

## Методики лабораторных исследований

# КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ. ЖИДКИЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ

© 2020 г. Севастьянова Э.В., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н.

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

Поступила 08.09.2020

Проведен краткий обзор методов культивирования микобактерий (МБ) в жидких питательных средах. Изложена методика культивирования МБ с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960.

*Ключевые слова:* микобактерии, жидкие питательные среды, культивирование в системе BACTEC MGIT 960.

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

DOI: 10.7868/S258766782004010X

## Laboratory Techniques

# DETECTION OF MYCOBACTERIA BY CULTURE INOCULATION. LIQUID MEDIA AND AUTOMATED SYSTEMS

Sevastyanova E.V., Smirnova T.G., Larionova E.E., Chernousova L.N.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 08.09.2020

This article provides a brief review of methods of mycobacteria inoculation onto liquid nutrient media. A method of growing mycobacteria in the BACTEC MGIT 960 automated system is described.

*Keywords:* mycobacteria, liquid nutrient media, growth in the BACTEC MGIT 960 automated system.

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

**В**ыделение культур микобактерий имеет большое клинико-эпидемиологическое значение. По приказу МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109, бактериологическим лабораториям рекомендовано проводить исследования по крайней мере на двух различных по составу средах. Методика культивирования на плотной среде была описана в журнале «Вестник ЦНИИТ» 2020 г. № 3. Основным недостатком классического метода выделения МБ на плотных питательных средах является его продолжительность. Сокращение сроков культивирования МБ с сохранением или увеличением чувствительности и специфичности метода является основным направлением развития культуральной диагностики туберкулеза [1, 5].

Известно, что жидкие среды или бульоны обеспечивают более быстрое получение ре-

зультата по сравнению с плотными питательными средами. Фаза логарифмического роста популяции МБ достигается уже к 5–10-му дню после инокуляции в бульон материала от больного туберкулезом. В то же время применение жидких сред осложняется трудоемким процессом собственно детекции размножения МБ, а также возможной контаминацией другими микроорганизмами.

Эволюция методов культивирования МБ в жидких средах происходила в направлении разработки относительно дешевого и технически доступного метода быстрой детекции, осуществимого с наибольшей степенью биозащиты персонала.

В 1977 г. G. Middlebrook описал способ радиометрической детекции роста МБ в селектив-

ной жидкой среде, что положило начало созданию наиболее распространенных и коммерчески доступных систем бульонного культивирования: BACTEC 460, Becton Dickinson (BD), BBL Septi-Chek AFB (BD), BBL MGIT (BD), BACTEC MGIT 960 (BD), MB/VacT (Organon Teknika) и VacT/Alert 3D (BioMerieux), VersaTREK® Mycobacteria Detection (Thermo Fisher Scientific) [1].

В полуавтоматической системе BACTEC 460 для выращивания и идентификации МБ используют жидкую среду Middlebrook 7H12. Рост МБ в ней определяется путем регистрации уровня меченого  $\text{CO}_2$ , который образуется в процессе микробной утилизации субстрата с пальмитиновой кислотой, содержащей радиоактивный  $^{14}\text{C}$ . Внедрение BACTEC 460 позволило сократить сроки выявления возбудителя туберкулеза до 14 дней, а также проводить быструю идентификацию комплекса *M. tuberculosis* и определять лекарственную чувствительность МБ.

В индустриально развитых странах система BACTEC 460 получила широкое распространение и стала своеобразным референс-методом для вновь создаваемых систем бульонного культивирования. Золотым диагностическим стандартом для практических лабораторий являлось сочетание подобной системы с плотными средами, что позволяет добиться лучших результатов как по срокам, так и по эффективности культурального выявления МБ.

Отражением этого принципа явилась разработанная в дальнейшем оригинальная и достаточно простая мануальная двухфазная система BBL Septi-Chek AFB, объединяющая в единое целое флакон с жидкой средой и косяки плотных сред.

Помимо жидкой фазы бульона Middlebrook 7H9 в системе BBL Septi-Chek AFB присутствуют три плотных среды: неселективный агар Middlebrook 7H11, яичная среда Левенштейна-Йенсена и шоколадный агар, которые формируют плотную фазу в атмосфере, обогащенной  $\text{CO}_2$ . Посевной материал инокулируют в бульон, заполняющий флакон в нижней части системы. Ежедневно вручную флакон переворачивают, чтобы бульон омывал косяки. Помимо МБ на средах данной системы могут расти и другие микроорганизмы. Скорость роста микобактерий туберкулеза (МБТ) на Septi-Chek AFB выше, чем на изолированной плотной среде, но несколько ниже, чем на системе BACTEC 460.

