

Методики лабораторных исследований

КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ. ПЛОТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

© 2020 г. Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Андреевская С.Н.,
Смирнова Т.Г., Севастьянова Э.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия

Поступила 16.06.2020

Проведен обзор существующих плотных питательных сред для культивирования микобактерий. Изложены принципы, применяемые в процессе приготовления плотных питательных сред. Приведены актуальные методики приготовления плотных яичных питательных сред. Описана техника посева на плотные питательные среды и способ оценки получаемых результатов, представлены методы идентификации выросших микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, культуральный метод, плотная питательная среда.

Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам».

DOI: 10.7868/52587667820030103

Laboratory Techniques

THE CULTURE METHOD FOR MYCOBACTERIA STUDIES. SOLID GROWTH MEDIA

Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu., Andreevskaya S.N.,
Smirnova T.G., Sevastyanova E.V.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 16.06.2020

The article represents a review of current solid media for mycobacteria growth. The principles of solid media preparation are outlined. The actual methods of solid egg media preparation are given. The article also describes the technique of inoculating solid growth media, the way of assessing results, and the methods of mycobacteria identification.

Keywords: mycobacteria, culture method, solid growth medium.

The article was prepared under research topic no. 0515-2019-0015: "The development of drug resistance of mycobacteria and somatic cells to TB drugs".

Даже в XXI веке в мировом сообществе не ослабевает повышенное внимание к проблеме туберкулеза (ТБ), поскольку по-прежнему актуальны медико-биологические и социально-экономические проблемы, тесно связанные с этим заболеванием. Ситуацию усугубляет и развитие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ). Вследствие этого раннее выявление случаев заболевания, вызванного микобактериями (МБ), должно быть максимально эффективным, и весь арсенал лабораторных методов должен быть направлен на решение этой задачи [11, 26].

Род *Mycobacterium* объединяет более 140 видов, которые принято разделять на три основные

группы: микобактерии туберкулезного комплекса (МБТК), которые могут вызывать ТБ у человека и животных, *M. leprae*, вызывающие лепру (проказу) и нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), вызывающие микобактериоз. Возбудитель ТБ был описан в 1882 г. германским бактериологом Робертом Кохом, которому удалось выделить чистую культуру возбудителя и вызвать ею ТБ у подопытных животных [15].

Многочисленными исследованиями было показано, что особенности обмена веществ МБ определяют их высокие требования к качеству питательной среды, именно этим обусловлены сложности при культивировании МБ *in vitro*. Для культивирования требуются многокомпо-

нентные питательные среды, содержащие все необходимые вещества для жизнедеятельности МБ. Среда должна быть богата неорганическими веществами с дополнением альбумина для связывания токсичных жирных кислот, каталазой для удаления токсичных пероксидов, глицерина и декстрозы в качестве источников углерода и энергии. Часто в качестве дополнения используют Tween 80, который представляет собой длинноцепочечный полисорбат, этерифицирующийся до олеиновой кислоты, и используется МБ в качестве источника углерода. Существенную роль в питании МБ играет использование куриных яиц, которые применяются как компонент некоторых плотных питательных сред [7, 12, 24].

Метод культивирования *in vitro* позволяет получить чистую культуру МБ путем посева диагностического материала на питательные среды с последующей видовой идентификацией выросших микроорганизмов.

Специфичность и чувствительность культурального метода по сравнению с микроскопией достаточно высока и повышает выявление МБ при наличии в исследуемом материале нескольких десятков жизнеспособных клеток возбудителя [4, 25]. Метод обеспечивает выявление МБТ и/или НТМБ, а комплекс микробиологических и современных молекулярных методов позволяет в короткие сроки (1–2 дня) проводить видовую идентификацию культуры МБ и сразу же дифференцировать МБТ от НТМБ и неспецифической микрофлоры [4, 5].

За прошедшие десятилетия было создано и успешно применяется большое количество разных по составу многокомпонентных плотных питательных сред.

Все известные для культивирования МБ плотные питательные среды можно подразделить на три группы: кровяные, агаровые и яичные.

Первоначально использовали питательные среды, где источником питания бактерий являются компоненты крови, так, например, в состав среды Тарши входят вытяжки говяжьего сердца, мясного пептона и овечьей крови [23].

Плотные питательные среды на агаровой основе, такие как агар Дюбо, агары Миддлбрук 7Н10 и 7Н11, широко применяются в микробиологической практике при диагностике ТБ и позволяют изучать морфологию колоний МБ. Агар Дюбо с добавлением альбумина и олеиновой кислоты используется для первичного выделения *M. tuberculosis*. Среда разработана совместно Dubos R.J. и Middlebrook G. [9, 10, 20]. Данная среда используется также для определения лекарственной чувствительности (ЛЧ).

