УДК 614.48

Мордовской Г. Г., *Поникаровская И. В., Якушкина А. Ю., Путырский В. П., Ямпольский В. А., Панов Г. В.*

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА ПРИ САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОЗДУХА И ПОВЕРХНОСТЕЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ

ГБУЗ СО «Противотуберкулёзный диспансер», г. Екатеринбург, Российская Федерация;

ООО «РАСТЕР», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. В настоящей работе приведены результаты обследования 12 противотуберкулезных учреждений (ПТУ) Свердловской области в рамках санитарно-бактериологического контроля внешней среды закрытых помещений на микобактерии туберкулёза (МБТ). Отбор проб воздуха осуществлялся с помощью пробоотборника «Ультрапроба-Р», выполненного на базе мощного пылесоса “Rainbow D” с водяным фильтром [1, 2]. Взятие смывов с поверхностей проводилось с использованием пробоотборника на базе моющего пылесоса “Thomas Twin XT” [3].Отбор проб осуществлялся до и после аэрозольной обработки исследуемых помещений раствором препарата «Дезаргент» с концентрацией перекиси водорода 10 % и дозой 3 мл/м^3 с применением мелкодисперсного распылителя «Ультраспрейер Р-60».

Приведены материалы бактериологических и молекулярно-генетических методов (МГМ) исследования проб воздуха и смывов, а также сравнительная характеристика методов при санитарно–бактериологическом контроле.

При проведении санитарно-бактериологических исследований обнаружено, что чувствительность метода люминесцентной микроскопии превосходит культуральный метод, однако только культуральный метод способен подтвердить жизнеспособность обнаруженных во внешней среде микобактерий (МБ). Также выявлена необходимость значительного увеличения сроков инкубации посевов при санитарно-бактериологических исследованиях на плотных питательных средах (ППС) по сравнению с диагностическими исследованиями, что связано с пониженным метаболизмом клеток МБ, персистирующих в неблагоприятных условиях внешней среды, и более поздним появлением роста культур МБ.

В работе показана эффективность проведённых аэрозольных обработок, которая выражается при исследованиях методом люминесцентной микроскопии в увеличении количества повреждённых клеток МБ, а при культуральных исследованиях — отсутствие обнаружения жизнеспособных МБ.

Ключевые слова: пробоотборник, «Ультраспрейер Р-60», «Дезаргент», люминесцентная микроскопия, бактериологические исследования, молекулярно-генетические исследования, микобактерии туберкулёза

Туберкулёз является одной из опаснейших инфекций, причём заболевание среди медицинских работников существенно выше, чем населения в целом [4]. В связи с этим, важное значение имеет определение загрязненности помещений противотуберкулезных учреждений (ПТУ) микобактериями туберкулёза (МБТ), необходимое как для выявления зон повышенной инфекционной опасности, так и для проведения контроля качества проводимой дезинфекции.

В настоящей работе приведены результаты санитарно-бактериологических исследований загрязнённости объектов внешней среды МБТ и изучения эффективности аэрозольной дезинфекции, проведённые в 12 ПТУ Свердловской области в 2013 г.

Для определения загрязненности воздуха МБТ использовался пробоотборник «Ультрапроба-Р», выполненный на базе пылесоса “Rainbow D” с водяным фильтром, оснащённый регистратором объёма воздуха, прокачиваемого пылесосом [1, 2]. Инновационным является использование в аквафильтре в качестве адсорбента 5 % водного раствора натрия фосфорнокислого трёхзамещённого (Na_3PO_4), обладающего ингибирующим действием по отношению к неспецифической микрофлоре.

Для получения смывов с горизонтальных и вертикальных поверхностей использовался пробоотборник на базе моющего пылесоса “Thomas Twin XT”, где вместо воды в качестве адсорбента также использовался 5 % водный раствор натрия фосфорнокислого трёхзамещённого [3].

После проведения отбора проб проводилась промывка, дезинфекционная обработка, просушивание внутренних деталей и пробоотборных шлангов пылесосов.

При взятии проб воздуха прокачивался объем воздуха, равный объему обследуемого помещения, а при взятии смывов проводилась обработка достаточно больших участков поверхностей (от 2 м^2 и более). За счет этого удалось обеспечить качественность, достоверность и информативность отобранных проб.