При очевидных достоинствах радиометрическая система BACTEC 460 имеет ряд недостатков, таких как полуавтоматический мониторинг роста культуры, значительная трудоемкость операций, работа с радиоизотопами и необходимость утилизации радиоактивных отходов. Для их преодоления была предложена более совершенная

технология флуоресцентной регистрации роста микроорганизмов, которая легла в основу разработки мануальной (неавтоматизированной) системы BBL MGIT (BD), появившейся в лабораториях с 1994 г.

Пробирка MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube), кроме 4 мл модифицированной среды Middlebrook 7H9, содержит в придонной части под силиконом флуоресцентный индикатор – Трис 4,7-дифенил-1,10-фенантролин рутениум хлорид пентагидрат, погашенный высокими концентрациями кислорода. В процессе потребления растущими клетками растворенного в среде  $\text{O}_2$  индикатор начинает светиться в лучах источника ультрафиолетового облучения. Увеличение микробной популяции сопровождается усилением свечения, интенсивность которого можно оценить при помощи транслюминатора или портативного светоизмерительного прибора Micromgit.

Относительно недорогая и компактная система BBL MGIT предназначена для быстрой культуральной диагностики туберкулеза и определения чувствительности МБ к лекарственным препаратам, в качестве экспресс-метода при полевых испытаниях в условиях ограниченных ресурсов. В дальнейшем описанный принцип флуоресцентной детекции роста был использован при разработке полностью автоматизированной системы бульонного культивирования BACTEC MGIT 960 (BD), которая, являясь наиболее совершенной среди существующих аналогичных систем, широко распространена в лабораториях всего мира, включая Россию.

Одна из коммерчески доступных автоматизированных систем MB/VacT была запатентована голландской фирмой Organon Teknika в 1995 г. на базе VacT/ALERT – системы для автоматического тестирования био- и гемокультур.

Для определения роста МБ в системе MB/VacT используется технология колориметрического  $\text{CO}_2$ -детектирования. Уникальные MB/VacT флаконы со штрихкодом содержат придонный сенсор, изменение цвета которого наблюдается при закислении среды вследствие микробного метаболизма, что регистрируется компьютером, который анализирует и интерпретирует данные.

Система MB/VacT состоит из нескольких инкубаторно-детекторных модулей (до 9), управляемых одним компьютером. Вместимость одного MB/VacT модуля составляет 240 или 120 пробирок. Культуральный флакон MB/VacT, так же как пробирка MGIT, содержит бульон Middlebrook 7H9, который перед посевом диагностического материала обогащают питательными веществами, антиоксидантами и альбумином, связываю-

щим токсины, которые образуются в процессе роста микроорганизмов. Для подавления контаминирующей микрофлоры аналогично системам MGIT, использующим смесь бактериостатических препаратов PANTA, в бульон добавляют раствор, содержащий полимиксин, амфотерицин, налидиксовую кислоту, триметоприм, азлоциллин. Особенностью MB/VacT флакона является закрепленная резиновая пробка, через которую иглой со шприцем инокулируют посевной материал, что, по-видимому, также позволяет предохранять жидкую среду от контаминации. После внесения исследуемого образца флаконы помещают в инкубаторно-детекторные блоки. Когда в 1 мл среды количество колониеобразующих единиц начинает превышать  $10^6$ , звуковой сигнал, сопровождающийся появлением информации на дисплее, указывает на завершение исследования.

В подавляющем большинстве случаев положительный результат, свидетельствующий о росте МБТ, регистрируется системой в течение 2–3 недель. При отрицательном результате удаление флаконов из инкубатора производят через 42 дня.

Другим более совершенным представителем вышеописанного семейства является система нового поколения VacT/ALERT 3D, которую представляет компания BioMerieux. Помимо выявления роста МБ система предназначена также для определения бактерий и грибов в гемокультурах.