Среда Миддлбрук 7Н10 достаточно часто используется для выделения и культивирования *M. tuberculosis*. Среда разработана Dubos R.J. и Middlebrook G., которые компоновали различные составы питательных сред, содержащих альбумины, предохраняющие МБ от воздействия токсичных веществ, и олеиновую кислоту, способствующую их росту. Middlebrook G. и Cohen M.L. [9, 10, 21] усовершенствовали среду на основе олеиновой кислоты и альбуминов и добились тем самым более обильного и быстрого роста на среде 7Н10. Kubica G.P. и Dye W.E. [16, 17] выявили, что на агаре 7Н10 наблюдается более низкий уровень контаминации сопутствующей флорой по сравнению со средами, содержащими яичную массу. Эта среда содержит много неорганических солей, которые способствуют росту МБ. Лимонная кислота, получаемая из цитрата натрия, сохраняет уровень неорганических ионов в растворе. Глицерин является источником энергии и углерода. Агар Миддлбрук 7Н11 является модификацией среды 7Н10 [6].

Добавкой к агарам Миддлбрук 7Н10 и 7Н11 служит OADC, в состав которой входит олеиновая кислота, альбумин, хлорид натрия, декстроза и каталаза. Олеиновая кислота и другие высокомолекулярные жирные кислоты метаболизируются МБ, декстроза используется как источник энергии. Каталаза нейтрализует токсическое воздействие перекисей, альбумин, как говорилось выше, предохраняет МБ от влияния других токсичных агентов [6, 8, 25, 27, 29, 30].

Достаточно давно сложилось общее правило, что питательные среды на яичной основе имеют наиболее широкое распространение в культуральной диагностике туберкулеза. Известна, например, среда Петраньяни на основе обезжиренного молока, казеина и картофеля с добавлением яиц и малахитовой зелени [22] или «Кислая» яичная среда, которая помимо картофеля и яиц содержит в своем составе пенициллин. Известна также среда Дорсета, содержащая в своем составе яичную массу. Эта среда в настоящее время чаще используется для транспортировки микроорганизмов. Существуют также среды: Огавы с яичным желтком, среда «Новая» (Г.Г. Мордовского), среда Аникина (среды 6 и 9), среда Попеску и среда Финн-II, которые отличаются только разным соотношением солевой основы и яичной массы [1, 2, 3, 4].

Особое место среди всех яичных сред занимает среда Левенштейна–Йенсена [13, 14, 18, 19, 20], которая рекомендована ВОЗ для выделения МБ.

Каждая из перечисленных плотных питательных сред имеет свои преимущества и недостатки.

Тем не менее при выборе питательной среды необходимо учитывать, что используемая среда должна подавлять рост сопутствующей микрофлоры, обеспечивать хороший рост при засеве небольшого количества МБ и возможность предварительной дифференциации выросших колоний по морфологическим признакам.

Преимущества яичных сред: низкая стоимость и относительная простота приготовления, готовые среды длительно сохраняют свои ростовые свойства, хорошо поддерживают рост большинства штаммов МБТ и НТМБ, позволяют проводить предварительную идентификацию МБ по морфологическим признакам, малахитовый зеленый, входящий в состав сред, подавляет рост быстрорастущей немикобактериальной флоры, уменьшая вероятность контаминации посевов.

Недостатки яичных сред: среды не стандартизованы, поскольку микробиологические лаборатории готовят их самостоятельно, и каждая партия среды, по сути, является уникальной. В большинстве лабораторий используют обычные продуктовые яйца, получаемые в крупных птицеводческих хозяйствах, хотя основными требованиями к выбору хозяйства, поставляющего яйца в лабораторию, является использование экологически чистых кормов без содержания антибиотиков.

Из всего разнообразия сред в Российской Федерации яичные среды Левенштейна–Йенсена и Финна-II получили наибольшее распространение и используются для культуральной диагностики ТБ [1, 2, 3, 4]. Для повышения результативности культурального исследования традиционно рекомендуется применять для посева диагностического материала одновременно две питательные среды разного состава.

Среда Левенштейна–Йенсена

Среда Левенштейна–Йенсена рекомендуется для получения сравнимых результатов во всех микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы в Российской Федерации и для определения ЛЧ *M. tuberculosis*.

Среда Левенштейна–Йенсена – это плотная яичная среда, на которой хороший рост МБ получают приблизительно на 18–25-й день после посева микроскопически положительного материала.

Среда Финна-II

Среда Финна-II рекомендована в РФ как вторая стандартная среда для выделения МБ. Она отличается от среды Левенштейна–Йенсена тем, что вместо L-аспарагина в ней используется

глутаминовокислый натрий (глутамат натрия), и подбор солей рассчитан таким образом, что конечная кислотность среды имеет более низкое значение ($pH = 6,3-6,5$), чем кислотность среды Левенштейна–Йенсена ($pH = 7,2-7,4$) и большую стабильность.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МБ

Требования к помещениям для приготовления питательных сред (которые должны располагаться в чистой зоне лаборатории) регламентируются санитарными правилами.

Все реактивы, используемые для приготовления сред, должны иметь степень очистки не менее категории «химически чистый» (ХЧ). При приготовлении сред необходимо использовать ХЧ лабораторную посуду, а также свежеприготовленную стерильную дистиллированную воду. Приготовление среды должно в точности соответствовать инструкциям.

Важно! Недопустимы отступление от методики приготовления или модификация состава среды!