После окончания отбора проб адсорбент разливался в стерильные емкости, инкубировался при температуре 37 °С 18–20 часов для деконтаминации и естественной седиментации взвешенных в материале предполагаемых МБТ. Затем часть материала в виде осевшей взвеси отбиралась для исследований молекулярно-генетическими методами (МГМ), другая — для бактериологических (микроскопических и культуральных) методов исследований. Пробоподготовка и посев на плотные питательные среды (ППС) Левенштейна-Йенсена и «Новая» осуществлялись по стандартной методике в соответствии с приказом МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ». Внесены изменения по продолжительности сроков инкубации посевного материала до 20 недель.

Дезинфекция помещений ПТУ проводилась с помощью мелкодисперсного аэрозольного генератора «Ультраспрейер Р-60», распыляющего частицы со среднемедианным диаметром 1,9 мкм и производительностью 60 мл/мин, [5]. В качестве дезинфицирующего средства использовался раствор в дистиллированной воде препарата «Дезаргент» (50 % H_2O_2 + 0,075 % Ag), [6], с концентрацией перекиси водорода 10 % и дозой 3 мл/м^3.

Обследование каждого помещения ПТУ состояло из 3 этапов.

1 этап — отбор проб до аэрозольной обработки помещений, что необходимо было для выявления «естественного» фона контаминированности воздуха и поверхностей закрытых помещении МБТ.

2 этап — аэрозольная дезинфекция помещений с последующей двухдневной экспозицией, во время которой доступ людей в обработанные помещения был закрыт.

3 этап — (контрольный) отбор проб после проведения аэрозольной дезинфекции.

За 2013 г. в ходе исследовательской работы было отобрано 146 проб воздуха и 146 смывов с поверхностей в помещениях ПТУ.

Результаты микроскопических исследований проб воздуха и смывов

В начале исследовательской работы люминесцентная микроскопия мазков из осадка отобранных проб не проводилась. Однако в процессе инкубации посевного материала из проб, взятых в одном из ПТУ, была проведена люминесцентная микроскопия смывов с косяков ППС, на которых отсутствовал ви-

димый рост культур. Из 11 просмотренных мазков в 5 (45 %) были обнаружены от 1 до 4 палочек кислотоустойчивых бактерий (КУБ). В дальнейшем из одного такого образца, где при микроскопии обнаружена всего 1 палочка КУБ, был получен рост культуры. В связи с этим люминесцентная микроскопия осадка отобранных проб воздуха и смывов была включена в исследовательскую работу. Всего было просмотрено 73 мазка.

В 45 (62 %) мазках из 73 просмотренных были обнаружены кислотоустойчивые бактерии (КУБ). Для сравнения — при проведении диагностических исследований материала, полученного от пациентов ПТУ, положительные находки при люминесцентной микроскопии осадка составляют в среднем 20 %. Таким образом, метод люминесцентной микроскопии осадка проб при проведении санитарно-бактериологических исследований более эффективен и информативен, чем в диагностических исследованиях, что делает его необходимым при контроле загрязненности внешней среды МБТ.

Из 45 образцов проб, где были получены положительные мазки, только 5 образцов (11 %) дали рост культур МБ, включающих в себя как МБТ, так и нетуберкулезные микобактерии (НТМБ). Сравнение положительных результатов люминесцентной микроскопии осадка проб (62 %) с результатами посева (11 %) позволяет выявить, что чувствительность метода люминесцентной микроскопии в сочетании с методом обогащения материала как минимум не уступает и даже превосходит культуральный метод исследования при санитарно-бактериологических исследованиях.

В остальных 40 пробах (89 %) рост культур не получен, хотя срок культивирования посевного материала составил не менее 17 недель. Отсутствие роста культур говорит, что в положительных мазках данных образцов в подавляющем количестве случаев наблюдались нежизнеспособные клетки КУБ. Поэтому, несмотря на высокую эффективность, информативность и чувствительность метода люминесцентной микроскопии при рутинных санитарно-бактериологических исследованиях внешней среды на МБТ, культуральный метод в практических лабораториях является основным, так как способен доказать жизнеспособность, а значит и эпидемиологическую опасность обнаруженных в пробах МБТ. Культуральный метод также позволяет идентифицировать выделенную культуру и опрелелить спектр ее лекарственной чувствительности (ЛЧ).