Прибор состоит из контрольного модуля, под управлением которого могут находиться до 6 инкубационных модулей, рассчитанных на 60, 120 или 240 ячеек для процессорных флаконов. Инкубационный модуль состоит из выдвижных секций, имеющих по три блока на 20 ячеек каждый. При включении шейкера для стимуляции роста модуль работает в режиме получения гемокультуры. При отключении шейкера и использовании специальных программных алгоритмов для медленно растущих микроорганизмов модуль работает в режиме культивирования МБ. В системе VacT/ALERT 3D для получения бульонной культуры микобактерий применяют процессорные флаконы со средой Middlebrook 7H9 такие же, как в системе MB/VacT.

Значительным шагом в развитии ускоренных методов культурального выявления МБ стала инновационная система BACTEC MGIT 960 (BD), появившаяся в лабораториях в середине 90-х годов прошлого столетия [8]. Она представляет собой полностью автоматизированный комплекс для одновременной инкубации и мониторинга 960 пробирок. Прибор BACTEC 960 предназначен для исследования в течение года примерно 8000 образцов диагностического материала. Культивирование МБ осуществляется в индикаторной пробирке MGIT, содержащей 7 мл моди-

фицированной среды Middlebrook 7H9. Данная система позволяет выявлять в клинических образцах большинство штаммов МБТ в течение 10–20 дней и определять лекарственную чувствительность культуры возбудителя в период, не превышающий двух недель.

Следует подчеркнуть, что BACTEC MGIT 960 является единственной полностью автоматизированной системой для определения лекарственной чувствительности МБ, которая обеспечивает ускоренное тестирование культуры ко всем препаратам первого ряда, в том числе и к пипразинамиду.

Как показали многочисленные испытания, внедрение диагностической цепочки, включающей, помимо традиционных плотных сред, систему BACTEC MGIT 960, вдвое сокращает время получения культуры и определения лекарственной чувствительности МБ, увеличивает частоту обнаружения возбудителя в олигобактериальном материале от больных туберкулезом, а также повышает точность и воспроизводимость результатов микробиологического исследования [9].

В настоящее время в РФ, согласно отечественным нормативным документам [3, 6], а также Глобальной лабораторной инициативе (GLI) [7], культуральный метод с использованием жидкой питательной среды является обязательным исследованием при постановке диагноза туберкулеза, в медицинских организациях, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю «фтизиатрия». Подавляющее большинство микобактериологических лабораторий России оснащены автоматизированной системой BACTEC MGIT 960.

## ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МБ НА ЖИДКИХ СРЕДАХ

**Материалом** исследования могут служить репираторные образцы, в первую очередь мокрота, любые биологические жидкости, кроме крови, а также отделяемое ран, промывные воды желудка и ткани организма, полученные при хирургических вмешательствах. Условия сбора диагностического материала и его качество должны соответствовать существующим требованиям, поскольку преаналитический этап оказывает значительное влияние на результаты исследования. Наиболее удобной емкостью для сбора клинических образцов следует считать стерильную градуированную пробирку на 50 мл с завинчивающейся крышкой, препятствующей разбрызгиванию материала при открывании. Оптимальное количество жидкого диагностического материала должно составлять примерно 5 мл.

Успех культурального исследования с помощью анализаторов в значительной степени зависит от качества пробоподготовки диагностического образца. Перед инокуляцией в жидкие среды **разжижение и деконтаминацию материала рекомендуется проводить с использованием NALC-NAOH [2]** с последующим получением осадка в результате центрифугирования при 3000 g в течение 15 минут. Этот метод позволяет преобразовать образец в сконцентрированную гомогенную взвесь, в которой практически уничтожена любая микрофлора, кроме МБ, сохранивших жизнеспособность. При такой обработке одним из факторов увеличения эффективности культурального (как и микроскопического) исследования является сохранение реакции среды, близкой к нейтральной (рН = 6,8–7,4).

Выявление МБ с использованием автоматизированной системы бульонного культивирования обязательно предполагает параллельный посев образца на другую культуральную среду [2, 3]. **Инокуляцию диагностического материала в жидкую среду проводят одновременно с посевом на плотную яичную среду**, что необходимо для возможно более полного удовлетворения питательных потребностей МБ, которые могут дать рост только на одной из сред. Этот принцип позволяет также избежать некоторых ошибок, связанных с техническими погрешностями, неверной интерпретацией роста в позитивной пробирке и т.д.