Для получения качественной среды и во избежание загрязнения ее посторонней микрофлорой рекомендуется следовать основным правилам. Помещение, где готовят среды, содержат в максимальной чистоте (регулярно протирают дезинфектантом оборудование, рабочие поверхности и полы). Перед приготовлением сред необходимо обрабатывать помещение ультрафиолетовым бактерицидным излучением, в процессе приготовления использовать только стерильные материалы, строго соблюдать асептику, использовать точно взвешенные количества реагентов, соблюдать последовательность в процессе приготовления растворов, использовать мерную посуду и доводить объем раствора по нижней границе мениска, не допускать перегрева сред, контролируя температуру в свертывателе, при приготовлении яичной массы тщательно обрабатывать поверхность яиц перед их разбиванием, не экономить при разливе среды по пробиркам, не подвергать приготовленную среду воздействию ультрафиолетовых лучей, хранить готовые среды в темноте при температуре 4 °С, проводить контроль качества каждой партии сред.

Для приготовления плотных яичных питательных сред используют солевую основу, отличающуюся по составу для различных сред, яичную

массу и раствор малахитового зеленого, предотвращающего рост на среде немикобактериальной флоры.

Состав и приготовление среды Левенштейна–Йенсена

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 1) Раствор минеральных солей | 600 мл |
| 2) Раствор малахитового зеленого | 20 мл |
| 3) Гомогенизированная яичная масса | 1000 мл |

1) Раствор минеральных солей:

Реактивы	Кол-во
Калий однозамещенный фосфорнокислый KH_2PO_4	2,4 г
Магний лимоннокислый $\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \times 14\text{H}_2\text{O}$	0,6 г
Магний сернокислый $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,24 г
L-аспарагин $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	3,6 г
Глицерин $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	12,0 мл
Вода дистиллированная	600 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в теплой дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом прогреве (не доводя до кипения) на водяной бане. L-аспарагин рекомендуется растворять отдельно и вносить последним. Затем солевой раствор стерилизуют в автоклаве при 1 атм (121 °С) в течение 30 минут. Срок хранения раствора при комнатной температуре составляет 3–4 недели.

2) Раствор малахитового зеленого:

Реактивы	Кол-во
Малахитовый зеленый $\text{C}_{52}\text{H}_{54}\text{O}_{12}\text{N}_4$	2 г
Стерильная дистиллированная вода	100 мл

Важно! Приготовление раствора требует большой аккуратности в связи с тем, что порошок малахитового зеленого очень летуч!

Взвешенный порошок малахитового зеленого растворить в стерильной теплой дистиллированной воде и поместить раствор в термостат на 1–2–2,5 часа. Для большего растворения рекомендуется частое помешивание, поскольку порошок растворяется очень плохо. Затем профильтровать раствор через бумажный фильтр, разлить по флаконам или небольшим колбам и стерилизовать при 1 атм (121 °С) в течение 30 минут. Приготовленный раствор не подлежит

длительному хранению и при появлении осадка или изменении окраски его следует заменить свежим раствором.

3) Гомогенизированная яичная масса

Свежие диетические куриные яйца без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают с помощью ручных щеток и щелочного мыла. Далее яйца промывают в проточной воде и погружают в 70%-ный этиловый спирт на 30 минут.

Затем в ламинарном боксе с горизонтальным потоком I класса разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20–25 яиц в зависимости от их величины).

Внимание! Необходимое количество яичной массы определяется по объему, а не по количеству яиц!

Яичную массу тщательно гомогенизируют стерильным венчиком или в стерильном миксере при минимальной скорости.

Внимание! Необходимо минимизировать образование пены!

Приготовление среды

В большую емкость, соблюдая правила стерильности, помещают следующие растворы:

- | | |
|---------------------------------|---------|
| Раствор минеральных солей | 600 мл |
| Гомогенизированная яичная масса | 1000 мл |

Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через стерильный марлевый фильтр, имеющий не менее 4 слоев марли. Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не сформировался осадок.

Внимание! Не допускайте попадания пены в пробирки!

Свертывание среды

Для свертывания среды используются специальные аппараты-свертыватели «АСПС». Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования косяка среды

высотой 8–10 см. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 82–83 °С в течение 40 минут.

Внимание! Свертывание является не стерилизующей, а лишь коагулирующей процедурой. Стерильность среды обеспечивается стерильными условиями ее приготовления и разлива!

Так как приготовление и розлив питательной среды проводится в условиях соблюдения стерильности, качество приготовленной яичной среды зависит от соблюдения температурного и временного режимов коагуляции. Обесцвечивание среды, наличие пузырьков или углублений на ее поверхности свидетельствует о нарушении режима свертывания. Повторное свертывание ухудшает качество среды. Среда с нарушенным режимом свертывания подлежат удалению.

Хранение среды

Приготовленная партия среды должна иметь этикетку с датой изготовления и сохраняться в холодильнике при 4 °С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели.

