

Методики лабораторных исследований

КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ. ДЕКОНТАМИНАЦИЯ ОБРАЗЦОВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

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

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

Поступила 18.03.2020

Проведен обзор существующих методов предпосевной обработки диагностического материала для культурального исследования на микобактерии (МБ). Изложены основные принципы и рекомендации по предобработке диагностического материала. Приведены наиболее актуальные методики деконтаминации поступающих в лабораторию образцов.

Ключевые слова: микобактерии, культуральный метод, диагностический материал, деконтаминация.

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

DOI: 10.7868/S2587667820020119

Laboratory Techniques

DETECTION OF MYCOBACTERIA BY CULTURE INOCULATION. DECONTAMINATION OF DIAGNOSTIC SAMPLES

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

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 18.03.2020

We reviewed the existing methods of pre-treatment before inoculation of diagnostic samples for mycobacteria detection. We outlined the main principles and recommendations on pre-treatment of diagnostic samples. We also described the most relevant methods of decontamination of diagnostic samples.

Keywords: mycobacteria, culture inoculation, diagnostic samples, decontamination.

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 настоящее время туберкулез (ТБ) продолжает оставаться одной из наиболее актуальных медико-биологических и социально-экономических проблем, стоящих перед мировым сообществом. Население значительно инфицировано микобактериями туберкулеза (МБТ) и, несмотря на то, что заболевание, вызываемое этими бактериями, является предотвратимым и излечимым, угроза для мирового здравоохранения по-прежнему сохраняется. Неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по ТБ усугубляется развитием лекарственной устойчивости МБТ, что способст-

вует возрождению ТБ там, где ранее намечались тенденции к снижению заболеваемости. Кроме того, ситуацию существенно осложняет пандемия ВИЧ/СПИДа, в большей степени затронувшая развивающиеся страны. Поэтому крайне важно, чтобы выявление случаев ТБ было максимально эффективным [25].

Одним из методов диагностики ТБ является культуральный метод, который активно применяется в России в лабораториях учреждений фтизиатрического профиля. Данный метод позволяет получить культуру МБ путем посева диагности-

ческого материала на питательные среды с последующей идентификацией выросших микроорганизмов. Целью применения метода является выделение и идентификация МБ.

Культура МБ является основным объектом микробиологического исследования при диагностике микобактериального поражения. Тесты, основанные на культивировании микроорганизмов, позволяют не только верифицировать диагноз, но и контролировать эффективность химиотерапии при легочном ТБ, способствуют диагностике внелегочного ТБ, а также дают возможность проводить исследования по определению лекарственной чувствительности возбудителя. Специфичность культурального метода превышает специфичность микроскопических методов при условии выполнения полного алгоритма идентификации микроорганизмов, а чувствительность значительно выше: культуральный метод дает возможность выявить МБ при наличии в 1 мл исследуемого диагностического материала нескольких десятков жизнеспособных клеток возбудителя [14].

При культивировании МБ используют разные по составу многокомпонентные питательные среды, дающие возможности для роста микроорганизмов. Культивирование с обязательной видовой идентификацией выросших микроорганизмов обеспечивает точную диагностику ТБ и/или микобактериоза. При помощи культурального метода удается выявить на 20–40% больше случаев ТБ с бактериовыделением по сравнению с методом микроскопии. Диагностическая чувствительность культурального метода в группе впервые выявленных больных ТБ легких достигает 70–80%. Комплекс современных молекулярных методов позволяет в короткие сроки (1–2 дня) проводить видовую идентификацию культуры МБ и сразу же дифференцировать МБТ от нетуберкулезных МБ и неспецифической микрофлоры [4].

Однако следует отметить, что время генерации микобактериальных клеток варьирует от 18 до 24 часов, в связи с чем время для получения роста на питательной среде при бактериологическом посеве значительно увеличивается, и результат исследования может быть получен в сроки от 14 дней до 12 недель, хотя ценность результата ни в коей мере не уменьшается [4].

При использовании культуральных исследований для диагностики ТБ требуется соблюдение ряда обязательных условий: наличие специализированных помещений, достаточная материально-техническая база (специализированное лабораторное оборудование) как для приготовления питательных сред и культивирования, так и для

предпосевной обработки диагностических образцов. Для обеспечения биологической безопасности требуются достаточные материальные вложения как в техническое обслуживание оборудования и вентиляционных систем, так и в использование одноразовых расходных и защитных материалов. Залогом успешной лабораторной диагностики МБ несомненно является кадровый состав, сформированный из персонала разного уровня, прошедшего специальное обучение и теоретическую подготовку (врачи, лаборанты, санитарки) [1–4].

Особенностью лабораторной диагностики микобактериальных инфекций является необходимость обязательной предпосевной обработки диагностического материала. Образцы диагностического материала должны быть деконтаминированы для предотвращения роста микроорганизмов, загрязняющих посев и не позволяющих МБ дать рост на питательной среде. Необходимо учитывать, что все деконтаминационные методики в некоторой степени также вредны и для МБ и могут приводить к их гибели. Соответствующие деконтаминационные методы поддерживают тонкое равновесие между ростом МБ и контаминацией другими микроорганизмами [4].

ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ДЕКОНТАМИНАЦИЯ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБРАЗЦОВ

Любые диагностические образцы всегда надо рассматривать как потенциально опасные агенты, которые могут содержать биологические объекты, опасные для здоровья исследователя. Работа с этими образцами должна проводиться с использованием средств индивидуальной защиты (респираторы степени защиты FFP-2 или FFP-3, одноразовые халаты, гипоаллергенные защитные перчатки) и со строгим соблюдением мер биологической безопасности [1–2].

Питательные среды создают благоприятные условия для активного размножения разнообразных видов бактерий-контаминантов, бурный рост которых мешает развитию гораздо более медленно растущих МБ и затрудняет выделение чистой культуры для диагностики. Обязательным условием для выделения МБ является специализированная предпосевная обработка диагностического материала, обеспечивающая деконтаминацию, то есть гибель неспецифических микроорганизмов.

Кроме того, МБ, выделяющиеся из дыхательных путей больного, как правило, окружены большим количеством слизистых веществ, затрудняющих их выделение. В связи с этим мокроту и другие диагностические образцы перед посевом, одновременно с деконтаминацией, подвергают разжижению и гомогенизации.

При выполнении посевов на МБ необходимо иметь в виду несколько важных аспектов:

- ни гомогенизация, ни деконтаминация не должны существенно уменьшать содержание жизнеспособных МБ в диагностическом материале;
- при гомогенизации и деконтаминации необходимо учитывать, что: МБ обладают повышенной устойчивостью к резкощелочной или кислой реакции растворов, продолжительность предпосевной обработки материала влияет на жизнеспособность МБ, температура образца в процессе его центрифугирования может повышаться, если не использовать центрифугу с охлаждением, на эффективность осаждения МБ влияют время и скорость центрифугирования.

Известно, что все препараты, используемые в настоящее время для разжижения и деконтаминации диагностического материала, обладают более или менее выраженной токсичностью в отношении МБ. Чтобы обеспечить выживание достаточной части микобактериальной популяции, необходимо использовать щадящие методы предпосевной обработки, позволяющие, с одной стороны, подавить рост быстрорастущих микроорганизмов, а с другой – максимально сохранить жизнеспособность присутствующих в материале МБ.

Частота контаминации посевов (количество «проростов») в лабораториях, проводящих исследование свежесобранных проб, при культивировании мокроты на плотных яичных питательных средах обычно составляет 2–5%, при культивировании на жидких питательных средах – 4–8%. Если диагностический материал до поступления в лабораторию хранился в течение нескольких дней в нерегламентированных условиях, частота контаминации может увеличиваться и достигать 5–10%, что существенно осложняет культуральные исследования для выявления роста МБ. Количество «проростов» на плотных средах менее 2% свидетельствует о чрезмерно жестком режиме деконтаминации, что, в свою очередь, может привести к гибели значительной части МБ, содержащихся в диагностическом материале. Для унификации результатов исследования необходимо, чтобы микробиологические лаборатории использовали для гомогенизации и деконтаминации диагностического материала стандартный метод предпосевной обработки.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ МАТЕРИАЛА

Проведенный нами анализ специальной литературы показал, что при описании разных методов обработки диагностического материала авторы часто призывают к пересмотру существующих стандартных методик.

Предлагаемые методы предпосевной обработки диагностического материала нередко нацелены на проведение определенного вида лабораторного исследования. Кроме того, многие авторы учитывают и конкретную экономическую ситуацию в странах, где финансирование лабораторных исследований остается на низком уровне. Так, например, большое число методик направлено на оптимизацию метода микроскопии с учетом низкой материальной обеспеченности лабораторий в бедных странах, где даже применение центрифугирования является ограничивающим фактором [25]. Для повышения чувствительности методов микроскопии предлагают применение дополнительных этапов, включая центрифугирование и обработку мокроты щелочными химическими веществами, такими как NaOH и хлорсодержащими компонентами для разжижения и концентрации образцов мокроты, что позволяет улучшить обнаружение МБ при микроскопии.

В систематическом обзоре Steingart K.R. и Ng V. с соавторами было показано, что центрифугирование при щелочной обработке мокроты повышает чувствительность микроскопии. Quincó P. с соавторами описали систему фильтрации мокроты, которая смогла значительно повысить чувствительность микроскопии – с 47,6% (при использовании центрифугирования) до 61,9% (при использовании фильтрации) [19, 22].

Однако в этих исследованиях не говорится о том, как применяемые методы влияют на жизнеспособность МБ в целом и их способность давать рост на питательных средах без потери чувствительности культурального метода.

Другие авторы провели обзор исследований с использованием гипохлорита натрия (NaOCl) для предпосевной обработки мокроты с последующим центрифугированием, в котором, наоборот, отмечено значительное повышение чувствительности культуральных диагностических тестов при использовании данной методики [10].

