

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

23 мая 2008 г.

Регистрационный № 068-0706

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ  
ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА НА ОСНОВЕ РАЗРАБОТКИ  
И ВНЕДРЕНИЯ В КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНУЮ ПРАКТИКУ НОВЫХ  
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ВЫРАЩИВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ  
ТУБЕРКУЛЕЗА**

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гродненский государственный  
медицинский университет», УОЗ «Гродненская областная клиническая  
больница»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И.С. Гельберг, О.Е. Кузнецов

Гродно 2008

В условиях современной негативной динамики туберкулеза, выраженных клинико-рентгенологических проявлений и тяжелого течения заболевания, нарастает частота лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к антибактериальным препаратам, увеличивается летальность.

В настоящее время мало разработок по культуральной диагностике туберкулеза, особенно в плане создания и внедрения в практику новых вариантов питательных сред.

В бактериологических лабораториях Республики Беларусь чаще используют среду Левенштейна–Йенсена. При этом культуральное исследование диагностического материала занимает не менее 3–8 недель. Известны и другие питательные среды, предложенные для выделения микобактерий туберкулеза: яичные (Гельберга, Мородовского («Новая»), Петраньяни и др.; жидкие: кровяная, полусинтетические и синтетические (Школьниковой, Сотона, Проскауэра и Бека, Дюбо), а также среды А-6 и А-9, созданные на основе препаратов микробного синтеза. Однако ни одну из вышеперечисленных сред нельзя считать универсальной. Это объясняется нарастающей метаболической изменчивостью возбудителя туберкулеза, появлением клинических вариантов МБТ, отличающихся друг от друга потребностями к химическим и биотехническим особенностям питательного субстрата.

Одним из серьезных недостатков современных питательных сред с использованием автоматического микробиологического мониторинга и ПЦР является их дороговизна из-за высокой стоимости составляющих компонентов и соответствующего оборудования, что с учетом необходимости определения лекарственной устойчивости МБТ делает культуральный метод диагностики весьма затратным.

Целью работы являлось повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза на основе разработки и внедрения в практику новых культуральных методов исследования путем создания более надежных и доступных для выращивания микобактерий туберкулеза питательных сред.

Разработанные питательные среды рекомендуются для практического использования в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений Республики Беларусь как дополнительные при параллельном посеве на традиционно используемую питательную среду Левенштейна–Йенсена. Их применение позволяет повысить качество лабораторной диагностики туберкулеза, сократить сроки проведения культурального исследования и получить значительный экономический эффект.

По результатам выполненной работы получено три патента на изобретение.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Автоклавы.

Ламинированные шкафы (II класс).

Дистиллятор.  
Холодильники.  
Термостаты ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ).  
Аппарат для свертывания питательных сред.  
Шкаф сушильно-стерилизационный.  
Центрифуга 3000g.  
Бусы стеклянные или мешалка магнитная настольная.  
Плитка электрическая.  
Микроскоп бинокулярный.  
Облучатели бактерицидные.  
Лопатки бактериологические платиновые или никелево-хромовые.  
Петли бактериологические.  
Палочки стеклянные.  
Спиртовки или газовые горелки.  
Стандарт мутности оптический.  
Колбы стеклянные плоскодонные на 2 л.  
Флаконы стеклянные на 400 мл.  
Пробки ватно-марлевые для колб и флаконов.  
Пробирки стеклянные.  
Пробки ватные для пробирок.  
Пипетки градуированные – 2,5 и 10 мл или дозаторы автоматические.  
Цилиндр или стакан мерный.  
Лотки эмалированные.  
Пинцеты.  
Индикаторы контроля стерилизации физические, химические, биологические.  
Пробки резиновые,  $d = 12,5$  и  $14,5$  мм.  
Штативы и ящики металлические для пробирок.  
Биксы металлические или ведра с крышками для сброса использованной лабораторной посуды.  
Щетки для мытья яиц.  
Фильтр марлевый.  
Салфетки марлевые.  
Вата медицинская.  
Халаты лабораторные.  
Маски лицевые одноразовые.  
Перчатки одноразовые.  
Передник резиново-клеенчатый.  
Реактивы для окрашивания по методу Циля–Нильсена.  
Пробирки биологические.  
Ингредиенты для питательной среды: однозамещенный фосфорнокислый калий, магний сернокислый, магний лимоннокислый, L-аспарагин, глицерин, лизин, малахитовый зеленый, яйцо куриное, картофель, фасоль, морковь, дезинфектант микобактерицидный.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Питательные среды предназначены для выделения микобактерий туберкулеза из различного материала (мокрота, промывные воды трахеи и бронхов, моча, кал, кровь, плевральный экссудат, цереброспинальная жидкость и др.). Используются как дополнение к традиционной питательной среде Левенштейна–Йенсена, рекомендованной ВОЗ, в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений для микробиологической диагностики туберкулеза (осуществление посева биологического материала и получение чистой культуры микобактерий).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют. Однако следует учитывать, что проведение исследования подразумевает работу с патологическим материалом и чистой культурой возбудителя туберкулеза, поэтому необходимо строгое соблюдение техники безопасности и общего санитарно-гигиенического режима в лаборатории.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

Приготовление питательных сред производят в асептических условиях (приказ МЗ РБ «О состоянии противотуберкулезной помощи населению Республики Беларусь и мерах по ее совершенствованию» от 28.07.92, приложение № 6).