Состав и приготовление среды Финна-II

- 1) Раствор минеральных солей 600 мл
- 2) Раствор малахитового зеленого 20 мл
- 3) Гомогенизированная яичная масса 1000 мл

1) Раствор минеральных солей:

Реактивы	Кол-во
Магний сернокислый $MgSO_4 \times 7H_2O$	0,3 г
Натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_3 \times 5,5H_2O$	0,06 г
Квасцы железоаммонийные $Fe(NH_4) \cdot (SO_4)_2 \times 12H_2O$	0,03 г
Калий однозамещенный фосфорнокислый KH_2PO_4	12 г
Аммоний лимоннокислый однозамещенный $C_8H_{11}O_7N_7$	3 г
Натрий глутаминовокислый однозамещенный $C_5H_8NNaO_4 \times H_2O$	6 г
Глицерин $C_3H_8O_3$	2 мл
Вода дистиллированная	600 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании

(не доводя до кипения) на водяной бане или мешалке с подогревом. Кислотность не корректируют. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм (121 °С) в течение 30 минут. Срок хранения раствора составляет 3–4 недели при комнатной температуре.

Внимание! Приготовление растворов малахитового зеленого, гомогенизированной яичной массы, приготовление, свертывание и хранение среды подробно описаны в аналогичных разделах при описании среды Левенштейна-Йенсена.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ ЯИЧНЫХ СРЕД

Свежеприготовленная яичная среда после ее коагуляции должна быть подвергнута визуальной оценке. Правильно приготовленная среда плотно и прочно прилипает к стенкам пробирки. Содержание конденсата в пробирке со средой не должно превышать 0,2 мл. Обесцвечивание среды или появление на ее поверхности углублений или пузырей внутри среды и на ее поверхности могут свидетельствовать об избыточной температуре коагуляции. Партия среды с выявленными недостатками не может использоваться для посева и должна быть уничтожена.

Одной из обязательных процедур внутрилабораторного контроля качества является проверка приготовленной среды на стерильность и на ростовые свойства.

Тест на стерильность: 6 пробирок из свежеприготовленной партии среды помещают в термостат при 37 °С и выдерживают в течение 3 суток, что достаточно для роста загрязняющих микроорганизмов.

Если рост выявлен, по крайней мере, в 1 пробирке, то аналогичным образом должны быть проверены 10 дополнительных пробирок. Если хотя бы в одной из этих 10 пробирок появляется рост, аналогичным образом должны быть проверены все пробирки данной партии. Все пробирки с ростом загрязняющей микрофлоры следует удалить. Остальные неконтаминированные пробирки могут быть использованы.

Тест на проверку ростовых качеств среды: проводится с помощью лабораторного тест-штамма *M. tuberculosis* H37Ra или H37Rv. Для

приготовления суспензии этой культуры делают смыв с 4-недельного косяка плотной среды с обильным/сплошным ростом, гомогенизируют суспензию со стеклянными бусами на встряхивателе в течение 1 минуты и готовят серийные разведения культуры:

Разведите бактериальную суспензию по стандарту мутности № 5 (5×10^8 КОЕ/мл) – суспензия № 1.

Приготовьте 5 серийных 10-кратных разведений каждой культуры из суспензии № 1, чтобы получить 5×10^3 и 5×10^4 бактерий в 1 мл.

Далее на две пробирки засевают по 0,2 мл каждой из суспензий (5×10^3 и 5×10^4) из приготовленной партии среды, распределяя инокулят по поверхности среды. Инкубацию производят в обычном режиме. Рост регистрируют еженедельно, оценивают срок появления роста, относительный размер колоний и сравнивают рост из новой партии среды с результатами роста, полученными на предшествующей партии среды и зафиксированными в журнале приготовления сред.

Засев разведений 5×10^3 и 5×10^4 должен дать рост 1–10 и 10–100 колоний соответственно. При таком росте на контролируемых средах они считаются удовлетворительными.

Новая среда пригодна к употреблению, если рост на ней эквивалентен или лучше, чем на предыдущей среде. Не используйте партию среды, если рост на ней хуже, чем на предыдущей партии.

В случае неудовлетворительного качества среды отрицательные результаты посева, полученные на ней, считаются недостоверными. Остатки незасеянной среды должны быть уничтожены.

Регистрация результатов контроля качества среды

Результаты контроля качества сред фиксируются в журнале приготовления сред, в котором указаны: дата приготовления, количество пробирок, результаты теста на стерильность и на ростовые качества, Ф.И.О. сотрудника, выполняющего данный раздел работы.

ТЕХНИКА ПОСЕВА И ИНКУБАЦИИ

Важно! Микроскопическое и культуральное исследования должны производиться параллельно только из одной и той же пробы диагностического материала.

Процедура посева

Рабочее место микробиолога организуется с учетом удобства работы и максимального исключения операторских ошибок (рис. 1).



Рисунок 1. Рабочее место для проведения процедуры посева.

Figure 1. Workplace for culture inoculation.

Перед процедурой посева необходимо подготовить пробирки с питательными средами, пронумеровать их согласно регистрационным номерам анализов и последовательно расположить в вертикальном штативе. Аналогичным образом подготовить и пронумеровать предметные стекла.

Осадок, полученный после предварительной обработки диагностического материала, следует подвергнуть параллельно культуральному и микроскопическому исследованиям в следующем порядке:

Перед началом забора посевного материала в пипетку следует убедиться в том, что номер пробирки с посевным материалом соответствует номерам пробирок с питательной средой и номеру предметного стекла для приготовления мазка.

