

# Бактериальный посев мокроты

приготовила: Баймурадова Л  
Приняла: Омарова А.Р

# План:

- 1. Введение
- 2. Основные методы микробиологического исследования
- 3. Золотой стандарт бакпосева
- 4. Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT – 960.
- 5. Заключение
- 6. Список литературы

# Цель работы

- Дать общее понятие о видах диагностики туберкулеза, объяснить как правильно собирать мокроту, цель сбора мокроты и основные методы бакпосева.





До посева



После посева

# Введение.

- На фоне напряженной эпидемической ситуации с заболеваемостью туберкулезом и наличия лекарственно-устойчивых форм *M. Tuberculosis* наиболее актуальными являются ускоренная диагностика туберкулеза и повышение эффективности определения лекарственной чувствительности культур микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам. Выявление МБТ в разном патологическом материале от пациентов – ведущий признак для постановки диагноза заболевания туберкулезной этиологии. Определение лекарственной чувствительности МБТ чрезвычайно важно для характеристики эпидемиологической ситуации, прогнозирования течения туберкулезного процесса у конкретного больного, выбора рациональной схемы противотуберкулезной терапии и правильной оценки эффективности лечения. Самым надежным методом выявления возбудителя туберкулеза в мокроте или в других образцах является метод посева, который позволяет выявить МБТ при наличии в исследуемом материале нескольких сотен жизнеспособных особей.

- Туберкулез является инфекционным заболеванием, основным путем передачи которого является воздушно – капельный, поэтому из всех случаев туберкулеза более чем в 85% поражаются легкие. Туберкулез легких у взрослых в половине случаев имеет открытую (заразную) форму. Задачей специалистов сети ПМСП является скорейшее выявление заразного больного для его лечения и снижение распространения туберкулезной инфекции в окружающей среде. Поэтому у всех пациентов с наличием кашля с мокротой, продолжающегося более 2-х недель и других симптомов туберкулеза (боль в грудной клетке, потеря веса, потливость, кровохарканье длительное повышение температуры тела) необходимо заподозрить туберкулез и обязательно исследовать мокроту микроскопическим методом на наличие МБТ. Данный метод является простым, доступным и эффективным выявления туберкулеза и тем самым будет сделан первый шаг для защиты населения от распространения туберкулеза. Исследования должны быть проведены быстро (2-3 дня), чтобы снизить риск распространения инфекции.

- **Сбор мокроты:**

Для сбора мокроты рекомендуется использовать контейнеры из прочного материала, не пропускающего жидкости (у нас – это одноразовые контейнера из материала который легко утилизировать). Контейнеры должны быть прозрачными с широким горлышком (35 мм в диаметре) с плотно закрывающейся крышкой. Сбор мокроты с диагностической целью должен быть выполнен трехкратно по регламентированным правилам, согласно специальной инструкции. Пациент необходимо объяснить, как правильно собирать мокроту:

1. Мокроту следует собирать в специальной комнате с вентиляцией или на открытом воздухе.
2. Мокроту собирает утром до приема пищи.
3. Предварительно ополоснуть рот кипяченой водой.
4. Откашлять
5. Держать контейнер у самых губ и осторожно выплюнуть в него.
6. Плотно закрыть контейнер крышкой и передать медсестре.

Если мокрота отделяется в скудном количестве, необходимо накануне сбора материала принять отхаркивающие средства.

В случаях неправильного сбора мокроты диагноз может быть выставлен неверно, заболевание будет прогрессировать, и больной будет продолжать распространять инфекцию.

- **Подготовка пациента к бактериологическому посеву мокроты**
- Забор мокроты осуществляют утром натощак. Перед откашливанием больной чистит зубы и полощет рот кипячёной водой. Мокроту для микробиологического исследования следует собрать до начала антибактериальной терапии. Желательно исследовать биоматериал из первой утренней порции.
- При бронхоскопии вводится не более 5 мл физиологического раствора с последующей аспирацией в стерильный контейнер.

