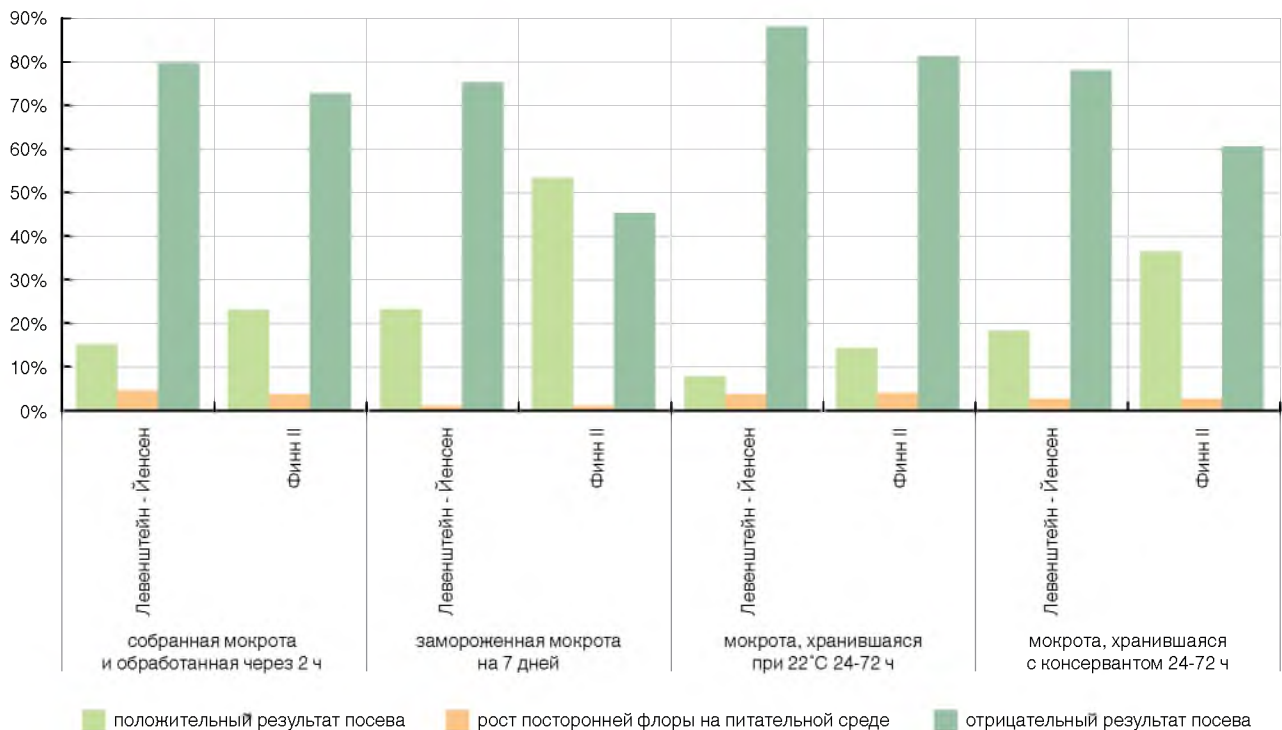


Рис. Сравнительная оценка результатов посева мокроты при разных условиях ее хранения (%)

Fig. Comparative assessment of sputum culture results with different conditions of sputum storage (%)

тенденция к снижению уровня контаминации при обработке биоматериала препаратом NALC-NaOH при посевах на плотных питательных средах, преимущественно за счет среды Левенштейна – Йенсена.

Заключение

Диагностическая эффективность микробиологических методов диагностики туберкулезной инфекции зависит от условий хранения и обработки мокроты: оптимальным условием хранения биоматериала является замораживание при -20°C, обеспечивающее максимальную сохранность возбудителя и минимальную контаминацию материала посторонней флорой. Хранение мокроты при комнатной температуре в течение 2-3 дней снижает количество положительных посевов на питательных средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И. А., Вахрушева Д. В., Владимирский М. А. и др. Правовое сопровождение организации сети референс-лабораторий микробиологической диагностики туберкулеза в РФ // Туб. и болезни легких. – 2015. – № 6. – С. 35-36.
2. Выявление туберкулеза методом микроскопии / под ред. Э. В. Севастьянова, В. И. Голышевская. – М.; Тверь: Триада, 2008. – 100 с.
3. Голышевская В. И., Севастьянова Э. В. Современное состояние микробиологической диагностики туберкулеза в России // Актуал. пробл. туб. и болезней легких: материалы научной сессии, посвященной 85-летию ЦНИИТ РАМН. – М., 2006. – С. 17-18.
4. Голышевская В. И., Севастьянова Э. В., Иртуганова О. А., Ерохин В. В. Современное состояние лабораторной службы России по диагностике туберкулеза: основные проблемы и пути их преодоления // Пробл. туб. – 2006. – № 12. – С. 36-42.
5. Голышевская В. И., Шульгина М. В. Культуральные методы диагностики туберкулеза: учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы / под ред. чл.-корр. РАМН, проф. В. В. Ерохина. – М.; Тверь: Триада, 2008. – 208 с.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 951 от 29.12.2014 г. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания. – С. 9-17.
7. Севастьянова Э. В., Пузанов В. А., Смирнова Т. Г. и др. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза // Туб. и болезни легких. – 2015. – № 1. – С. 35-41.