### **1. Плотная питательная яично-овощная среда**

Состав: 0,3 л фильтрата отваров белой фасоли (300 г), картофеля (300 г), моркови (300 г); солевой раствор: калий однозамещенный фосфорнокислый – 0,6 г, магний сернокислый – 0,6 г, магnezия лимоннокислая – 0,15 г, L-аспарагин – 0,9 г, глицерин – 3,0 мл, вода дистиллированная – 300 мл.

Реактивы растворяют в указанной последовательности при слабом подогревании и стерилизуют в автоклаве (при 1,5 атм в течение 30 мин). 12–15 (в зависимости от величины) свежих диетических куриных яиц (не более 7 дней) моют под теплой проточной водой щеткой с мылом, погружают на 30 мин в 70% спирт, а затем в боксе разбивают над спиртовкой в колбу и гомогенизируют.

Приготавливают овощной отвар: фасоль (300 г) замачивают в 1 л дистиллированной воды на 20 ч. Затем доводят объем воды до 2 л и кипятят на малом огне с закрытой крышкой 20 мин. К кипящему отвару добавляют по 300 г картофеля и моркови, нарезанных мелкими кубиками (по 1 см), и продолжают кипятить еще 20 мин.

Горячий отвар пропускают через стерильный марлевый фильтр в стерильный флакон. К 0,5 л яичной массы добавляют 300 мл остывшего стерильного фильтрата, 300 мл солевого раствора и 20 мл 2% малахитового зеленого. Тщательно размешав, полученный раствор пропускают через стерильный марлевый фильтр в стерильный раствор.

Полученную смесь хорошо перемешивают и разливают по 5 мл в пробирки. Свертывание (коагуляцию) производят при 85°C в течение 45 мин, придавая при этом нужный скос. После коагуляции крышку свертывателя не открывают. Пробирки остаются в наклонном исходном положении до полного остывания среды. При этом конденсационная жидкость полностью сохраняется и стекает на скошенную поверхность среза, не контактируя с пробкой. Контроль стерильности каждой серии питательных сред производят инкубацией произвольно выбранных пробирок со средой при 37±1°C в течение 24 ч.

Предлагаемая среда хорошо сворачивается, не отстаёт от стенок пробирок и по внешнему виду (цвету) аналогична среде Левенштейна–Йенсена, что не создаёт трудностей при дифференцировке выросших колоний МБТ. Пробирки с готовой средой сохраняются в целлофановых пакетах при +4°C не более 3 недель.

## **2. Плотная питательная яично-овощная среда с лизином и рибофлавином**

Состав: 300 мл фильтрата отваров белой фасоли (300 г), картофеля (300 г), моркови (300 г); солевой раствор: калий однозамещенный фосфорнокислый – 0,13 г, сернокислый магний – 0,13 г, лимоннокислый натрий – 0,13 г, лизин (Lys) – 1,91 г, глицерин – 38,3 мл, дистиллированная вода – 600 мл.

Реактивы растворяют в указанной последовательности при слабом подогревании и стерилизуют в автоклаве (при 1,5 атм в течение 30 мин). К 0,5 л яичной массы (приготовление см. выше) добавляют по 300 мл солевого раствора и фильтрата овощного отвара. Смесь пропускают через марлевый фильтр, добавляют 20 мл стерильного 2% раствора малахитовой зелени. К готовой смеси перед ее свертыванием добавляют 20 мг витаминной добавки (рибофлавина) на 200 мл среды. Полученную смесь разливают в пробирки по 5 мл. Свертывание (коагуляцию) производят при 85°C в течение 45 мин, придавая при этом нужный скос. После коагуляции крышку свертывателя не открывают. Пробирки остаются в наклонном исходном положении до полного остывания среды. При этом конденсационная жидкость полностью сохраняется и стекает на скошенную поверхность среза, не контактируя с пробкой. Контроль стерильности каждой серии питательных сред производят инкубацией произвольно выбранных пробирок со средой при 37°C в течение 24 ч.

Предлагаемая среда хорошо сворачивается, не отстаёт от стенок пробирок и по внешнему виду (цвету) аналогична среде Левенштейна–Йенсена, что не создаёт трудностей при дифференцировке выросших колоний МБТ. Пробирки с готовой средой сохраняются в целлофановых пакетах при +4°C не более 3 недель.

Посев биологического материала производится параллельно в пробирки с разработанной питательной средой и традиционной, просмотр осуществляется еженедельно (отмечается время появления видимого роста, обильность роста в пробирках, контаминация пробирок и т. д.). Учитывая,

что сроки выделения возбудителя на питательных средах составляют 4-10 недель, окончательный результат получают через 2–2,5 месяца инкубации посевов.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Ошибки обусловлены:

- использованием компонентов среды низкого качества, с истекшим сроком годности, неправильно хранившихся или неправильно приготовленных;
- произвольным уменьшением объема среды в пробирке;
- несоблюдением времени и температуры свертывания, условий и сроков хранения питательной готовой среды;
- отсутствием контроля качества сред (возможна контаминация питательных готовых сред, что не позволит выполнить качественное бактериологическое исследование);
- несоблюдением времени и температуры инкубирования посевов.

Соблюдение условий приготовления питательных сред позволит избежать подобных ошибок.