С целью подтверждения принадлежности культуры, выросшей на жидкой среде любого анализатора, к комплексу МБТ **необходимо проводить идентификацию выросшей культуры**. Использование современных методов идентификации (ПЦР в режиме реального времени и иммунохроматографического теста) позволяет быстро и точно дифференцировать МБТ от нетуберкулезных микобактерий и неспецифической флоры, а также существенно сократить время культуральной диагностики туберкулеза [3].

## МЕТОДИКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ BACTEC MGIT 960

### *Материально-техническое обеспечение метода*

Прибор BACTEC MGIT 960 работает на принципах технологии MGIT: индикаторные пробирки после внесения в них диагностического

материала инкубируются в приборе, подвергаясь периодическому УФ-тестированию.

Прибор весит 351 кг, его размеры невелики (92 × 135 × 85 см), специальных условий для его размещения в лаборатории не требуется. Он состоит из трех секций, вмещающих по 320 пробирок каждая, таким образом, максимальная одновременная загрузка прибора – 960 пробирок. Поскольку скорость роста МБ на этой системе достаточно высока, указанная емкость позволяет исследовать в течение года примерно 8000 образцов диагностического материала. Контроль за внесенным в индикаторную пробирку материалом осуществляет встроенный в прибор компьютер. Жидкокристаллический дисплей и специальные индикаторы на каждой секции дают информацию о наличии положительных и отрицательных посевов. Также для лабораторий с небольшим потоком анализов выпускается более дешевый прибор BACTEC MGIT 320, имеющий только одну секцию на 320 пробирок.

Важным компонентом системы BACTEC MGIT 960 является пробирка MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) с флуоресцентным индикатором, свечение которого погашено кислородом. Размножающаяся микробная популяция активно поглощает кислород, высвобождая флуоресцентный компонент, который начинает светиться в луче ультрафиолетового света.

Ускоренный рост МБ и снижение контаминации обеспечивается дополнением бульона 7H9 жидкой питательной добавкой OADC и пятью лиофилизированными антибиотиками PANTA, которые вносят в индикаторную пробирку перед посевом. OADC содержит четыре питательных компонента: олеиновую кислоту, бычий сывороточный альбумин, декстрозу и каталазу. Смесь PANTA включает в себя препараты, подавляющие жизнедеятельность Грам+, Грам– и анаэробных бактерий, а также грибов. Она состоит из полимиксина В, амфотерицина В, налидиксовой кислоты, триметоприма и азлоциллина. Прибор BACTEC 960 оценивает пробирку как позитивную, если количество живых микробов в ней достигло  $10^5$ – $10^6$  на 1 мл среды.

Таким образом, прибор BACTEC MGIT 960 осуществляет компьютерный мониторинг состояния бактериальной популяции в обогащенной жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и сигнализирует о размножении минимального числа микроорганизмов.

### *Реагенты и расходные материалы для выявления МБ*

Большую часть необходимых реагентов и аксессуаров можно заказать по каталогу фирмы Becton Dickinson (BD). Реагенты для обработки

клинических образцов можно приготовить в условиях лаборатории, как это было описано ранее [4].

**MGIT tube, 7 ml** (пробирки MGIT, 7 мл). Пробирки предназначены для культивирования МБ с использованием прибора BACTEC 960. В каждой пластиковой пробирке с прикручивающейся крышкой содержится 7 мл среды Middlebrook 7H9, которую перед инокуляцией следует дополнить питательными добавками и антимикробными веществами для предотвращения контаминации. Инокулятом могут служить предварительно обработанные (разжиженные, деконтаминированные и концентрированные) клинические образцы, за исключением мочи, стерильные биологические жидкости (исключая кровь) и культуры МБ. Пробирки поставляются в картонной коробке, содержащей 100 пробирок. Температура хранения пробирок 2–25 °С.

**MGIT 960 Supplement** (дополнительный набор). Набор включает 6 флаконов по 15 мл ростовой добавки OADC, содержащей олеиновую кислоту, бычий альбумин, глюкозу и каталазу, а также 6 флаконов с лиофилизированной смесью антибиотиков PANTA, содержащей полимиксин Б, амфотерицин Б, налидиксовую кислоту, триметоприм и азлоциллин. Каждый набор рассчитан приблизительно на 100 пробирок, температура хранения набора 2–25 °С.