Группа авторов предложила методику предпосевной обработки мокроты USP реагентом, содержащим комбинацию хаотропного агента (гидрохлорида гуанидина) с муколитическим агентом и детергентами [11]. Тем не менее авторами по-

казано, что одной из серьезных проблем данной предпосевной обработки мокроты является потеря жизнеспособности, необходимой для культивирования МБ. Авторы указывают, что эти экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что данная обработка не дает дополнительных диагностических преимуществ.

Тем не менее в исследовании Chakravorty S. и соавт. также описан метод, использующий хаотропные свойства гидрохлорида гуанидина для предварительной обработки образца, включающий инкубацию образца, концентрацию МБ центрифугированием и использование обработанного образца для одновременного исследования методами микроскопии, посева и ПЦР [8]. Метод был всесторонне изучен на легочных и внелегочных клинических образцах и культурах МБ. Было показано, что уникальные свойства клеточной стенки МБ делают эти организмы избирательно устойчивыми к действию GuHCl , в то время как клетки других бактерий и эукариотические клетки разрушаются [18]. Установлено, что при использовании гуанидина образцы, содержащие от 300 до 400 клеток в мл, после микроскопического исследования были оценены как положительные. К достоинствам метода отнесено освобождение пробы от клеточного мусора и минимизация технических ошибок при микроскопии каждого препарата. Однако в этом же исследовании показано, что предобработка GuHCl делает нежизнеспособными от 45 до 66% микобактериальных клеток, что существенно влияет на чувствительность процедуры посева на питательные среды. В исследовании также отмечается, что раствор GuHCl , содержащий 4 м GuHCl (вместо 5–6 м GuHCl), в меньшей степени влияет на жизнеспособность МБ. Относительно молекулярных методик показано, что метод способствует высвобождению ДНК перед процедурой собственно выделения, снижает количество ингибиторов реакции амплификации и увеличивает число положительных результатов молекулярной диагностики *M. tuberculosis* [8].

В некоторых рекомендациях описан модифицированный метод Петрова, который практикуется во многих лабораториях, осуществляющих культивирование МБ и тестирование их на лекарственную чувствительность. Метод предлагает предпосевную обработку мокроты 4% гидроксидом натрия [20].

Christian A. Ganoza и соавт. утверждают, что гипертонический раствор гидроксида натрия (HS-SH) для предпосевной обработки мокроты перед микроскопией и культивированием МБ повышает чувствительность микроскопии по сравнению с обычным неконцентрированным

прямым мазком, и данный метод проще и дешевле, что делает его перспективным для использования национальными программами по борьбе с ТБ в развивающихся странах [9].

В исследованиях, в которых для предпосевной обработки мокроты сравнивались два метода – с обработкой 0,7% хлоргексидином и обработкой NaOH-NALC – проверке подвергались показатели деконтаминации и жизнеспособности МБ. Культивирование проводили на среде Левенштейна–Йенсена. Авторами было показано, что обработка мокроты хлоргексидином превосходит стандартный метод NALC-NaOH в выделении *M. tuberculosis* [6,13].

Наиболее часто в лабораториях развитых стран используется предварительная обработка гидроксидом натрия и раствором N-ацетил L-цистеина (NALC-NaOH) в комбинации с центрифугированием. Метод широко используется в современных лабораториях для повышения чувствительности диагностики [5, 15, 16, 18, 23, 24].

В некоторых работах также показано, что увеличение конечной концентрации NaOH до 1,5% в сочетании с NALC снижало степень контаминации культур МБ. Следовательно, как полагают авторы, использование конечной концентрации 1,5% NaOH с методом NALC является удачным выбором и помогает снизить уровень контаминации клинических образцов, направленных для выявления роста культур МБ, особенно в условиях, где загрязнение культур является проблемой [12].

Ранее, при исследовании влияния двух различных концентраций гидроксида натрия (NaOH) – 1% и 1,25% – для деконтаминации и разжижения мокроты, было показано, что изменение концентрации NaOH не оказывает влияния на увеличение числа микроскопически положительных образцов. Однако при повышении концентрации NaOH число положительных результатов выявления культур МБ снижается с 21% до 11%. Эти результаты свидетельствуют о том, что небольшое снижение числа контаминированных культур не оправдывает значительной потери положительных культур [17].

В Российской Федерации в соответствии с отечественными нормативными документами были рекомендованы к применению следующие методы предпосевной обработки диагностического материала: метод обработки материала 10%-ным раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия, метод обработки 3%-ной серной кислотой, метод обработки 4%-ным раствором едкого натра (модифицированный метод Петрова), метод с использованием 5%-ной щавелевой кислоты или 4%-ной серной кислоты.

Однако в настоящее время указанные методы деконтаминации в значительной степени

утратили свою актуальность в связи с распространением золотого стандарта диагностики – автоматической системы считывания роста МБ BACTEC MGIT (BD, США), в диагностическом алгоритме которого используется метод предпосевной обработки с помощью NALC-NaOH. В настоящее время этот метод рекомендуется в качестве предпочтительного, обеспечивающего хорошую деконтаминацию и разжижение диагностического материала и высокий уровень высеваемости МБ.