- **Шаги сбора мокроты:**

- 1. Одеть спецодежду( халат, колпак, фартук, маску – респиратор, перчатки).
  2. Взять медицинскую форму ТБ 05 у пациента.
  3. Ознакомить пациента с процедурой сбора мокроты (рассказать и попросить прочитать информацию).
  4. Занести данные о пациенте из ТБ 05 в журнал сбора мокроты (левый част журнала).
  5. Отметить имя пациента и номер образца на контейнере (только не на крышке).
  6. Попросить пациента помыть руки, тщательно ополоснуть рот водой, чтобы удалить частицы пищи и загрязняющую микрофлору ротовой полости.
  7. Поставить пациента лицом широко открытому окну.
  8. Встать позади пациента на расстояние не менее 1 метра.
  9. Попросить пациента откашлять 3-5 мл мокроты и наблюдать за выполнением процедуры.
  10. Предложить пациенту плотно закрыть контейнер закручивающейся крышкой и передать медсестре.
  11. Убедиться в правильности закрытия контейнера, обработать его дезинфицирующим раствором и поставить в бикс.
  12. Вымыть руки с мылом под проточной водой и обработать в соответствии с действующей инструкцией.
  13. Выдать пациенту чистый контейнер для сбора мокроты дома утром следующего дня и попросить принести контейнер в кабинет сбора мокроты.
  14. Предупредить пациента о необходимости сдачи третьего образца мокроты в кабинете сбора мокроты.
  15. Отметить в журнале по сбору мокроты проведение процедуры (правый часть журнала) и отметить в ТБ 05 идентификационный номер образца.

- **Транспортировка и хранение мокроты:**

Для транспортировки в лабораторию контейнеры с мокротой устанавливают в маркированный металлический бикс. Мокрота доставляется в лабораторию в течение суток, допускается хранение мокроты в медицинской организации до семи дней в холодильнике. К биксу прилагают сопроводительный документ, в котором приводят сведения о пациентах и пробах. Номер на каждом контейнере должен соответствовать идентификационному номеру в списке. При транспортировке биксы хранят в прохладном месте, защищенном от прямых солнечных лучей. Транспортировку мокроты осуществляют на транспорте медицинской организации в сопровождении медицинского работника. Бланки направлений на лабораторное исследование должны находиться отдельно от контейнеров в материале.

Таблица 3

**Результаты исследований проб мокроты больных туберкулезом людей с использованием сред различных вариантов**

№ варианта	Содержание геотермальн. воды, %	Количест. проб	Сроки появления первичного роста	Количест. проб с ростом	Колич. проб с ростом через...сут		% выдел. штамм.
					20	27	
<b>1</b>	<b>62,5</b>	<b>10</b>	16	4	5	5	50,0
<b>2</b>	<b>75,0</b>	<b>10</b>	16	2	3	3	30,0
<b>3</b>	<b>87,5</b>	<b>10</b>	13 (1)	5	6	6	60,0
<b>4</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	16	3	3	3	30,0
<b>Финн II</b>		<b>10</b>	16	2	4	4	40,0
<b>Левенштейна-Йенсена</b>		<b>10</b>	17	1	2	4	40,0

- **Бактериологический посев мокроты** — тест используется для диагностики этиологического агента при инфекциях нижних дыхательных путей и диагностики туберкулеза легких. Из-за того, что мокрота часто загрязнена нормальной ротоглоточной флорой, присутствие этиологического агента трудно определить.
- После идентификации этиологического агента определяется его чувствительность к антибиотикам.

# Бактериоскопия и посев мокроты

- Для бактериоскопического исследования предварительно готовят препарат. Вначале растирают комок мокроты между двумя предметными стёклами; затем высохший мазок фиксируют над пламенем горелки и окрашивают: для поисков микобактерий туберкулёза по Цилю-Нильсену, в других случаях — по Грамму.
- Чувствительность бактериоскопического метода напрямую зависит от кратности обследования пациента. Например, согласно исследованиям, однократный анализ мокроты на микобактерии туберкулёза имеет чувствительность 80-83%, двукратный анализ мокроты (в течение двух дней) — на 90-93% больше и при исследовании трёх проб мокроты (в течение трёх дней) — 95-98%. Таким образом, при подозрении на туберкулез органов дыхания необходимо исследовать не менее трёх проб мокроты.
- Отрицательный результат микроскопического исследования не исключает диагноз той или иной инфекции, так как мокрота пациента может содержать меньше микробов, чем может выявить микроскопическое исследование.
- Когда бактериоскопическое исследование не обнаруживает предполагаемого возбудителя, прибегают к посеву мокроты на питательные среды. Посев мокроты производят не позднее 2-х часов после сбора. Если подозревается туберкулёз, то сбор мокроты осуществляют в течение 3-х последовательных дней.
- Бактериологическое исследование позволяет идентифицировать вид микробов и определять их антибиотикочувствительность.
- Обычно у здоровых лиц в мокроте при посеве выявляются альфа-гемолитический стрептококк, *Neisseria spp.*, дифтероиды. Обнаружение лишь нормальной микрофлоры ещё не означает отсутствие инфекции. Результат посева следует интерпретировать с учётом клинической картины и общего состояния пациента.
- Критерием этиологической значимости возбудителя будет выявления микроба в концентрации  $10^6$  в 1 мл и выше. Но к выявлению микобактерий туберкулёза в любом количестве следует относиться со всей серьёзностью.