- набрать 1,0–1,2 мл подготовленного осадка одноразовой пластиковой пастеровской пипеткой, оставив приблизительно 0,1–0,2 мл для последующего приготовления мазка для микроскопии;

- соблюдая условия стерильности, внести равные объемы осадка материала (примерно по 0,5–0,6 мл) в 2 пробирки с разными плотными питательными средами на верхнюю треть косяка;

- остаток набранного материала (2–3 капли осадка) нанести на заранее подготовленное и пронумерованное предметное стекло для получения мазка для микроскопического исследования, распределив материал равномерным слоем в центре стекла на площади примерно 1×2 см;

- использованную для посева и приготовления мазка пипетку опустить в емкость с дезинфицирующим раствором;
- по завершении посева всех проб засеянные пробирки поместить в термостат при температуре 37 °С. При этом поверхность косяка питательной среды должна находиться в горизонтальной плоскости, а наклон штатива должен исключить смачивание пробки материалом засева.

Инкубация

Инкубация МБ требует длительного срока для получения видимого роста колоний. Температура инкубации – 37 °С.

При первичном посеве микроскопически отрицательного материала средняя продолжительность роста МБ на плотных питательных средах может составить 20–46 дней. Рост отдельных штаммов появляется в сроки до 84 дней. Это обуславливает необходимость для выдачи отрицательного результата выдерживать посева в термостате 12 недель.

В процессе инкубации посевов необходимо соблюдать следующие правила: пробирки переводят в вертикальное положение, инкубацию проводят в течение 12 недель при обязательном еженедельном просмотре засеянных пробирок, для облегчения процедуры еженедельного просмотра и учета посева, выполненные в течение одного дня, желателно размещать в отдельных штативах в порядке номеров регистрации; каждый штатив дол-

жен иметь этикетку, на которой указана дата посева, первый и последний регистрационный номер партии.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЕВА

При оценке результатов культурального исследования диагностического материала необходимо соблюдать следующие правила.

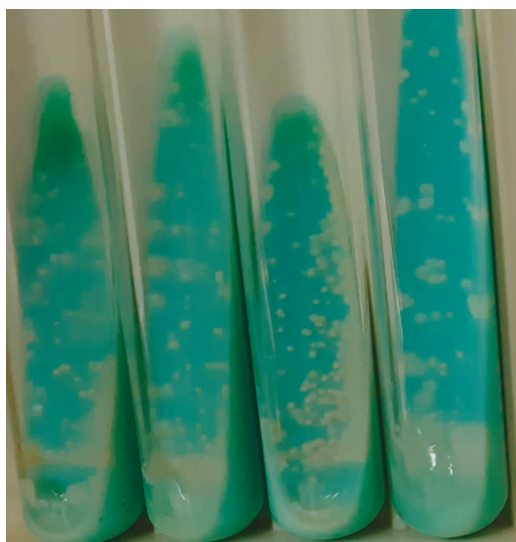
1. Наблюдение за посевами и просмотр засеянных пробирок следует проводить еженедельно.

2. При отсутствии роста посева должны выдерживаться в термостате в течение 12 недель. Отрицательный результат культурального исследования может быть выдан только по истечении этого срока инкубации.

3. Во время очередного просмотра следует отбирать все пробирки, в которых имеется рост колоний, расставляя их по порядку номеров регистрации материала.

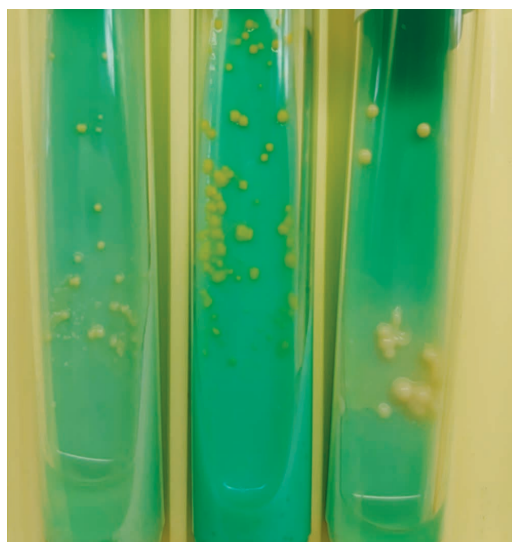
При культивировании разные виды МБ могут проявлять разные фенотипические признаки в виде влажных или зернистых, грубых, сухих колоний, колонии некоторых микобактерий могут быть пигментированы. *M. kansasii* появляется в виде гладких или шероховатых, иногда фотохромогенных колоний, *M. gordonae* – в виде гладких желто-оранжевых колоний, *M. avium* – в виде гладких, бесцветных колоний, *M. smegmatis* – в виде морщинистых, кремово-белых колоний (рис. 2).

(а)



а) Рост МБТ
а) Growth of *M. tuberculosis*

(б)



б) Рост НТМБ *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. avium*
б) Growth of NTM *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. avium*

Рисунок 2. Рост МБ на плотной питательной среде.

Figure 2. Mycobacteria growth on solid medium.

При оценке результатов регистрируют следующие параметры:

- «появление роста» – дату появления роста в пробирках;
- «интенсивность роста» – число колоний, выросших в каждой из пробирок;
- «загрязнение посева» посторонней микрофлорой или грибами («пророст»), при наличии такового;
- «отсутствие роста» (указанный параметр регистрируется через 12 недель культивирования).