Использование при консервации материала 10% НФКТЗ обеспечивает высокий положительный результат бактериоскопического и культурального методов исследования. Показано, что увеличение продолжительности хранения биоматериала в консервирующем растворе свыше 72 ч ведет к гибели микобактерий туберкулеза, в связи с чем при невозможности строго регламентировать длительность хранения мокроты предпочтительным способом является ее замораживание.

Сопоставление антимикробных свойств, используемых для деконтаминации, показало, что для трехзамещенного натрия фосфорно-кислого и NaLc-NaOH оптимальным для сохранения витальных свойств микобактерий туберкулеза и угнетения посторонней флоры является NaLc-NaOH.

REFERENCES

1. Vasilieva I.A., Vakhrusheva D.V., Vladimirskiy M.A. et al. Legal support for the network of reference laboratories of microbiological tuberculosis diagnostics in RF. *Tub. i Bolezni Legkikh*, 2015, no. 6. pp. 35-36. (In Russ.)
2. *Vyyavlenie tuberkuleza metodom mikroskopii*. [Detection of tuberculosis by microscope]. Ed. by E.V. Sevastyanova, V.I. Golyshevskaya Moscow, Tver, Triada Publ., 2008, 100 p.
3. Golyshevskaya V.I., Sevastianova E.V. Current state of microbiological diagnostics of tuberculosis in Russia. *Aktual. probl. tub. i bolezney legkikh: materialy nauchnoy sessii, posvyashhennoy 85-letiyu TSNIT RAMN*. [Actual problems of tuberculosis and pulmonary diseases. Materials of the Session devoted to the 85th Anniversary of CTRI]. Moscow, 2006, pp. 17-18. (In Russ.)
4. Golyshevskaya V.I., Sevastianova E.V., Irtuganova O.A., Yerokhin V.V. Current state of the Russian laboratory services for tuberculosis diagnostics: main problems and ways of their solution. *Probl. Tub.*, 2006, no. 12. pp. 36-42. (In Russ.)
5. Golyshevskaya V.I., Shulgina M.V. *Kulturalnye metody diagnostiki tuberkuleza: uchebnoe posobie dlya provedeniya bazovogo kursa obucheniya spetsialistov bakteriologicheskikh laboratoriy uchrezhdeniy protivotuberkuleznoy sluzhby*. [Culture techniques for diagnostics of tuberculosis: manual for basic training for specialists of bacteriological laboratories of TB units]. Ed. by V.V. Yerokhin, Moscow, Tver, Triada Publ., 2008, 208 p.
6. Edict no. 951 by RF MoH as of 12.12.2014 On Approval of Guidelines for Improvement of Respiratory Tuberculosis Diagnostics and Treatment. pp. 9-17. (In Russ.)
7. Sevostianova E.V., Puzanov V.A., Smirnova T.G. et al. Assessment of microbiological and molecular genetic test methods for diagnostics of tuberculosis. *Tub. i Bolezni Legkikh*, 2015, no. 1. pp. 35-41. (In Russ.)

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ,
443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89.

Родионова Юлия Дмитриевна

кандидат медицинских наук, ассистент кафедры
фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной
диагностикой.

Тел.: 8 (846) 333-29-76.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Гусякова Оксана Анатольевна

доктор медицинских наук, заведующая кафедрой
фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной
диагностикой.

Тел.: 8 (846) 333-29-76.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Лямин Артем Викторович

старший преподаватель кафедры общей и клинической
микробиологии, иммунологии и аллергологии.

Тел.: 8 (846) 260-33-61.

E-mail: avlyamin@rambler.ru

Бородулина Елена Александровна

доктор медицинских наук, профессор, заведующая
кафедрой фтизиатрии и пульмонологии.

Тел.: 8 (846) 332-57-35.

E-mail: borodulinbe@yandex.ru

Козлов Андрей Владимирович

ординатор кафедры фундаментальной и клинической
биохимии с лабораторной диагностикой.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Samara State Medical University,
89, Chapayevskaya St.,
Samara, 443099

Julia D. Rodionova

Candidate of Medical Sciences, Assistant of Department
for Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory
Diagnostics.

Phone: +7 (846) 333-29-76.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Oksana A. Gusyakova

Doctor of Medical Sciences, Head of Department for
Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory
Diagnostics.

Phone: +7 (846) 3332976.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Artem V. Lyamin

Senior Teacher of General and Clinical Microbiology,
Immunology and Allergology Department.

Phone: +7 (846) 260-33-61.

E-mail: avlyamin@rambler.ru

Elena A. Borodulina

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Phthisiology
and Pulmonology Department.

Phone: +7 (846) 332-57-35.

E-mail: borodulinbe@yandex.ru

Andrey V. Kozlov

Resident Physician of Department for Fundamental and
Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Поступила 19.05.2016

Submitted as of 19.05.2016