Следует отметить, что использование преимущественно метода NALC-NaOH в качестве основного не исключает применение в отдельных случаях других методов. В частности, иногда лабораторным специалистам приходится сталкиваться с чрезмерно высокой контаминацией проб (например, от пациентов, больных муковисцидозом) [7]. Это создает большие сложности в работе. В таких случаях можно применить более жесткие методы деконтаминации, например – с использованием 5%-ной щавелевой кислоты или 4–6%-ной серной кислоты. Эти методы нередко дают хорошие результаты в тех случаях, когда пробы мокроты оказываются массивно загрязненными *Pseudomonas sp.* и другими грамотрицательными микроорганизмами.

Необходимо помнить, что ни один метод разжижения и деконтаминации не подходит для всех клинических образцов во всех ситуациях. При выборе деконтаминационной методики следует отдавать предпочтение методикам с наиболее щадящим воздействием.

МЕТОДИКА ДЕКОНТАМИНАЦИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА И ГИДРОКСИДА НАТРИЯ (NALC-NaOH)

N-ацетил-L-цистеин (NALC) является муколитическим препаратом. NALC в сочетании с 2% NaOH является реагентом, одновременно способствующим разжижению образцов и их деконтаминации с целью предотвращения роста неспецифических микроорганизмов. При разбавлении реагента равным объемом образца получается наиболее эффективная среда для разжижения и деконтаминации с конечной концентрацией NaOH, составляющей 1%, которая менее токсична для МБ.

В реагенте содержится цитрат натрия, связывающий ионы тяжелых металлов, наличие которых

в образце может привести к деактивации NALC. Поскольку муколитическая активность NALC со временем снижается, компонент NALC готовят в день обработки образцов. *Реагент может храниться в готовом состоянии не более 24 часов.*

Последующая обработка образца стерильным фосфатным буфером снижает pH раствора NALC-NaOH и *стандартизует вес* образца перед осаждением МБ в центрифуге.

Этот метод дает более высокий процент положительных проб на наличие МБ при посеве на питательные среды и является приоритетным при выборе деконтаминирующего реагента.

Все реактивы, используемые при приготовлении растворов для предпосевной обработки диагностического материала, должны иметь степень очистки не менее категории «химически чистый» (ХЧ).

Приготовление реагентов для предпосевной обработки клинических образцов

1) Для получения деконтаминирующего раствора, содержащего 2% NaOH (с цитратом натрия), необходимо смешать равные объемы 4%-ного раствора NaOH и 2,9%-ного раствора цитрата натрия.

Растворы готовят следующим образом:

- раствор NaOH: 4 г NaOH растворить в 100 мл дистиллированной воды,
- раствор цитрата натрия: 2,9 г Na-цитрата дигидрата или 2,6 г Na-цитрата безводного растворить в 100 мл дистиллированной воды.

Указанные растворы смешиваются в равном объеме, стерилизуются и хранятся в стерильной закрытой посуде для дальнейшего использования.

Другой вариант приготовления раствора NaOH-цитрат – в 1 литре дистиллированной воды растворить:

- гидроксид натрия (NaOH) – 20,0 г,
- цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) – 14,5 г.

Непосредственно перед проведением процедуры предобработки материала готовят рабочий раствор деконтаминанта: в раствор NaOH-цитрат добавляют порошок муколитического (разжижающего) агента NALC, из расчета 0,5 г на 100 мл раствора.

После добавления NALC разжижающая и деконтаминирующая образец смесь NALC-NaOH может быть использована только *в течение 24 часов*, так как по истечении указанного срока раствор быстро теряет свою муколитическую активность. В связи с этим рекомендуется готовить небольшие объемы раствора, чтобы каждый раз использовать для процедуры деконтаминации

свежий раствор, не сохраняя оставшийся объем реагентов для последующего использования.

При высоком загрязнении образцов посторонней микрофлорой концентрацию гидроксида натрия в исходном растворе можно увеличить до 3%.

2) Для получения фосфатного буфера (рН=6,8) готовят два раствора:

а) 9,47 г безводного Na_2HPO_4 растворяют в 1 литре дистиллированной воды,

б) 9,07 г KH_2PO_4 растворяют в 1 литре дистиллированной воды.

Далее, для приготовления буфера с рН=6,8 оба приготовленных раствора смешивают в равном количестве и проверяют уровень рН с помощью рН-метра или индикаторной бумажной полоски. Необходимого значения рН добиваются, добавляя растворы (а) или (б). Раствор (а) повышает значение рН, раствор (б) понижает.

Другой вариант приготовления буферного раствора – в 1 л дистиллированной воды необходимо растворить:

– двухзамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) – 4,74 г,

– однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4) – 4,54 г.

Стерилизация буфера проводится в автоклаве при 121 °С в течение 15 минут в емкости с частично открученной крышкой. После остывания раствора до комнатной температуры, крышку следует плотно закрыть.

Порядок предобработки диагностического материала

Обработку материала следует проводить в боксе биологической безопасности II класса с соблюдением правил стерильной работы.