Соблюдение указанных правил позволяет своевременно выявлять макроскопически видимый рост МБ или загрязняющей микрофлоры.

При этом необходимо иметь в виду следующие показатели:

- появление роста МБ в течение 7–10 дней культивирования на плотных питательных средах может свидетельствовать о выделении *быстрорастущих* НТМБ, которые не относятся к комплексу *M. tuberculosis*.

- появление роста МБ после 3–4 недель культивирования свидетельствует о выделении *M. tuberculosis*, а также других *медленнорастущих* МБ, которые могут относиться к потенциально патогенным НТМБ.

При оценке результатов необходимо помнить, что используемые для посева питательные среды представляют собой обогащенный субстрат, который легко утилизируется другими микроорганизмами.

В ряде случаев некоторые микроорганизмы, загрязняющие посевы, обладают способностью разлагать составные ингредиенты среды с образованием кислоты; это приводит к снижению pH среды. **На такой среде МБ не растут**, и такие пробирки исключают из анализа, в клинику выдается ответ о росте неспецифической микрофлоры. При получении подобного результата врач должен назначить повторное исследование материала.

Посевы с частичным загрязнением желательны выдержать до окончания срока инкубации или до развития хотя бы нескольких колоний МБ, так как позднее появление загрязнения не исключает роста микобактерий.

Во всех случаях получения роста, во избежание неверного результата, ответ о выделении МБ дается только после дифференциации МБТ от НТМБ или от неспецифических микроорганизмов.

Характеристика колоний *M. tuberculosis*

Культуры МБТ обычно растут на плотных питательных средах в виде шероховатых колоний различной величины и вида, имеют желтоватый

или слегка кремовый оттенок (цвет слоновой кости). Колонии, как правило, сухие, но могут встречаться и влажные, слегка пигментированные колонии, розовато-желтый пигмент которых незначительно отличается от оранжевого или желтого пигмента некоторых НТМБ.

Окончательное заключение о принадлежности выделенной культуры к *M. tuberculosis complex* можно сделать только после проведения обязательной идентификации культуры на принадлежность к МБТ или НТМБ.

Только после первичной идентификации лаборатория выдает в клинику ответ о выявлении роста МБТ.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

Для практической лаборатории можно рекомендовать следующие методы идентификации МБ.

Биохимические методы. В случае недоступности современных методов дифференцировки МБТ от НТМБ возможно производить посев на плотные яичные среды, содержащие селективные препараты (гидразид тиофен-2 карбоксилловая кислота, салицилат натрия, 5% NaCl, паранитробензойная кислота и т.д.). Помочь в идентификации могут тесты на биохимические реакции: ниациновый тест, нитратредуктазный тест, тест на наличие термостабильной каталазы и т.д. В определителе бактерий Берджи для идентификации НТМБ описано множество тестов, сложность состоит в том, что штаммы, относящиеся к одному и тому же виду НТМБ, могут давать разную реакцию на биохимические тесты (+/-). В связи с этим подобные виды тестов являются наименее предпочтительным.

Традиционные бактериологические методы идентификации МБ. Методы основываются на морфологии и функциональных особенностях клеток МБ.

При окраске микроскопических препаратов культур по Цилю–Нильсену устанавливают кислотоустойчивость и наличие/отсутствие корд-фактора (скопление или переплетение МБТ в виде «войлока» или «кос»).

При приготовлении мазков для микроскопического исследования колонии МБТ проявляют свои физико-химические особенности: они не эмульгируются в изотоническом растворе, а образуют зернистую крошковидную суспензию.

НТМБ и посторонней флорой. Положительный тест говорит о присутствии МБ туберкулезного комплекса в пробирке. Отрицательный тест позволяет предположить наличие НТМБ или неспецифической микрофлоры.

Молекулярно-генетические методы дифференцировки МБТ от НТМБ и неспецифической микрофлоры. Методы основаны на **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** в различных вариантах:

– ПЦР в режиме реального времени с праймерами, комплементарными специфическим для МБТ участкам генома МБ;

– ПЦР с различными видами визуализации результатов для выявления и видовой идентификации НТМБ.

Алгоритм дифференцировки может быть представлен схемой на рис. 4.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЕВА

При выделении культуры МБ, отвечающей определенным характеристикам, а именно: появление роста колоний на плотных питательных средах не ранее, чем через 2–4 недели инкубации, наличие колоний характерной морфологии и окраски, дифференциация МБТ от НТМБ, следует произвести количественную оценку интенсивности роста.

Интенсивность роста обозначают по 3-балльной системе.

- (1+) – 1–20 КОЕ – «скудное» бактериовыделение;
 (2+) – 21–100 КОЕ – «умеренное» бактериовыделение;
 (3+) – > 100 КОЕ – «обильное» бактериовыделение.

Окончательная величина КОЕ (число колониеобразующих единиц), регистрируемая как итоговый показатель интенсивности роста, высчитывается как суммарное по результатам подсчета числа колоний, выросших во всех пробирках. Одновременно рекомендуется зарегистрировать число КОЕ, выросших в каждой из пробирок с разными питательными средами.