**BACTEC MGIT 960 AST стартовый набор.** Помимо Руководства пользователя набор включает:

- 2 транспортных штатива (на 60 гнезд),
- 16 держателей для 5 пробирок,
- 16 держателей для 2 пробирок,
- 3 держателя для 3 пробирок,
- 3 держателя для 4 пробирок,
- 3 держателя для 8 пробирок.

**BD BACTEC MGIT 960 AST комплекты держателей.** По 3 штуки на 2, 3, 4, 5 и 8 пробирок MGIT.

**BACTEC MGIT 960 AST запасные штрихкоды для держателей.** По 5 запасных штрихкодов для каждого комплекта держателей (на 2, 3, 4, 5 и 8 пробирок MGIT).

BACTEC MGIT 960 AST транспортный штатив.

**MycoPrep.** Набор предназначен для разжижения и деконтаминации клинических образцов, направленных для микроскопического и культурального исследований с целью выявления МБ. Набор включает:

- 10 флаконов (по 75 мл или по 150 мл) 2%-го раствора гидроксида натрия (NaOH), причем в каждом флаконе содержится стеклянная ампула с порошкообразным муколитиком – N-ацетил-L-цистеином (NALC);
- 5 пакетов фосфатного буфера.

Непосредственно перед использованием раствора NALC-NaOH (перед добавлением его в равном объеме к исследуемому образцу) ампулу следует раздавить внутри флакона. Каждый пакет с солями для фосфатного буфера растворяют в 0,5 л очищенной воды и предварительно стерилизуют автоклавированием. Температура хранения набора 15–20 °С.

## ОПИСАНИЕ МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ РОСТА МБ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ БУЛЬОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ BACTEC MGIT 960

### Подготовка пробирок MGIT для посева

Работы по подготовке пробирок MGIT необходимо проводить до манипуляций с заразным материалом во избежание контаминации. Работы проводятся стерильно в шкафу биологической безопасности 1-го или 2-го класса.

Приготовить обогащающую добавку с антибиотиками. Для этого протереть 70%-ным спиртом и вскрыть флакон с 15 миллилитрами обогащающей добавки OADC и флакон с лиофилизированными антибиотиками PANTA. Одноразовой стерильной пастеровской пипеткой перенести 15 мл обогащающей добавки OADC во флакон с лиофилизированными антибиотиками и тщательно перемешать. Необходимо удостовериться, что лиофилизат полностью растворился.

Выставить необходимое число пробирок MGIT на штатив, промаркировать. Открутить крышки пробирок, оставив их на пробирках. Дозатором переменного объема внести в каждую пробирку MGIT стерильными наконечником по 0,8 мл обогащающей добавки с растворенными антибиотиками. Крышки пробирок закрутить.

### Подготовка материала для посева

Перед инокуляцией в индикаторную пробирку MGIT нужно выполнить предварительную обработку клинического образца с целью его разжижения, деконтаминации и концентрации. Наилучшие результаты обеспечивает обработка 2–3%-ным раствором NaOH с NALC, которую рекомендуется проводить в боксе биологической безопасности 2-го класса с соблюдением стерильности по схеме, изложенной ранее [4].

### Посев диагностического материала в пробирки MGIT

Инокуляция осадка обработанного материала в индикаторные пробирки MGIT проводится

с помощью стерильной пастеровской пипетки в условиях стерильности в шкафу биологической безопасности 2-го класса:

- снять откручивающуюся крышку с пробирки MGIT;
- внести 0,5 мл осадка диагностического материала в пробирку MGIT и параллельно произвести посев 0,2–0,5 мл материала на плотную среду Левенштейна–Йенсена или Финна-2;
- убедившись, что пробка пробирки плотно закручена, произвести загрузку пробирки в прибор ВАСТЕС 960 в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

**Внимание!** Если следовать данному протоколу, то одного флакона смеси PANTA/OADC будет достаточно для обогащения 18 пробирок MGIT, а одного дополнительного набора (6 флаконов) – для обогащения 108 пробирок, что немного больше, чем содержится в одной упаковке (в коробке 100 пробирок MGIT). Таким образом, при оформлении заказа на каждую фирменную упаковку пробирок необходимо выписать 1 обогащительный набор.

### Инкубация пробирок в системе

1. Открыть один из ящиков прибора ВАСТЕС MGIT 960 и нажать появившуюся на экране кнопку “tube enter” («загрузка пробирки»). При этом загорается лампа сканера для считывания штрихкода с пробирки.