Хирургический материал (ткани легкого, костная и хрящевая ткань) необходимо гомогенизировать. Любой жидкий невязкий материал объемом больше 5 мл (жидкость бронхоальвеолярного лаважа, моча, смывы со слизистой верхних дыхательных путей, экссудаты и пр.) необходимо центрифугировать при 3000 g 15 мин, аккуратно отобрать надосадочную жидкость и подвергнуть обработке осадок.

- К диагностическому образцу (примерно 3–5 мл), который находится в пластиковой градуированной центрифужной пробирке на 50 мл, добавить равный объем NALC-NaOH.

- Плотно закрыв крышку, смешать содержимое пробирки встряхиванием или с помощью вортекса (в течение 5–20 секунд), стремясь достигнуть полного разжижения; рекомендуется несколько раз перевер-

нуть пробирку, чтобы все участки внутренних поверхностей пробирки и крышки подверглись действию раствора.

Важно! Избегайте усиленного встряхивания, чтобы предотвратить окисление и инактивацию NALC.

Важно! Не превышайте время экспозиции с раствором NALC-NaOH. Длительная экспозиция материала с NALC-NaOH снижает число жизнеспособных МБ и может привести к ложноотрицательным результатам.

- Оставить образец на 20 минут при комнатной температуре для деконтаминации.

Внимание! Начиная со следующего пункта, все процедуры проводятся стерильно.

- Добавить в пробирку стерильный фосфатный буфер (рН=6,8) до отметки «45–50 мл» (для снижения воздействия NaOH и уменьшения плотности раствора перед центрифугированием). Плотно закрыть крышку и перемешать содержимое пробирки встряхиванием, чтобы омыть все внутренние поверхности пробирки и крышки.
- Центрифугировать образец в течение 15 минут при 3000 g в антиаэрозольной центрифуге с охлаждением для осаждения 95% имеющихся в материале МБ.
- Удалить надосадочную жидкость в емкость с дезинфицирующим раствором, а затем закрыть пробирку.

Важно! Удалять надосадочную жидкость необходимо крайне аккуратно, поскольку, с одной стороны, нельзя потерять осадок, с другой стороны, излишки реагентов, оставшихся в пробе, приводят к изменению рН осадка и снижению ростовых свойств МБ.

- Добавить к осадку 2 мл новой порции стерильного фосфатного буфера, затем тщательно ресуспендировать. Осадок материала готов для проведения процедур посева, микроскопии и ПЦР.

При проведении процедуры деконтаминации необходимо помнить, что центрифугирование является одной из наиболее опасных процедур в отношении риска образования инфекционного аэрозоля.

Процедуры пипетирования, переливания из емкости в емкость также должны быть сокращены до минимума и проводиться в боксе биобезопасности II класса.

МЕТОД ОБРАБОТКИ МАТЕРИАЛА 10%-НЫМ РАСТВОРОМ ТРЕХЗАМЕЩЕННОГО ФОСФАТА НАТРИЯ

До появления автоматизированных систем, использующих жидкие питательные среды, указанный метод обработки являлся основным в противотуберкулезных лабораториях России и до сих пор продолжает использоваться при проведении предобработки диагностического материала для посева его на плотные яичные среды.

Трехзамещенный фосфат натрия (Na_3PO_4) хорошо подавляет сопутствующую флору и даже при 2–3-дневном хранении материала при $+4\text{ }^\circ\text{C}$ не повреждает МБ и мало влияет на их способность к росту на питательных средах.

Приготовление растворов

100 г трехзамещенного фосфата натрия растворяют в 800 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до 1 л.

6 мл концентрированной соляной кислоты добавляют к 94 мл дистиллированной воды.

Никогда не добавляйте воду в кислоту!

Методика обработки

1. Исследуемый материал залить равным объемом 10%-ного трехзамещенного фосфата натрия, плотно закрыть емкость и поместить ее на 10 минут на встряхиватель. Оптимальным вариантом для сбора и обработки материала является использование прозрачных мерных пластмассовых центрифужных пробирок объемом 50 мл. Кроме того, для каждого образца желательно иметь свою пробирку с Na_3PO_4 или отдельную пипетку, чтобы избежать перекрестной контаминации образцов при заливании деконтаминирующего раствора.

2. Пробирку или контейнер с материалом, залитым деконтаминантом, поместить на 18–20 часов в термостат при $37\text{ }^\circ\text{C}$.

3. После этого пробирки, не открывая, уравновесить, поместить в соответствующую центрифугу и центрифугировать при 3000 g в течение 15 минут. При указанном режиме происходит осаждение 95% присутствующих в материале МБ.

Если материал поступил в лабораторию в контейнере, по окончании деконтаминации осадок материала из контейнера следует перенести стерильной пипеткой объемом 5–10 мл в центрифужную пробирку, уравновесить пробирки и центрифугировать в описанном режиме.

4. Надосадочную жидкость отобрать стерильной пипеткой на 10–5 мл и перенести ее

в емкость с дезинфицирующим раствором, оставив в каждой пробирке 1,2–1,5 мл осадка.