Все характеристики выросших на плотных питательных средах МБ вносят в лабораторный журнал учета результатов культуральных исследований и в бланки ответов. При наличии компьютерной базы данных полицевого учета результаты исследования хранятся и в электронном формате с условием обязательного резервного копирования.

В заключение следует отметить, что, несмотря на кажущуюся простоту культурального исследования, необходимо учитывать значительное число особенностей: параметры выбора

среды, неукоснительное соблюдение методики приготовления и контроля качества сред, соблюдение технологии посева и инкубации, контроль роста, идентификации микроорганизмов и ведения отчетной документации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Кн. II / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой, М.: Бином, 2010. – 1151 с.
2. Финн Э.Р. Культивация *Mycobacterium tuberculosis* в различных средах и комбинациях сред // *Лечебное дело*. 1970. – № 10. – С. 20.
3. Финн Э.Р. Способы увеличения высеваемости и ускорения роста *Mycobacterium tuberculosis* // *Проблемы туберкулеза*. 1974. – № 12. – С. 72.
4. Черноусова Л.Н., Пузанов В.А., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Попов С.А. Лабораторная диагностика туберкулеза. Методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования / под ред. проф. В.В. Ерохина. М., 2012. – 707 с.
5. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Попов С.А., Журавлев В.Ю., Пузанов В.А., Марьяндышев А.О., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Сафонова С.Г., Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. РОФ. – М., 2015. – 35 с.
6. Cohn M.L., Waggoner R.F., McClatchy J.K. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1968, vol. 98, no. 2, pp. 295–296.
7. Cook G.M., Berney M., Gebhard S., Heinemann M., Cox R.A., Danilchanka O., Niederweis M. Physiology of mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 2009, vol. 55, pp. 318–319.
8. Cummings M.M. Diagnostic methods in tuberculosis. II. Demonstration of *Mycobacterium tuberculosis* by culture. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1951, vol. 21, pp. 684–698.
9. Dubos R.J., Fenner F., Pierce C.H. Properties of a culture of BCG grown in liquid media containing Tween 80 and filtrate of heated serum. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 1950, vol. 61, no. 1, pp. 66–76.
10. Dubos R.J., Middlebrook G. Media for Tubercle Bacilli, *Am. Rev. Tuberculosis*, 1947, vol. 56, no. 4, pp. 334–345.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. Stockholm, ECDC, 2016, 111 p.
12. Gruft H. Isolation of Acid-fast bacilli from contaminated specimens. *Health Lab. Sci.*, 1971, vol. 8, no. 2, pp. 79–82.
13. Jensen K.A. Human and bovine forms of tubercle bacilli. *Schweiz Z. Pathol. Bakteriolog.* 1949, vol. 12, no. 5, pp. 435–450.
14. Jensen K.A. Pure breeding and type determination of tubercle bacilli strains. A simplification of the methods

