

УДК 616-002.5-078.814

УСОВЕРШЕНСВОВАНИЕ ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

О.Е. Кузнецов

Гродненский государственный медицинский университет,
Областная клиническая больница, Гродно, Беларусь



Кузнецов Олег Евгеньевич – заведующий
клинико-диагностической
лабораторией УОЗ «Гродненская
областная клиническая больница»,
соискатель кафедры фтизиатрии и
профпатологии ГГМУ. e-mail:
olegkuznetsov@inbox.ru

Изучалась клиническая и практическая эффективность плотной яично-овощной питательной среды и способа замораживания среды в отношении роста чистой культуры микобактерий туберкулеза H_3RV , и мокроты бактериовыделителей.

Доказано, что использование предлагаемой плотной яично-овощной питательной среды позволяет снизить стоимость бактериологического исследования в 2,5-3,5 раза без ухудшения качества исследования, а применение способа замораживания и оттаивания действительно позволяет ускорить рост МБТ, что приведет к повышению эффективности бактериологической диагностики туберкулеза. Способ прост в исполнении, эффективен и может быть использован в любой фтизиатрической клинике.

Ключевые слова: плотная питательная среда, микобактерии туберкулеза, замораживание, яично-овощная.

Clinical and practical efficiency of thick egg-vegetable nourishing medium and method of medium freezing in respect of the growing of clean culture of micobacterium tuberculosis H_3RV , and wiled MT were studied.

It was proved that the use of proposed thick egg-vegetable nourishing medium allows to reduce a bacteriological study cost 2,5-3,5 times as cheap without worsening the quality of study, and using the method of freezing and thawing really allows to accelerate the growing of MT that will lead to raising efficiency of bacteriologic diagnostics of TB. The method is easy in performance, efficient and can be used in any phthisiology clinic.

Key words: thick nourishing medium, mycobacterium tuberculosis, freezing, egg-vegetable.

Трудности выделения микобактерий туберкулеза (МБТ) из патологического материала связаны с биологическими особенностями возбудителя (медленный рост), а также со снижением жизнеспособности микобактерий в результате применения антибактериальных препаратов для лечения туберкулеза и различных методов обработки при посеве материала [1, 6, 8, 9, 10, 11]. В настоящее время существует большое количество питательных сред для культивирования микобактерий [8, 9, 10, 11, 14, 15, 19]. Однако именно большое количество питательных сред, предлагаемых для выделения микобактерий туберкулеза из патологического материала, говорит о том, что среды далеко не всегда отвечают необходимым требованиям [4, 5, 13,].

Известны среды Гельберга, «Новая» (Г.Мордовского), Левенштейна-Йенсена, Финн-П [10, 15, 19, 20]. Недостатком данных сред является трудоемкость их производства и высокая стоимость.

Целью работы явилось создание более дешевой питательной среды с сохранением качества исследования и ускорение роста микобактерий туберкулеза.

Поставленная задача решается путем создания яично-овощной плотной питательной среды следующего состава: 300 мл фильтрата отваров белой фасоли (300 г), картофеля (300 г), моркови (300 г), 300 мл солевого раствора, состоящего из калия однокзамещенного фосфорнокислого – 0,6 г, магнeзии сернокислой – 0,06 г, магнeзии лимоннокислой – 0,15 г, L-аспарагина – 0,9 г, глицерина – 3,0 мл, воды

дистиллированной – 300 мл, т.е. концентрация солевого раствора в 2 раза меньше, чем в прототипе, 10 цельных яиц и 20 мл 2% малахитовой зелени.

При подборе ингредиентов для предлагаемой питательной яично-овощной среды исходили из того, чтобы обеспечить нужное количество и качество белкового состава за счет фасоли и яиц, углеводов за счет картофеля и витаминов за счет моркови [1, 2, 5, 7, 10, 12, 13, 15, 16].

Предлагаемая среда хорошо сворачивается, не отстает от стенок пробирок и по внешним свойствам (цвет) напоминает среду Левенштейна-Йенсена, что положительно сказывается на работе: не создает никаких трудностей при дифференцировке выросших колоний МБТ. Кроме того, приготовленный фильтрат отваров белой фасоли, картофеля и моркови может храниться при t=0-4°C в течение 3-х месяцев, не меняя своих свойств.

Были проведены сравнительные испытания в отношении роста МБТ яично-овощной среды и среды Левенштейна-Йенсена. Провели 22 сравнительных посева чистой культуры *M. Tuberculosis* (H₃₇RV) на яично-овощную среду и на среду Левенштейна-Йенсена. Было установлено, что чистая культура МБТ растет на яично-овощной среде так же хорошо, как и на среде Левенштейна-Йенсена (75% роста на 7-ой день, 100% роста на 8-ой день инкубации). Цвет и форма колоний МБТ на обеих средах идентичны друг другу. Массивность роста оценивалась по 3 балльной системе (в плюсах) и отражена в таблице 1.

До 20 колоний МБТ на поверхности среды +, выраженный рост ++, сплошной рост по поверхности среды +++.

Было произведено 80 сравнительных посевов мокроты от пациентов, страдающих туберкулезом (бактериовыделителей) [18, 19, 20], и установлено следующее:

- скорость первичного роста МБТ на испытуемой яично-овощной среде идентична скорости первичного роста МБТ на среде Левенштейна-Йенсена;

- рост во всех пробирках на обеих средах идентичен друг другу и одновременен.

Для ускорения роста МБТ было решено использовать простой и доступный способ, включающий в себя замораживание и оттаивание среды. Способ осуществляют следу-

ющим образом: разлитую по пробиркам и свернутую среду Левенштейна-Йенсена замораживают в морозильной камере бытового холодильника при температуре минус 10-12°C в течение 16-20 часов. Полноту замораживания среды контролируют визуально. Затем среду оттаивают при комнатной температуре в течение 2-2,5 часов до полного оттаивания, после чего сразу производят посев исследуемого материала.

Время замораживания 16-20 часов обосновано тем, что за меньшее время не достигается полное замораживание среды.

Для контрольных исследований использовали не подвергавшуюся замораживанию среду Левенштейна-Йенсена той же серии приготовления.

Посев чистой культуры МБТ, мокроты бактериовыделителей производили одновременно в 2 пробирки с опытной и 2 пробирки с контрольной средой. Контроль посевов осуществляли ежедневно. Массивность роста оценивали по 3 балльной системе (в плюсах). До 20 колоний МБТ на поверхности среды +, выраженный рост МБТ ++, сплошной рост по поверхности питательной среды +++.

Выращивание МБТ вели в термостате при t=37° до 2,5 месяцев. При отсутствии роста к этому времени посев считали отрицательным, и пробирки удаляли.

Полученные результаты отражены в таблицах 2-4.

В таблице 2 показана частота и сроки выделения МБТ на контрольной и опытной (предваритель-

Таблица 1.

Среда	7 день инкубации	8 день инкубации
Кузнецова	++	+++
Левенштейна-Йенсена	-, +	+,+++

Таблица 2.

Среда Левенштейна-Йенсена	До 10 дней	До 20 дней	До 30 дней	До 45 дней
Опытная	8	60	24	-
Контрольная	-	48	20	16

Таблица 3.

Среда Левенштейна-Йенсена	Число исследованных проб	Срок появления роста МБТ, сут.
Опытная	92	15,52±0,63 (8-30 сутки)
Контрольная	84	22,7±0,68 (14-43 сутки)

Таблица 4.

Среда Левенштейна- Йенсена	До 10 дней	До 20 дней	До 30 дней	До 45 дней
Опытная	+	++	+++	>
Контрольная		+	++	+++

но замороженной и оттаянной) среде Левенштейна-Йенсена.

Из таблицы видно, что выделение культуры в срок до 10 дней произошло в 8 случаях (87%) в опытной группе и не выявлено в контрольной группе ($P < 0,05$). До 20 дней 73,9% и 57,1% соответственно ($P < 0,05$). Из 104 посевов рост культуры в опытной группе получили в 92 случаях, в контрольной в - 84. Таким образом, предварительное замораживание и оттаивание среды Левенштейна-Йенсена способствовало более раннему росту МБТ в срок до 20 дней.

В таблице 3 отражена скорость появления роста МБТ на контрольной и опытной (предварительно замороженной и оттаянной) среде Левенштейна-Йенсена.

В таблице 4 показана массивность роста МБТ в сравниваемых средах.

По данным таблицы 3 можно сделать вывод о более интенсивном росте МБТ на опытной среде.

Таким образом, предлагаемая плотная яично-овощная среда обеспечивает культивирование МБТ аналогично среде Левенштейна-Йенсена, и при этом стоимость яично-овощной питательной среды в 2,5-3,5 раза ниже стоимости среды Левенштейна-Йенсена. Предлагаемый способ ускорения роста микобактерий путем замораживания и оттаивания действительно позволяет ускорить рост МБТ, что приведет к повышению эффективности бактериологической диагностики туберкулеза. Способ прост в исполнении, эффективен и может быть использован в любой фтизиатрической клинике.

Литература

1. Балаклеевская. А.А. Влияние некоторых биологически активных веществ на рост и развитие туберкулезных микобактерий: Автореф. дисс. к.м.н. - Мн., - 1970.
2. Владимирский М.А. Иммунологические и биотехнологические методы в повышении эффективности диагностики и лечения туберкулеза: Автореф. дисс. доктора мед. наук. - М., 1993.
3. Врублевская Н.И., Гельберг И.С., Тис А.А., Леднева И.С. // Биохимические механизмы эндогенной интоксикации: материалы 2-го съезда Белорусско-российского симпозиума. - Гродно, 1997 - С.23.
4. Галинская. Л.А. Лабораторные методы // Туберкулез: лечение и профилактика. - Ростов-на-Дону, 2000. - С. 33-35.
5. Гончарова. З.К. Использование бинарных антисептиков в со-

ставе яичной питательной среды Левенштейна-Йенсена для повышения ее антиконтаминационных свойств: Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Алма-Ата, 1989.

6. Гуревич Г.Л., Суркова Л.К., Скрыгина и др. Клинико-морфологическая характеристика, диагностика и лечение остро прогрессирующих форм туберкулеза легких в современных условиях: Метод. рекомендации. - Мн., 2001. - 38 с.
7. Доля В.М. Полиэнзимный витаминно-минеральный комплекс «Грофосан» // Практическое руководство по энзимотерапии. - Мн., - 2000.
8. Драбкина Р. Метаболизм микобактерий туберкулеза // Микробиология туберкулеза. - М., 1963. - С. 11-19.
9. Драбкина Р. Морфология и цитология микобактерий туберкулеза // Микробиология туберкулеза. - М., 1963 - С. 5-11.
10. Драбкина. Р. Бактериологические методы. Наиболее употребительные питательные среды // Микробиология туберкулеза. - М., 1963. - С. 91-100.
11. Драбкина. Р. Биохимия микобактерий туберкулеза // Микробиология туберкулеза. - М., 1963. - С. 19-36.
12. Зайцев В.В. Способ получения питательной среды для выращивания аэробных бактерий // Гос. акад. вет. медицины. - Витебск.
13. Позняк. С.Б. Устойчивые к ГИНК мутанты БЦЖ, оптимальный способ получения и их специфическая активность: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. - М., 1983.
14. Рудой Н.М. Культуральные методы выявления микобактерий туберкулеза // Туберкулез и бацилловыделение. - М., 1975. - С. 26-38.
15. Рудой Н.М. Питательные среды // Туберкулез и бацилловыделение. - М., 1975. - С. 39-47.
16. Каченко А. Усовершенствование питательной среды Левенштейна-Йенсена для культивирования микобактерий // Вет. мед. Украины. - 1998. - № 8. - С. 19.
17. Финкель Е.А., Погребинская. Ю.Б. Питательные среды для культивирования микобактерий туберкулеза // Сухие питательные среды для диагностики туберкулеза. - Фрунзе, 1977. - С. 6-19.
18. Финкель Е.А., Погребинская. Ю.Б. Питательные среды для определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // Сухие питательные среды для диагностики туберкулеза. - Фрунзе, 1977. - С. 58-69.
19. Финн Р.Э. Пути повышения высеваемости и ускорения роста микобактерий туберкулеза в современных условиях их изменчивости: Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. - Кишинев, 1973.
20. Школьникова Е.А. Глубинный метод посева на туберкулез непосредственно из патологического материала // Проблемы туберкулеза. - 1948. - № 6. - С. 63-69.

Resume

IMPROVEMENT OF THICK NOURISHING MEDIUM FOR GROWING MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

O. Kuznetsov

The Grodno State Medical University

Regional Clinical Hospital. Grodno. Belarus

The study of a thick egg-vegetable nourishing medium proves that the medium provides a cultivating MT similarly to Levenshtein-Yensen medium. The cost of the egg-vegetable nourishing medium is 2,5-3,5 times as less than the cost of the Levenshtein-Yensen medium. Proposed method of speedup of growing micobacteria of tuberculosis by freezing and thawing, really allows to accelerate a growing MT that will result in the raising efficiency of bacteriological diagnostics of tuberculosis.