5. Использованную пипетку опустить в емкость с дезинфицирующим раствором.

6. К осадку стерильно добавить несколько капель 6%-ной соляной кислоты или 1%-ной лимонной кислоты до получения нейтрального значения pH, определяемого индикаторной бумажной полоской. Чтобы не нарушить стерильность осадка при проверке значения pH, следует капнуть одну каплю осадка на индикаторную бумагу.

7. Пробирку с осадком поместить в штатив в порядке регистрационных номеров материала.

8. Для снижения токсичного воздействия на МБ различных остатков веществ (в том числе возможных химиопрепаратов) проводят еще одну процедуру отмывки осадка 10–15 мл стерильной дистиллированной воды либо фосфатным буфером, использование которого способствует лучшей нейтрализации значения pH.

9. Супернатант удаляют, а осадок в объеме 0,8–1,0 мл готовят к инокулированию и приготовлению мазка.

Внутрилабораторный контроль качества деконтаминации

В процессе работы необходимо периодически выполнять контроль качества используемых реагентов, таких как NALC-NaOH и фосфатный буфер. Для улучшения мониторинга контаминации необходимо включать в обработку клинических проб отрицательный образец. Эту процедуру можно выполнять один раз в неделю. Также для мониторинга скорости роста необходимо использовать положительный образец.

Ежедневные мероприятия по контролю качества

Для контроля качества деконтаминации необходимо провести обработку лабораторных штаммов МБ, согласно применяемой процедуре деконтаминации, одновременно с клиническими образцами. В качестве тест-штаммов можно использовать лабораторный (музейный) штамм *M. smegmatis* или *M. fortuitum*. Необходимо приготовить суспензию этой культуры, взяв ее бактериологической петлей с поверхности плотной среды, разлить суспензию контрольного штамма в две пробирки, одну из которых подвергнуть процедуре деконтаминации одновременно с клиническими образцами. Сделать из каждого из образцов несколько разведений следующим образом:

- развести бактериальную суспензию по стандарту мутности № 5 (5×10^8 микробных тел/мл) – суспензия № 1,

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

Далее засеять по 0,2 мл обработанной и необработанной суспензий 5×10^3 и 5×10^4 на чашки Петри с кровяным агаром. Инкубировать засеянные чашки при 37 °С 24 часа. Засеянные разведения должны дать рост 1–10 и 10–100 колоний соответственно.

Процедура деконтаминации считается удовлетворительной, если число колоний в контрольных пробах, подвергнутых деконтаминации, не более чем в 2–4 раза ниже, чем в соответствующих необработанных контрольных пробах. *Результаты высева контрольных проб фиксируются в журнале регистрации посевов или в специальном журнале.*

Ежемесячные мероприятия по контролю качества

В лабораториях с числом исследований 20 и менее образцов в день допустимо ежемесячно контролировать уровень проростов пробирок, засеянных материалом после деконтаминации. При этом ведется учет всех засеянных и всех проросших пробирок.

При доле проросших пробирок менее 2%, процесс деконтаминации слишком сильно воздействует на микрофлору, и часть штаммов МБ могла погибнуть. В этом случае отрицательные результаты посева диагностического материала, который был подвергнут деконтаминации в контролируемый временной период, могут оказаться ошибочными. При доле проростов на плотной питательной среде более 5% деконтаминация недостаточна. В этом случае необходимо также провести дополнительную санобработку помещений лаборатории. В случае проростов, обусловленных низшими грибами, необходимо также проверить температуру культивирования микроорганизмов. *Доля проростов должна ежемесячно регистрироваться в одном из текущих регистрационных журналов.*

Результаты оценки доли проростов – менее трудоемкий процесс, чем ежедневный контроль качества с использованием контрольных штаммов, однако он не позволяет проводить оперативный контроль и исправление недостатков деконтаминации сразу по их выявлению, поскольку проводится раз в месяц. При этом результаты значительного количества образцов от пациентов могут оказаться ошибочными (ложноотрицательными).

В заключение подчеркнем, что при использовании метода культуральной диагностики необходимо соблюдать комплекс обязательных усло-

вий. Сочетание административно-инженерного подхода, связанного с обеспечением условий работы и методологического обеспечения при выборе метода деконтаминации, ретроспективный учет параметров контаминации посевов и меры, обеспечивающие постоянный контроль качества, будут способствовать достижению цели бактериологического исследования, а именно, получению чистой культуры МБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. План предупредительного и текущего обслуживания оборудования (ПТО) противотуберкулезной лаборатории. – 2017. WHO. Европейское региональное бюро. http://www.euro.who.int/___data/assets/pdf_file/0010/355789/WHO-ELI-TB-Lab-Maintenance-Plan_RUS.PDF.
2. Система инфекционного контроля в противотуберкулезных учреждениях: Руководство/Федорова Л.С., Юзбашев В.Г., Попов С.А., Пузанов В.А., Севастьянова Э.В., Акимкин В.Г., Фролова Н.В., Мясникова Е.Б., Волченков Г.В., Проньков В.А., Наголкин А.В.; под редакцией Л.С. Федоровой. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2013. – 192 с.
3. 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 редакцией проф. Ерохина В.В., Москва, 2012. – 707 с.
4. 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. – Москва. – 2015. – 35 с.
5. Angeby K.A., Hoffner S.E., Diwan V.K. Should the 'bleach microscopy method be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, no. 8, pp. 806–815.
6. Asmar S., Drancourt M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.*, 2015, vol. 5, no. 15, p. 155. doi: 10.1186/s12866-015-0479-4
7. British Thoracic Society. Guidelines for the management of non-tuberculosis mycobacteria pulmonary disease (NTM-PD). British Thoracic Society NTM Guideline Development Group, 2018.
8. Chakravorty S., Tyagi J.S. Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, no. 43, pp. 2697–2702.