2. Считать сканером штрихкод пробирки с инокулятом и установить ее в гнездо, рекомендуемое прибором.

3. Следует ежедневно проверять показания прибора на предмет появления положительных и отрицательных результатов.

4. О **положительном** результате (рост бактериальной культуры) свидетельствует красный сигнал положительного индикатора на соответствующем ящике и значок на дисплее прибора.

5. При появлении информации о положительном результате необходимо открыть указанный ящик, нажать появившуюся на экране кнопку “positive”, извлечь соответствующую пробирку из гнезда (вместо красной индикации, указывавшей непосредственно на место «положительной» пробирки, появляется зеленая, указывающая на освободившееся гнездо) и отсканировать штрихкод.

6. Пробирки, в которых не зафиксирован рост бактериальной культуры прибором в течение 42 дней, оцениваются системой как отрицательные. Об **отрицательном** результате (отсутствие роста МБ) свидетельствует зеленый сигнал

отрицательного индикатора на соответствующем ящике и значок на дисплее прибора.

7. При появлении информации об отрицательном результате необходимо открыть указанный ящик, нажать появившуюся на экране кнопку “negative”, извлечь указанную пробирку из гнезда и просканировать ее штрихкод.

### Оценка результатов культивирования на автоматизированной системе

Положительный результат, свидетельствующий о росте культуры в индикаторной пробирке, регистрируется с 4-го дня после инокуляции, положительный сигнал на первые–третьи сутки может быть расценен как микробная контаминация образца. Для подтверждения роста МБ, а также идентификации МБТ в позитивной пробирке проводятся следующие процедуры:

- Удалив позитивную или негативную пробирку из прибора, следует визуально оценить прозрачность бульонной среды для определения возможного роста МБ. Обычно рост культуры МБТ проявляется в виде характерных придонно расположенных хлопьев, которые при незначительном встряхивании поднимаются и распространяются по всей среде, при этом жидкая среда сохраняет прозрачность. Помутнение среды в позитивной пробирке свидетельствует о возможной контаминации посторонней флорой.

- Приготовить мазок по методу Циля–Нильсена для выявления кислотоустойчивых бактерий.

- Произвести пересев содержимого пробирки на чашку с кровяным агаром. Наличие роста на чашке в результате инкубации в течение 24–48 часов при 37 °С свидетельствует о микробной контаминации материала.

- Рекомендуется проведение идентификации культуры, выросшей в пробирке, с использованием ПЦР-технологии или иммунохроматографического теста.

### Порядок выдачи заключения

Гарантированный положительный результат, свидетельствующий о получении культуры МБТ, выдается на 5–41-й день при следующих условиях:

- Положительный сигнал прибора + кислотоустойчивые бактерии при бактериоскопии + отсутствие роста посторонней микрофлоры на кровяном агаре в течение 24–48 часов, положительный результат ПЦР на наличие в образце ДНК МБ или положительный иммунохроматографический тест на наличие в культуральной среде микобактериального антигена МРТ64.

Гарантированный отрицательный результат роста МБТ на автоматизированных системах выдается на 42-й день.

### Контроль качества

Контроль качества выполняется при получении каждой новой партии пробирок MGIT с использованием коллекционных штаммов МБ: *M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478 и *M. fortuitum* ATCC 6841. Контроль качества можно проводить с помощью других лабораторных штаммов. В частности, штамм *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (при посеве в пробирку MGIT 0,5 мл микробной взвеси, приготовленной по 0,5 стандарту McFarland и разведенной 1:100) дает рост, подтвержденный положительным сигналом BACTEC 960, на 7–9-й день после внесения в прибор.

### Контаминация при использовании системы MGIT и ее предупреждение

Приемлемым для обогащенной жидкой среды считается уровень контаминации, достигающий 5–8% от общего числа посевов. При повышении уровня контаминации более 10% необходимо срочное выявление ее причин и принятие мер по их устранению.

При получении положительного результата прибора BACTEC 960 (с 4-го по 42-й день) необходимо убедиться, что в жидкой среде положительной пробирки не содержится контаминирующих микроорганизмов. Если при посеве на кровяной агар контаминация материала в пробирке подтверждена, то при необходимости можно произвести повторную деконтаминацию образца и попытаться выделить чистую культуру МБ.