- Первостепенной потребностью фтизиатров является сокращение времени получения результатов культурального исследования. Методом посева на плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена (ЛИ), являющимся «золотым стандартом» детекции микобактерий в практических лабораториях, видимый рост МБТ можно получить в лучшем случае на 28 – 32 день с момента посева, а средними сроками для выделения культуры являются 6 - 10 недель. С момента выделения культуры требуется ещё не менее 24 дней для определения лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций.
- Длительные сроки получения результатов, обусловленные медленным ростом микобактериальной популяции, являются основным недостатком традиционных методов определения лекарственной чувствительности МБТ. На практике это означает, что химиотерапия больного туберкулезом в течение первых 2 – 3 месяцев проходит как бы «вслепую», без учета чувствительности выделенных у больного МБТ к противотуберкулезным препаратам. На плотных средах ЛИ методом абсолютных концентраций тестирование на лекарственную чувствительность МБТ занимает от 45 до 90 дней с момента посева, что удлиняет сроки лечения больного и увеличивает стоимость .

# РОСТ МИКОБАКТЕРИЙ НА СРЕДЕ ЛЕВЕНШТЕЙНА-ЙЕНСЕНА



*Kolonije Mycobacterium tuberculosis na čvrstoj Löwenstein-Jensen podlozi.*



## Степень положительного результата посева

- До 10 – указывается точное количество колоний
- 10-100 колоний +
- Более 100 колоний ++
- Сплошной рост +++

# Посев материала на питательные среды.

- Материал сеют на жидкие и твердые питательные среды. Международной является питательная среда Левенштейна-Йенсена.
- Рост МБТ происходит на 15-25 дни от момента посева.

- Получение чистой культуры МБТ позволяет посредством биохимических методик отличить МБТ от других микобактерий, определить их жизнеспособность, вирулентность и чувствительность к лекарственным препаратам.
- Можно также оценить бактериовыделение:  
**скудное** – до 10 колоний на среде;  
**умеренное** - от 10 до 50; **обильное** – более 50 колоний.

# Применение автоматизированного комплекса ВАСТЕС MGIT - 960.

- Регистрирует рост МБТ и определяет чувствительность к ХП на основе флюоресценции.
- В аппаратах такого типа жидкая питательная среда содержит меченную  $^{14}\text{C}$  пальмитиновую кислоту. Специальный сенсор улавливает признак роста МБТ по выделению  $^{14}\text{C}$  уже через 10-12 дней или раньше.
- Другой принцип основан на поглощении кислорода в процессе роста МБТ. Уменьшение концентрации кислорода в закрытой камере активирует флюоресцентный индикатор, который начинает светиться в ультрафиолетовых лучах.

# Ускоренные методы выявления возбудителя

## Культуральные

Культивирование на жидких питательных средах с автоматической регистрацией роста культуры

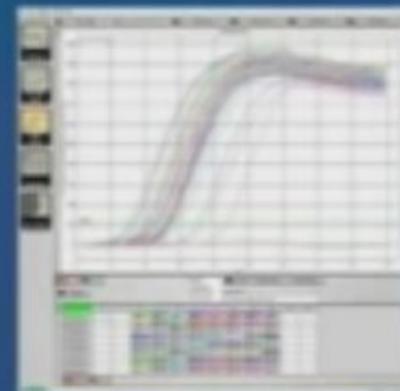
**Bactec MGIT 960 7-14 дней**



## Молекулярно-генетические

Выявление ДНК возбудителя в диагностическом материале

**ПЦР 1-2 дня**



# Группы пациентов, которым показан данный вид исследования:

- впервые выявленные больные туберкулезом (однократно до начала химиотерапии);
- больные с рецидивом туберкулеза (однократно до начала химиотерапии);
- больные с менингитом (однократно до начала химиотерапии);
- больные с распространенным и остро прогрессирующим процессом (однократно до начала химиотерапии);
- дифференциально-диагностические больные (если необходимо, однократно);
- контроль химиотерапии.

- Исследованию данным методом подлежит следующий патологический материал: - мокрота;
  - спинномозговая жидкость;
  - экссудаты;
  - операционный материал.

Не исследуются кровь и моча.

Вначале проводится исследование патологического материала на наличие МБТ люминисцентным методом, затем, в случае положительного результата, проводится анализ с использованием жидких питательных сред и прибора ВАСТЕС MGIT-960.

- Автоматизированная система позволяет получить результаты уже на 5-12-е сутки от момента посева диагностического материала. Однако, этот способ, будучи самым быстрым, одновременно является и наиболее дорогостоящим.
- Прямой метод определения ЛУ с использованием среды Попеску позволяет получить результат в среднем на 20-25-й день от момента посева в отличие от 40-60-х дней, необходимых для получения результата при использовании традиционного метода абсолютных концентраций

- Принципиально новый уровень бактериологической диагностики туберкулеза достигнут внедрением в практику автоматизированных систем бульонного культивирования для ускоренного выявления микобактерий ВАСТЕС MGIT 960 (“Becton Dickinson”) и MB/VacT (“Organon Teknika”), позволяющих выявлять рост культуры в диагностическом материале в течение 10 – 20 дней .
- Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960 зарекомендовала себя надежным методом микробиологической диагностики туберкулеза как в мире, так и во многих регионах . Эталонные исследования эффективности использования автоматизированных систем культивирования на жидких питательных средах ВАСТЕС MGIT 960 и их преимуществ по сравнению с традиционным методом посева на плотные среды проведены в Московском городском научно - практическом Центре борьбы с туберкулезом под руководством доктора медицинских наук В. И. Литвинова .

- По данным зарубежных исследователей, в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 удалось получить примерно на 2,2 – 4% больше изолятов МБТ из образцов мокроты, чем на плотной среде ЛЙ . Внедрение в практику бактериологических систем типа ВАСТЕС MGIT 960 позволило сократить сроки выделения культуры МБТ. В среднем период культивирования образца на ВАСТЕС MGIT 960 составил 11 - 15, на плотной среде – 20 - 28 дней .
- Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960 позволила за относительно короткий период времени – в среднем за 2 недели – исследовать выделенные культуры микобактерий туберкулеза на чувствительность к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда, в том числе к пиразинамиду . Традиционным для определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) к основным ПТП в России являлся метод абсолютных концентраций на плотной среде ЛЙ . Система ВАСТЕС MGIT-960 показывала значительное совпадение результатов тестирования чувствительности МБТ к антибактериальным препаратам с результатами, полученными методом абсолютных концентраций. Для рифампицина и изониазида совпадение данных о наличии чувствительных или резистентных форм МБТ составило 98,5 и 98,25% соответственно, для стрептомицина - 97,26, для этамбутола - 93,77%. При этом сроки получения результатов теста ЛЧ в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 составили от 4 до 13, тогда как по методу абсолютных концентраций – от 21 до 26 суток, что очень важно для своевременного и правильного выбора схемы противотуберкулезной терапии .

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 
- Балабанова Я.М. и др. Использование автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 в диагностике лекарственной устойчивости к резервным препаратам в г. Самара // Туберкулез и болезни легких. 2009. №9. С.63-70.
- Быкдарова К.Р. и др. Автоматизированная система ускоренной культуральной диагностики туберкулеза // Материалы VII Российского съезда фтизиатров. М., 2003. С.82
- Диагностика и химиотерапия туберкулеза органов дыхания: Пособие для врачей. М.: Медицина и жизнь, 2003. 48с.
- Иртуганова О.А. и др. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием автоматизированных систем ВАСТЕС MGIT 960 и МВ/ВАСТ // Пробл. туб. 2002. № 1. С. 58 – 62.
- Иртуганова О. А. и др. Определение чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к пипразинамиду на бактериальном анализаторе ВАСТЕС 960 // Пробл. туб. 2003. № 7. С. 40 – 42.
- Кондратюк Н.В. и др. Порівняльна характеристика медикаментозної чутливості штамів *Mycobacterium tuberculosis* // Мікробіол. ж. 2006. Vol. 68, № 4. С. 54-59
- Лабораторная диагностика туберкулеза / Под ред. В. И. Литвинова, А. М. Мороза. М.: МНПЦБТ, 2001. 184с.
- Малахов В.Н. и др. Качество бактериологического выявления и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза участниками федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований в 2002 – 2003 гг. // Пробл. туб. 2005. № 4. С. 6 – 10.
- О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации: Приказ МЗ РФ №109 от 21.03.2003.
- [Augustynowicz-Kopeć E.](#), [Jaworski A.](#), [Zwolska Z.](#) Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis // [Pneumonol Alergol Pol.](#) 2002; 70(9-10):450-7.
- Chien H.P. et al. Comparison of the ВАСТЕС MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2000 9:866-870.
- Laboratory Services in Tuberculosis Control. Geneva, WHO. 1998.
- [Lee J.J.](#) et al. Comparative evaluation of the ВАСТЕС MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria //

# Заключение

- По данным авторов, чувствительность автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 по выделению культур МБТ оказалась на 10% выше традиционного способа посева на среду ЛЙ. Система ВАСТЕС MGIT 960 продемонстрировала также более высокую высеваемость МБТ из бактериоскопически негативного материала, примерно на 15%, по сравнению с плотными средами. Для бактериоскопически позитивного материала чувствительность жидких и плотных сред для культивирования оказалась идентичной .