9. Ganoza C.A., Ricaldi J.N., Chauca J., Rojas G., Munayco C., Agapito J., Palmino J.C. and Guerrf H. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for Mycobacterium tuberculosis microscopy and culture. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, no. 57, pp. 1094–1098. DOI 10.1099/jmm.0.2008/001339-0
10. Coronel J.E., Del Carpio C.C., Dianderas E.J., Florentini E.A., Kemper G.L., Sheen P., Zimic M.J. Evaluation of microbiological variants of sputum processing and concentration of mycobacteria to optimize the microscopic and imaging diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2019, no. 8 (1), pp. 75–82. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_172_18
11. Daley P., Michael J.S., Latha A., Mathai D. et al. A Pilot Study of Short-duration sputum pretreatment procedures for optimizing smear microscopy for tuberculosis. *PLoS ONE*, 2009, no. 4 (5), p. e5626. doi: 10.1371/journal.pone.0005626
12. Desalegn Addise, Adane Bitew, Zelalem Yaregal, Bazezew Yeneu, Helina Mollalign, Getu Diriba, and Abebaw Kebede. Effect of 1.5% sodium hydroxide final concentration on recovery rate of mycobacterial species and decontamination of other bacterial and fungal contaminants on sputum. *Ethiop. J. Public Health Nutr.*, 2016, no. 1 (1), pp. 57–67.
13. Ensa Gitteh, Jacob Kweku Otu, Tijan Jobarteh, Francis Mendy, Isatou Tutty Faal-Jawara, Nana Boatema Ofori-Anyinam, Abigail Ayorinde, Ousman Secka, Florian Gehre. Evaluation of sodium hydroxide-N-acetyl-L-cysteine and 0.7% chlorhexidine decontamination methods for recovering Mycobacterium tuberculosis from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). *International Journal of Mycobacteriology*, 2016, no. 5, pp. S167–S168.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016. Stockholm, 2016, ISBN 978-92-9193-739-4. doi 10.2900/216384
15. Iseman M.D. A clinician's guide to tuberculosis. PA, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, 460 p.
16. Kent P.T., Kubica G.P. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985.
17. Peres R.L., Maciel E.L., Morais C.G., Ribeiro F.C.K., Vinhas S.A., Pinheiro C., Dietze R., Johnson J.L., Eisenach K., Palaci M. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *J. Tuberculosis Dis.*, no. 13 (12), pp. 1572–1575.
18. Perkins M.D. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2000, no. 4 (suppl. 2), pp. S182–188. Tuberculosis Control India. <http://www.tbccindia.org>
19. Quincó P., Bühner-Sékula S., Brandão W., Monte R., Souza S.L., Saraceni V. et al. Increased sensitivity in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients through the small-membrane-filter method of microscopy. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, no. 51, pp. 2921–2925.
20. Satapathy P., Das D., Murmu B.N., Kar S.K. Decontamination of sputum for longer time in sodium hydroxide for isolation of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, vol. 3, no. 4, pp. 290–292. doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.09.006
21. Sohail M. Tuberculosis: A re-emerging enemy. *J. Mol. Genet. Med.*, 2006, no. 2, pp. 87–88.
22. Steingart K.R., Ng V., Henry M., Hopewell P.C., Ramsay A., Cunningham J. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, 2006, no. 6, pp. 664–674.
23. Trebucq A. Revisiting sputum smear microscopy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, no. 8, p. 805.
24. Van Deun A., Maug A.K., Cooreman E. et al. Bleach sedimentation method for increased sensitivity of sputum smear microscopy: does it work? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2000, no. 4, pp. 371–376.
25. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva, WHO, 2018. Available from: <http://www.apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf>. (Last accessed on 2018 Dec 15).

REFERENCES

1. Tuberculosis Laboratory Maintenance Plan (LMP) for preventive and routine maintenance of laboratory equipment. WHO/Europe, 2017. (In Russ.) http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/355789/WHO-ELI-TB-Lab-Maintenance-Plan_RUS.PDF.
2. Fedorova L.S., Yuzbashev V.G., Popov S.A., Puzanov V.A., Sevastyanova E.V., Akimkin V.G., Frolova N.V., Myasnikova E.B., Volchenkov G.V., Pronkov V.A., Nagolkin A.V. Infection control system in TB units: Guidelines. Ed. by L.S. Fedorova, Moscow-Tver, Triada, 2013, 192 p. (In Russ.)
3. 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.)
4. 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.)
5. Angeby K.A., Hoffner S.E., Diwan V.K. Should the 'bleach microscopy method be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, no. 8, pp. 806–815.
6. Asmar S., Drancourt M. Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing Mycobacterium tuberculosis. *BMC Microbiol.*, 2015, vol. 5, no. 15, p. 155. doi: 10.1186/s12866-015-0479-4
7. British Thoracic Society. Guidelines for the management of non-tuberculosis mycobacteria pulmonary disease (NTM-PD). British Thoracic Society NTM Guideline Development Group, 2018.
8. Chakravorty S., Tyagi J.S. Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary

- and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, no. 43, pp. 2697–2702.
9. Ganoza C.A., Ricaldi J.N., Chauca J., Rojas G., Munayco C., Agapito J., Palmino J.C. and Guerrf H. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for Mycobacterium tuberculosis microscopy and culture. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, no. 57, pp. 1094–1098. DOI 10.1099/jmm.0.2008/001339-0
 10. Coronel J.E., Del Carpio C.C., Dianderas E.J., Florentini E.A., Kemper G.L., Sheen P., Zimic M.J. Evaluation of microbiological variants of sputum processing and concentration of mycobacteria to optimize the microscopic and imaging diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Mycobacteriol.*, 2019, no. 8 (1), pp. 75–82. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_172_18
 11. Daley P., Michael J.S., Latha A., Mathai D. et al. A Pilot Study of Short-duration sputum pretreatment procedures for optimizing smear microscopy for tuberculosis. *PLoS ONE*, 2009, no. 4 (5), p. e5626. doi: 10.1371/journal.pone.0005626
 12. Desalegn Addise, Adane Bitew, Zelalem Yaregal, Bazezew Yenew, Helina Mollalign, Getu Diriba, and Abebaw Kebede. Effect of 1.5% sodium hydroxide final concentration on recovery rate of mycobacterial species and decontamination of other bacterial and fungal contaminants on sputum. *Ethiop. J. Public Health Nutr.*, 2016, no. 1 (1), pp. 57–67.
 13. Ensa Gitteh, Jacob Kweku Otu, Tijan Jobarteh, Francis Mendy, Isatou Tutty Faal-Jawara, Nana Boatema Ofori-Anyinam, Abigail Ayorinde, Ousman Secka, Florian Gehre. Evaluation of sodium hydroxide-N-acetyl-L-cysteine and 0.7% chlorhexidine decontamination methods for recovering Mycobacterium tuberculosis from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). *International Journal of Mycobacteriology*, 2016, no. 5, pp. S167–S168.
 14. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm: ECDC; 2016. Stockholm, 2016, ISBN 978-92-9193-739-4. doi 10.2900/216384
 15. Iseman M.D. A clinician's guide to tuberculosis. PA, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, 460 p.
 16. Kent P.T., Kubica G.P. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985.
 17. Peres R.L., Maciel E.L., Moraes C.G., Ribeiro F.C.K., Vinhas S.A., Pinheiro C., Dietze R., Johnson J.L., Eisenach K., Palaci M. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *J. Tuberculosis Dis.*, no. 13 (12), pp. 1572–1575.
 18. Perkins M.D. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2000, no. 4 (suppl. 2), pp. S182–188. Tuberculosis Control India. <http://www.tbncindia.org>
 19. Quincó P., Bühner-Sékula S., Brandão W., Monte R., Souza S.L., Saraceni V. et al. Increased sensitivity in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive patients through the small-membrane-filter method of microscopy. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, no. 51, pp. 2921–2925.
 20. Satapathy P., Das D., Murmu B.N., Kar S.K. Decontamination of sputum for longer time in sodium hydroxide for isolation of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Mycobacteriology*, vol. 3, no. 4, pp. 290–292. doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.09.006
 21. Sohail M. Tuberculosis: A re-emerging enemy. *J. Mol. Genet. Med.*, 2006, no. 2, pp. 87–88.
 22. Steingart K.R., Ng V., Henry M., Hopewell P.C., Ramsay A., Cunningham J. et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, 2006, no. 6, pp. 664–674.
 23. Trebuçq A. Revisiting sputum smear microscopy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2004, no. 8, p. 805.
 24. Van Deun A., Maug A.K., Cooreman E. et al. Bleach sedimentation method for increased sensitivity of sputum smear microscopy: does it work? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2000, no. 4, pp. 371–376.
 25. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva, WHO, 2018. Available from: <http://www.apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf>. (Last accessed on 2018 Dec 15).

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

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

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

FOR CORRESPONDENCE:

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

Elna V. Sevastyanova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91

E-mail: elinasev@yandex.ru

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

Tatiana G. Smirnova, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department

Tel.: +7 (499) 785-90-91

E-mail: s_tatka@mail.ru