В качестве мер борьбы с контаминацией посевов, осуществляемых с помощью автоматизированных систем, могут быть рекомендованы следующие мероприятия:

- увеличение концентрации щелочи при первичной обработке материала (не более чем до 1,5% после соединения с образцом);
- увеличение времени обработки мокроты раствором NALC-NaOH до 25 минут.

Изменения параметров обработки мокроты рекомендуется производить в указанном порядке. Не следует изменять сразу несколько параметров одновременно.

Если контаминация одним и тем же видом (видами) микроорганизмов наблюдается часто, то ее причина, скорее всего, кроется в недостаточной чистоте реактивов или отсутствии стерильности реагентов и посуды.

Общим правилом является аликвотирование растворов небольшими объемами. Каждый раз используется свежий раствор, оставшийся объем раствора не сохраняется.

Важным фактором борьбы с контаминацией является сокращение времени хранения мокро-

ты, чем предупреждается ее заселение посторонней микрофлорой. При необходимости хранить мокроту следует в холодильнике при 4 °С не более 3 суток.

В процессе деконтаминации мокроты раствором NALC-NaOH важно несколько раз перевернуть пробирку, чтобы действию раствора подверглись все участки внутренней стенки пробирки, особенно в ее верхней части.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Культуральные методы диагностики туберкулеза. Учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы / Под ред. чл.-корр. РАМН, профессора В.В. Ерохина. – М. – Тверь: ООО «Изд-во “Триада”». 2008. – 208 с.
2. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение № 11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза».
3. Приказ МЗ РФ от 29.12.14 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
4. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Смирнова Т.Г. Культуральный метод исследования микобактерий. Деконтаминация образцов диагностического материала // Вестник ЦНИИТ. 2020. – № 2. – С. 89–99.
5. 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.
6. 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.
7. Mycobacteriology laboratory manual. Global Laboratory Initiative, 2014 Available at: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli\\_mycobacteriology\\_lab\\_manual\\_web.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf) (Accessed 20 November 2018)
8. Siddiqi S.H., Rüsç-Gerdes S. MGIT™ Procedure Manual. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT). Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006, 89 p.
9. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti T.M., Gesu G., Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, no. 11, pp. 3578–3582.

## REFERENCES

1. Cultural methods of TB diagnosis. Educational manual for the basic training course for personnel from bacteriology laboratories of TB services. Ed. by V.V. Erokhin. Moscow-Tver, Triada, 2008, 208 p. (In Russ.)
2. On improvement of TB control measures in the Russian Federation. Edict no. 109 by RF MoH as of 21.03.2003. Annex no. 11. Instruction for the unified methods of microbiological studies for detection, diagnosis and treatment of TB. (In Russ.)
3. On endorsement of methodical recommendations on improvement of pulmonary TB diagnosis and treatment. Edict no. 951 by RF MoH as of 29.12.2014. (In Russ.)
4. Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu., Smirnova T.G. Detection of mycobacteria by culture inoculation. Decontamination of diagnostic samples. *CTRI Bulletin*, 2020, no. 2, pp. 89–99. (In Russ.)
5. Chernousova L.N., Puzanov V.A., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Popov S.A. Laboratory diagnosis of TB. In: Methodical materials for thematic improvement cycle. Ed. by V.V. Erokhin, Moscow, 2012, 707 p. (In Russ.)
6. 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 on organization and implementation of microbiological and molecular genetic diagnostics of TB. Moscow, RSPH, 2015, 35 p. (In Russ.)
7. Mycobacteriology laboratory manual. Global Laboratory Initiative, 2014 Available at: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli\\_mycobacteriology\\_lab\\_manual\\_web.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf) (Accessed 20 November 2018).
8. Siddiqi S.H., Rüsçh-Gerdes S. MGIT™ Procedure Manual. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT). Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006, 89 p.
9. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti T.M., Gesu G., Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: Multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol. 37, no. 11, pp. 3578–3582.

## ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

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

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

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

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

Черноусова Лариса Николаевна, д.б.н., профессор, зав. отделом микробиологии  
Тел.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: lchernousova@mail.ru

## FOR CORRESPONDENCE:

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

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

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

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

Larisa N. Chernousova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head, Microbiology Department  
Tel.: +7 (499) 785-90-91  
E-mail: lchernousova@mail.ru