- for practice. *Parasitenkd. Infektionskr.*, 1932, vol. I, pp. 125–222.
15. Koch R. On the etiology of tuberculosis. From negotiations of the Congress of Internal Medicine. I. Congresses Wiesbaden 1882. Publisher F. Bergmann. Quoted from Collected Works by R. Koch, Leipzig, 1912, vol. 1, p. 446.
 16. Kubica G.P., Dye W.E., Cohn M.L., Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1963, vol. 87, p. 775.
 17. Kubica G.P., Kaufmann A.J., Dye W.E. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1964, vol. 89, p. 284.
 18. Liu P.I., McGregor D.H., Faucher I., Jinks W.L., Miller L.A., Green L., Liu J.G. Comparison of three culture media for isolation of Mycobacterium tuberculosis: a 6-year study. *Appl. Microbiol.*, 1973, vol. 26, p. 880–883.
 19. Lowenstein E. The cultivation of the tubercle bacilli from the flowing blood. *Zentralb. Bacteriol., Parasitenkd. Infektionskr.*, 1931, vol. I, pp. 120–127.
 20. MacFaddin J.F. Media for isolation – cultivation – identification – maintenance of medical bacteria. 1985, Baltimore, London, 929 p.
 21. Middlebrook G., Cohn M.L. Bacteriology of tuberculosis laboratory methods. *Am. J. Public Health Nations Health*, 1958, 48, no. 7, pp. 844–853.
 22. Petraghani G. Modifications in technique of isolating Koch's bacillus. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 1926, vol. 5, no. 3, pp. 173–182.
 23. Atlas R.M., Snyder J.W. Handbook of media for clinical and public health microbiology. 2014, 561 p.
 24. Schaefer W.B., Cohn M.L., Middlebrook G. The roles of biotin and carbon dioxide in the cultivation of Mycobacterium tuberculosis. *J. Bacteriol.*, 1955, vol. 69, no. 6, pp. 706–712.
 25. Somlo A.M., Black T.C., Somlo L.I. The value of fluorescent microscopy in the detection of acid-port bacilli. *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.*, 1969, vol. 39, no. 3, pp. 51–54.
 26. Global tuberculosis report. Geneva, WHO, 2019, 297 p.
 5. Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popov S.A., Zhuravlev V.Yu., Puzanov V.A., Maryandyshev A.O., Vakhrusheva D.V., Kravchenko M.A., Safonova S.G., Vasilyeva I.A., Ergeshov A.E. Federal clinical recommendations in organization and implementation of microbiological and molecular-genetic diagnostics of tuberculosis. ROF, Moscow, 2015, 35 p. (In Russ.)
 6. Cohn M.L., Waggoner R.F., McClatchy J.K. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1968, vol. 98, no. 2, pp. 295–296.
 7. Cook G.M., Berney M., Gebhard S., Heinemann M., Cox R.A., Danilchanka O., Niederweis M. Physiology of mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 2009, vol. 55, pp. 318–319.
 8. Cummings M.M. Diagnostic methods in tuberculosis. II. Demonstration of Mycobacterium tuberculosis by culture. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1951, vol. 21, pp. 684–698.
 9. Dubos R.J., Fenner F., Pierce C.H. Properties of a culture of BCG grown in liquid media containing Tween 80 and filtrate of heated serum. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 1950, vol. 61, no. 1, pp. 66–76.
 10. Dubos R.J., Middlebrook G. Media for Tubercle Bacilli, *Am. Rev. Tuberculosis*, 1947, vol. 56, no. 4, pp. 334–345.
 11. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. Stockholm, ECDC, 2016, 111 p.
 12. Gruft H. Isolation of Acid-fast bacilli from contaminated specimens. *Health Lab. Sci.*, 1971, vol. 8, no. 2, pp. 79–82.
 13. Jensen K.A. Human and bovine forms of tubercle bacilli. *Schweiz Z. Pathol. Bakteriolog.* 1949, vol. 12, no. 5, pp. 435–450.
 14. Jensen K.A. Pure breeding and type determination of tubercle bacilli strains. A simplification of the methods for practice. *Parasitenkd. Infektionskr.*, 1932, vol. I, pp. 125–222.
 15. Koch R. On the etiology of tuberculosis. From negotiations of the Congress of Internal Medicine. I. Congresses Wiesbaden 1882. Publisher F. Bergmann. Quoted from Collected Works by R. Koch, Leipzig, 1912, vol. 1, p. 446.
 16. Kubica G.P., Dye W.E., Cohn M.L., Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1963, vol. 87, p. 775.
 17. Kubica G.P., Kaufmann A.J., Dye W.E. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1964, vol. 89, p. 284.
 18. Liu P.I., McGregor D.H., Faucher I., Jinks W.L., Miller L.A., Green L., Liu J.G. Comparison of three culture media for isolation of Mycobacterium tuberculosis: a 6-year study. *Appl. Microbiol.*, 1973, vol. 26, p. 880–883.
 19. Lowenstein E. The cultivation of the tubercle bacilli from the flowing blood. *Zentralb. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr.*, 1931, vol. I, pp. 120–127.
 20. MacFaddin J.F. Media for isolation – cultivation – identification – maintenance of medical bacteria. 1985, Baltimore, London, 929 p.

REFERENCES

1. Guide to medical microbiology. Private medical microbiology and etiological diagnostics of infections. Book II. Ed. by A.S. Labinskaya, N.N. Kostukova, S.M. Ivanova. Moscow, Binom, 2010, 1151 p. (In Russ.)
2. Finn E.R. Cultivation of Mycobacterium tuberculosis on different media and combinations of media. *Lechebnoye delo*, 1970, no. 10, p. 20. (In Russ.)
3. Finn E.R. Ways of increasing inoculation and growth acceleration of Mycobacterium tuberculosis. *Problems of Tuberculosis*, 1974, no. 12, p. 72. (In Russ.)
4. Chernousova L.N., Puzanov V.A., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Popov S.A. Laboratory diagnosis of TB. Educational materials for the thematic refreshment cycle. Ed. by V.V. Erokhin. Moscow, 2012, 707 p. (In Russ.)

21. *Middlebrook G., Cohn M.L.* Bacteriology of tuberculosis laboratory methods. *Am. J. Public Health Nations Health*, 1958, 48, no. 7, pp. 844–853.
22. *Petragnani G.* Modifications in technique of isolating Koch's bacillus. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, 1926, vol. 5, no. 3, pp. 173–182.
23. *Atlas R.M., Snyder J.W.* Handbook of media for clinical and public health microbiology. 2014, 561 p.
24. *Schaefer W.B., Cohn M.L., Middlebrook G.* The roles of biotin and carbon dioxide in the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 1955, vol. 69, no. 6, pp. 706–712.
25. *Somlo A.M., Black T.C., Somlo L.I.* The value of fluorescent microscopy in the detection of acid-port bacilli. *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.*, 1969, vol. 39, no. 3, pp. 51–54.
26. Global tuberculosis report. Geneva, WHO, 2019, 297 p.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Ларионова Елена Евгеньевна – к.б.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_lena@mail.ru

Андриевская Ирина Юрьевна – научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Андреевская Софья Николаевна – к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru

Севастьянова Элина Викторовна – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Central TB Research Institute
2, Yauzskaya alley, 107564, Moscow, Russia

Elena E. Larionova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_lena@mail.ru

Irina Yu. Andrievskaya, Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Sofia N. Andreevskaya, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andsofia@mail.ru

Tatiana G. Smirnova, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru

Elina V. Sevastyanova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru