

# Пути снижения уровня контаминации биологического материала при посеве на плотные питательные среды, используемые для выделения микобактерий туберкулезного комплекса

И.В.Сидоров<sup>1</sup>, Р.А.Шарипов<sup>2</sup>, Ш.Э.Булатов<sup>1</sup>, Л.Р.Галеева<sup>1</sup>, Д.Р.Гадельмурзина<sup>1</sup>, Р.Н.Исламов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер», Уфа, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация;

Одной из наиболее значимых проблем в бактериологической диагностике туберкулеза и микобактериозов, вызываемых медленно растущими микобактериями, остается контаминация посевов клинического материала на питательных средах посторонней быстрорастущей сапрофитной бактериальной микрофлорой и микроскопическими грибами, населяющими верхние дыхательные пути, ротовую полость и другие нестерильные биотопы организма человека. Это влечет за собой выбраковку контаминированных посевов и невозможность дальнейшей работы с ними, приводит к задержкам, а в некоторых случаях и к невозможности получения врачом-клиницистом своевременной и полной информации о результатах микробиологического исследования клинического материала, затрудняет постановку и верификацию диагноза, что, в свою очередь, неизменно отражается на качестве лечения.

**Цель.** Изучить возможность применения поливалентного бактериофага и противогрибкового препарата в качестве эффективных деконтаминирующих агентов при посеве образцов клинического материала на плотные среды.

**Материалы и методы.** В исследовании были использованы образцы клинического материала (мокрота). В качестве дополнительного деконтаминирующего агента использовали смесь поливалентного бактериофага и антимикотика. Накопление и изучение свойств культур микроорганизмов осуществлялось классическим культуральным методом на специальных и дифференциально-диагностических питательных средах и методом световой микроскопии окрашенных микропрепаратов.

**Результаты.** Исследование продемонстрировало возможность использования препаратов, обладающих антибактериальным и антимикотическим эффектом, для снижения уровня контаминации засеваемых образцов биологического материала при выделении культур *Mycobacterium tuberculosis* complex. Были получены убедительные данные, свидетельствующие о высокой эффективности в отношении наиболее значимых контаминационных агентов антимикотического препарата Амфотерицин В и поливалентного бактериофага.

**Ключевые слова:** туберкулез, микобактерии туберкулезного комплекса, деконтаминация, диагностика туберкулеза, контаминирующая микрофлора, скорость роста микобактерий

**Для цитирования:** Сидоров И.В., Шарипов Р.А., Булатов Ш.Э., Галеева Л.Р., Гадельмурзина Д.Р., Исламов Р.Н. Пути снижения уровня контаминации биологического материала при посеве на плотные питательные среды, используемые для выделения микобактерий туберкулезного комплекса. Бактериология. 2025; 10(1): 87–90. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-87-90

## Ways to reduce the level of contamination of biological material samples when seeding on solid nutrient media used to isolate mycobacteria of the tuberculosis complex

I.V.Sidorov<sup>1</sup>, R.A.Sharipov<sup>2</sup>, Sh.E.Bulatov<sup>1</sup>, L.R.Galeeva<sup>1</sup>, D.R.Gadel'murzina<sup>1</sup>, R.N.Islamov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Republican Clinical Tuberculosis Dispensary, Ufa, Russian Federation;

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

Contamination of clinical seed material on culture media by extraneous fast-growing saprophytic bacterial microflora and microscopic fungi inhabiting the upper respiratory tract, oral cavity and other non-sterile biotopes of the human body remains one of the most significant problems in the bacteriological diagnosis of tuberculosis and mycobacteriosis caused by slow-growing mycobacteria. This entails the culling of contaminated specimens and the impossibility of further work with them, leads to delays, and in some cases, the inability of a clinician to receive timely and complete information about the results of microbiological examination of clinical material, complicates the formulation and verification of the diagnosis, which in turn invariably affects the quality of treatment.

### Для корреспонденции:

Сидоров Игорь Вячеславович, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Адрес: 450080, Уфа, ул. Сагита Агиша, 4  
Телефон: (347) 284-29-50

Статья поступила 25.09.2024, принята к печати 31.03.2025

### For correspondence:

Igor V. Sidorov, bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Address: 4 Sagit Agish str., Ufa, 450080, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-00-00

The article was received 25.09.2024, accepted for publication 31.03.2025

**The purpose of the work** is to study the possibility of using a polyvalent bacteriophage and an antifungal drug as effective decontaminating agents when inoculating samples of clinical material on solid media.

**Materials and methods.** The study used specimens of clinical material (sputum). A mixture of a polyvalent bacteriophage and an antimycotic was used as an additional decontaminating agent. The accumulation and study of the properties of microorganism cultures was carried out by the classical cultural method on special and differential diagnostic nutrient media and by the method of light microscopy of stained micropreparations.

**The results** of this research demonstrated the possibility of using substances with antibacterial and antimycotic effects in order to reduce the level of contamination of inoculated specimens of biological material in order to isolate *Mycobacterium tuberculosis* complex culture. Convincing data were obtained indicating high efficacy against the most significant contaminating agents of the antimycotic drug Amphotericin B and the polyvalent bacteriophage.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, decontamination, diagnosis of tuberculosis, contaminating microflora, growth rate of mycobacteria

**For citation:** Sidorov I.V., Sharipov R.A., Bulatov Sh.E., Galeeva L.R., Gadel'murzina D.R., Islamov R.N. Ways to reduce the level of contamination of biological material samples when seeding on solid nutrient media used to isolate mycobacteria of the tuberculosis complex. Bacteriology. 2025; 10(1): 87–90. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-87-90

**В** структуре микроорганизмов, являющихся наиболее значимыми с точки зрения опасности контаминирования посевов факторами, преобладающими являются бактерии родов *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella* и некоторые другие; среди грибковой микрофлоры – *Candida* spp., *Aspergillus* spp. и некоторые другие [1]. Помимо этого, заметную негативную роль играет необеспечение (или невозможность обеспечения) асептических условий при получении проб стерильных видов биоматериалов. Основной исследуемый во фтизиатрической практике биоматериал, мокрота, исходно содержит большое количество слизи, имеет высокую вязкость и интенсивное обсеменение сопутствующей грибово-бактериальной микрофлорой ротовой полости и верхних отделов дыхательных путей. Схожими недостатками обладают образцы биоматериала и из других нестерильных биотопов организма человека. Посторонняя микрофлора, размножаясь гораздо интенсивнее, чем микобактерии, быстро покрывает поверхность питательных сред и истощает их, что резко снижает вероятность роста и обнаружения колоний микобактерий [2]. Это приводит к снижению интенсивности роста микобактериальной культуры на питательных средах для их культивирования, что затрудняет постановку теста лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Особое значение данный фактор имеет при попытках выделить микобактерии из клинического материала, получаемого инвазивными методами, например при бронхоскопии, плевральных пункциях, оперативных вмешательствах и др. Поэтому для повышения эффективности культурального метода обнаружения микобактерий в клиническом материале образцы обязательно подвергаются процедуре гомогенизации и деконтаминации. С этой целью перед посевом применяются 3%-й раствор серной кислоты, 4%-й раствор едкого натра (модифицированный метод Петрова) или 10%-й раствор  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Однако обработка кислотой или щелочью, наряду с задержкой роста сапрофитной контаминантной микрофлоры, одновременно в довольно высокой степени ингибирует рост микобактерий [6]. Сегодня во многих бактериологических лабораториях туберкулезного профиля применяется метод гомогенизации и деконтаминации с использованием N-ацетил-L-цистеина (NALC-NaOH), который обеспечивает эффективное разжижение вязких образцов клинического материала. Гидроксид натрия является эффективным деконтаминантом. Цитрат натрия связывает ионы тяжелых металлов. Сниженная концентрация гидроксида натрия способствует лучшей выживаемости микобактериальной

популяции, однако при этом интенсивность подавления роста контаминирующей микрофлоры также снижается [7]. Помимо общепринятых методов деконтаминации, предлагаются альтернативные, в частности, на основе щавелевой кислоты, хлоргексидина и других субстратов [8, 9].

Следует отметить, что на диагностическую ценность любого лабораторного исследования, в т.ч. посева на жидкие и плотные питательные среды с целью обнаружения микобактерий, в значительной степени влияет ряд факторов. На преаналитическом этапе, на который приходится до 75% ошибок [3], это правильность сбора материала пациентом, соблюдение асептики при заборе стерильных материалов, режим и сроки его хранения и транспортировки до доставки в лабораторию и др. [4]. На этапе аналитическом – выбраковка некачественных образцов клинического материала, используемые деконтаминанты и режим деконтаминации, достаточность гомогенизации материала, состав используемых питательных сред, объем инокулируемого материала и др.

На сегодняшний день культуральный метод, основывающийся на выделении чистой культуры микобактерий из клинического материала, все еще остается золотым стандартом и является основным в лабораторной диагностике туберкулеза, в основном вследствие его относительной дешевизны и доступности для любой бактериологической лаборатории фтизиатрического профиля, что дает возможность определения культуральных свойств микобактерий, облегчает идентификацию видовой принадлежности.

Для культивирования микобактерий в клинической практике применяются как плотные (на яичной или агаровой основе), так и жидкие питательные среды. Оба метода посева имеют свои достоинства и недостатки. Применение жидких сред с использованием системы BactecMGIT 960 в сравнении с посевом на плотные питательные среды позволяет получить результат в более ранние сроки, при этом показатель положительных результатов примерно вдвое выше [5]. Однако использование жидких сред для посева клинического материала имеет свои ограничения. В частности, невозможно оценить культуральные признаки микобактерий; на жидких питательных средах более выражен рост сопутствующей бактериальной и грибковой микрофлоры, что влечет за собой более высокий удельный вес посевов, подлежащих выбраковке. В связи с этим сохраняется актуальность использования в рутинной практике специальных плотных питательных сред для получения изолированных колоний и культурально-го обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* complex.

**Цель исследования** – изучить возможность применения поливалентного бактериофага и противогрибкового препарата в качестве эффективных деконтаминирующих агентов при посеве образцов клинического материала на плотные среды.

### Материалы и методы

Исследование проводили на базе ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан.

В исследование были включены посевы на плотную питательную среду Левенштейна–Йенсена для культивирования микобактерий. Исследуемый клинический материал ( $n = 314$ ) был представлен мокротой. Перед посевом образцы клинического материала гомогенизировали раствором NALC-NaOH. К исследуемому материалу добавлялся раствор NALC-NaOH в соотношении 1:1, производилось перемешивание на шейкере в течение 15 мин, затем центрифугирование при 3000 г в течение 15 мин. Надосадочная жидкость сливалась, а полученный осадок приблизительно в равных объемах вносился в две пробирки на поверхность скошенной питательной среды Левенштейна–Йенсена.

В одну из пробирок (опытная группа) непосредственно перед посевом вносили деконтаминирующий агент в количестве 0,5 мл, представляющий собой смесь препарата «Пиобактериофаг комплексный» и противогрибкового препарата Амфотерицин В (приготовленного в соотношении 50 мг антимикотика на 100 мл поливалентного бактериофага). «Пиобактериофаг комплексный» (НПО «Микроген», Россия) включает смесь стерильных очищенных фильтратов фаголизатов бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и энтеропатогенных *Escherichia coli*. Общее число посевов составило 628.

Просмотр пробирок на наличие роста колониеобразующих единиц производился еженедельно через 30 дней после посева. В образцах, где был обнаружен рост микроорганизмов на поверхности питательной среды, оценивали культуральные свойства выросших культур, а также методом световой микроскопии просматривали препараты, окрашенные по методу Циля–Нильсена, с целью определения чистоты культуры.

### Результаты исследования и их обсуждение

Полученные в результате анализов данные свидетельствуют об относительной эффективности применения деконтаминирующей смеси («Пиобактериофаг комплекс-

ный» + Амфотерицин В) в отношении снижения частоты случаев роста посторонней микрофлоры при посевах клинического материала на плотные питательные среды. Помимо этого, наблюдается некоторое (в данном случае статистически незначимое) увеличение частоты случаев положительных (вследствие ингибирования используемыми деконтаминантами жизнедеятельности контаминирующих микроорганизмов) «МБТК+» результатов инкубации по истечении 90 дней после посева, что отображено в таблице.

Культуры микроорганизмов из пробирок из опытной и контрольной групп были ориентировочно идентифицированы с помощью световой микроскопии микропрепаратов, окрашенных по методу Грама и по методу Циля–Нильсена. В результате установлено, что в контрольной группе в 12 пробирках из 14 выросли колонии дрожжеподобных грибов рода *Candida* (в т.ч. одна смешанная культура грибов рода *Candida* и кислотоустойчивых микобактерий), в двух остальных – грамтрицательные палочки. Обе культуры грамтрицательных палочек идентифицировали по биохимическим свойствам с помощью тест-систем ENTEROtest 16 (Erba Lachema, Чехия) как *E. coli* и *K. pneumoniae*.

Микропрепараты культур из опытной группы с ростом контаминантной микрофлоры, окрашенные по методу Циля–Нильсена, были изучены под световым микроскопом. Микроскопическая картина позволила предположить, что в обоих случаях контаминирующими микроорганизмами были дрожжеподобные грибы рода *Candida* в монокультуре (без признаков роста кислотоустойчивых бактерий). Данные культуры были пересеяны на хромогенный агар для грибов рода *Candida* HiCrome *Candida* Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Также была определена чувствительность этих культур к Амфотерицину В диско-диффузионным методом. Таким образом, установили, что оба контаминирующих агента относятся к устойчивым к Амфотерицину В дрожжеподобным грибам вида *Candida krusei*.

Исходя из полученных данных, можно резюмировать, что использование в качестве деконтаминирующего агента NALC-NaOH и смеси «Пиобактериофага комплексного» и Амфотерицина В имеет некоторое преимущество ввиду уменьшения удельного веса посевов с ростом контаминирующей микрофлоры. Можно также полагать, что побочным эффектом этого в ряде случаев может стать некоторое увеличение удельного веса посевов с ростом чистой культуры *M. tuberculosis*, которые в дальнейшем могут быть использованы для постановки теста лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Еще одним

Таблица. Влияние деконтаминации на рост микрофлоры в образцах через 90 дней после посева  
 Table. Effect of decontamination on the growth of microflora in samples 90 days after sowing

Способ деконтаминации / Method of decontamination	Наличие роста (количество образцов) / Presence of growth (number of samples)			
	Чистая культура / Pure culture of <i>M. tuberculosis</i>	Контаминированная микрофлорой / Contaminated with microflora	Отсутствие роста / No growth	Всего / Total
NALC-NaOH (контрольная группа) / (control group)	49	14	251	314
NALC-NaOH + смесь («Пиобактериофаг комплексный» + Амфотерицин В) (опытная группа) / NALC-NaOH + mixture (“Pyobacteriophage complex” + Amphotericin B) (experimental group)	50	2	262	314

достоинством подавления роста контаминирующей микрофлоры данными высокоспецифичными деконтаминантами без выраженного губительного эффекта на популяцию микобактерий является возможность точно установить факт действительного отсутствия микобактерий в образце клинического материала. В данном случае контаминанты не подавляют рост микобактерий на самых ранних стадиях инкубации посевов, «маскируя» наличие кислотоустойчивых микобактерий.

Таким образом, наблюдается повышение эффективности и информативности культурального метода за счет уменьшения выбраковки посевов вследствие контаминации, а в ряде случаев становится возможной выдача положительного (рост микобактерий туберкулеза) или отрицательного результата (отсутствие роста микобактерий туберкулеза), что в противном случае было бы вообще невозможно (если имела место контаминация стерильного клинического материала, получение которого сопряжено с инвазивными вмешательствами, например, спинно-мозговой или плевральной жидкости, реzeцированных тканей и др.).

Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность безвременно ушедшему наставнику, соратнику, доктору медицинских наук, профессору Айрату Радиковичу Мавзютову, идейному вдохновителю данного научного исследования.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

#### Financial support

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

1. Лямин АВ. Контаминирующая микрофлора при обследовании на туберкулез: зависимость от питательных сред для первичного посева. Астраханский медицинский журнал. 2019;14(4):29-36. / Lyamin AV. Contaminating microflora in tuberculosis examination: dependence on culture media for basic seeding. Astrakhan Medical Journal. 2019;14(4):29-36. DOI: 10.17021/2019.14.4.29.36 (In Russian).
2. Narvaiz de Kantor I, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P, et al. Laboratory Services in Tuberculosis Control Part III: Culture. Geneva: WHO. 1998.
3. Спиридонова ЛГ, Тен МБ, Лабутин ИВ. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза органов дыхания. Современные проблемы науки и образования. 2019;1 (сетевое издание) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28501> (дата обращения: 12.05.2024). / Spiridonova LG, Ten MB, Labutin IV. Improving the bacteriological diagnosis of respiratory tuberculosis. Modern problems of science and education. 2019;1 [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28501> (accessed 12.05.2024).
4. Родионова ЮД, Гусякова ОА, Лямин АВ, Бородулина ЕА, Козлов АВ. Оценка влияния условий хранения мокроты на витальные свойства микобактерий туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2017;95(1):42-46. / Rodionova YuD, Gusyakova OA, Lyamin AV, Borodulina EA, Kozlov AV. Evaluation of the influence of sputum storage conditions on the vital properties of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis and Lung Diseases. 2017;95(1):42-46.
5. Севастьянова ЭВ, Пузанов ВА, Смирнова ТГ, Ларионова ЕЕ, Черноусова ЛН. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2015;1:35-41. / Sevast'yanova EV, Puzanov VA, Smirnova TG, Larionova EE, Chernousova LN. Evaluation of the complex of microbiological and molecular genetic research methods for the diagnosis of tuberculosis. Tuberculosis and Lung Diseases. 2015;1:35-41.
6. Ерохин ВВ, Голышевская ВИ, Севастьянова ЭВ, Шульгина МВ. Микробиологические методы диагностики туберкулеза: Эпидемиология туберкулеза. Характеристика возбудителя туберкулеза. Лабораторные методы диагностики туберкулеза: Теоретическое учебное пособие для проведения курсов обучения: «Выявление туберкулеза методом микроскопии», «Культуральные методы диагностики туберкулеза». М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008;40. / Erokhin VV, Golyshvskaya VI, Sevast'yanova EV, Shul'gina MV. Microbiological methods of diagnosis of tuberculosis: Epidemiology of tuberculosis. Characteristics of the causative agent of tuberculosis. Laboratory methods of diagnosis of tuberculosis: A theoretical textbook for conducting training courses: "Detection of tuberculosis by microscopy", "Cultural methods of diagnosis of tuberculosis". Tver: Triada Publishing House; 2008. 40 p.
7. Залуцкая ОМ, Сагал'чик ЕР, Суркова ЛК. Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза. Минск, 2013;135. / Zalutskaya OM, Sagal'chik ER, Surkova LK. Guidelines for laboratory diagnosis of tuberculosis. Minsk: Ministry of Health of the Republic of Belarus, 2013;135.
8. McClean M, Stanley T, Stanley S, Maeda Y, Goldsmith CE, Shepherd R, et al. Identification and characterization of breakthrough contaminants associated with the conventional isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2011 Sep;60(Pt 9):1292-8. DOI: 10.1099/jmm.0.030619-0
9. Патент 2786394 Российская Федерация, МПК C12N 1/04. Способ снижения уровня контаминации клинического материала при посеве на плотные питательные среды для выделения *Mycobacterium tuberculosis* complex: №2022106813: заявл. 15.03.2022: опубл. 20.12.2022. Шарипов РА, Мавзютов АР, Галеева ЛР, Байгузина ЗР, Сидоров ИВ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО БГМУ. 7 с. / Sharipov RA, Mavzyutov AR, Galeeva LR, Bayguzina ZR, Sidorov IV. Method for reducing the level of contamination of clinical material when inoculated on solid culture media for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Patent RF, No 2786394. 2022.

#### Информация о соавторах:

Шарипов Рауль Ахнафович, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фтизиатрии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Булатов Шамиль Энгельсович, главный врач ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Галеева Люция Ревовна, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Гадельмурзина Динара Радиковна, врач-бактериолог ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

Исламов Ринат Нафкатович, врач торакальный хирург ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер»

#### Information about co-authors:

Raul A. Sharipov, MD, PhD, Head of Department, Bashkir State Medical University

Shamil E. Bulatov, Chief Physician, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Lucia R. Galeeva, Bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Dinara R. Gadel'murzina, Bacteriologist, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary

Rinat N. Islamov, Thoracic surgeon, Republican Clinical Tuberculosis Dispensary