При микроскопическом исследовании равного количества мазков из проб, отобранных до и после аэрозольной обработки (22 и 23 мазка соответственно) обнаружилось, что после проведения аэрозольной дезинфекции количество клеток КУБ с типичными тинкториально-морфологическими свойствами значительно уменьшилось. Одновременно в 8 раз увеличилось количество измененных клеток, «пострадавших» от химического воздействия дезинфицирующего средства, выраженное в значительном полиморфизме, «смазанности» форм клеток, неспособности удерживать краситель, а также в утрате свойства кислотоустойчивости, что подтверждалось при перекрашивании и микроскопии данных мазков по методу Циля-Нильсена.

Таким образом, микроскопические исследования люминесцентным методом доказывают негативное воздействие перекисного препарата «Дезаргент» на строение клеточной стенки МБ, а значит и на весь метаболизм клеток МБ, их жизнеспособность в целом, что подтверждается культуральными методами исследования.

Результаты бактериологических (культуральных) и молекулярно-генетических исследований проб воздуха в помещениях ПТУ.

При бактериологических исследованиях (БИ) 74 учтенных (без проростов) проб, отобранных до проведения аэрозольной дезинфекции, было получено 5 (6,8 %) культур МБ. Молекулярно — генетические исследования (МГИ) выявили наличие ДНК МБТ в 32 (43,8 %) из 73 учтенных (без ингибирования ПЦР) проб.

После проведения аэрозольной дезинфекции при (БИ) 64 учтённых проб, культур МБТ не выделено. В ходе МГИ были обнаружены ДНК МБТ в 23 (39,6 %) из 58 исследованных проб.

По результатам бактериологических и МГМ исследований проб воздуха, отобранных до и после аэрозольной обработки, степень контаминации воздуха ДНК МБТ отличается незначительно.

Результаты бактериологических (культуральных) и молекулярно-генетических исследований проб смывов с поверхностей в помещениях ПТУ

При (БИ) 69 учтённых проб, взятых до проведения аэрозольной дезинфекции, получено 5 (7,2 %) культур МБ. В ходе МГИ обнаружены ДНК МБТ в 50 (68,5 %) из 73 проб.

В 67 пробах смывов, взятых после проведения аэрозольной дезинфекции, не получено ни одной культуры МБТ. При этом ДНК МБТ были обнаружены при МГМ исследованиях в 43 (63,2 %) пробах из 68.

По результатам бактериологических и МГМ исследований проб смывов, отобранных до и после аэрозольной обработки, контаминированость поверхностей помещения ДНК МБТ отличается незначительно, в то время как проведение аэрозольной дезинфекции позволило ликвидировать загрязненность поверхностей клеточными формами МБТ.

Контаминированность поверхностей ДНК МБТ более чем в 1,5 раза выше контаминированности воздуха. Также мы видим, что степень контаминации внешней среды ДНК МБТ в десятки раз превышает степень контаминации их клеточными формами.

Результаты изучения сроков появления роста микобактерий на плотных питательных средах (ППС) при санитарно-бактериологических исследованиях

В обычной практике при диагностических исследованиях максимальный рост МБТ и медленно растущих НТМБ наблюдается на 4–6 неделях культивирования посевного материала, у быстрорастущих НТМБ — в течение 7–10 дней культивирования. В данной работе диапазон появления роста всех выделенных культур МБ был смещен на 5–15 недели инкубации, причем у большинства из них (63,6 %) начало роста было зафиксировано на 8–13 неделях инкубации.

У всех выделенных культур МБТ (83,3 %) рост фиксировался на 8–15 неделях культивирования; у 2 быстрорастущих НТМБ начало роста наблюдалось на 6 и даже 13 неделях; у 3 медленнорастущих НТМБ — на 10 и 13 неделях.

Таким образом, в процессе санитарно-бактериологических исследований наблюдалось более позднее появление роста МБ, чем в диагностических исследованиях. Факт обнаружения замедленной скорости роста выделенных МБ можно объяснить их пребыванием в неблагоприятных для выживания условиях внешней среды, где они подвергаются механическим, осмотическим и химическим, вследствие применяемых в ПТУ дезинфектантов, воздействиям. Реакцией МБ на существование в неблаго-приятных условиях явилось общее снижение ферментативного катализа и интенсивности метаболизма клеток. У штаммов с подавленной биологической активностью не только угнетена функция деления, но и плохие адаптивные возможности к существованию в более благоприятных условиях на ППС. В связи с этим при санитарно-бактериологических исследованиях посевной материал нуждается в инкубации при 37 °С в течение 18–20 недель.

Выводы

1. В настоящей работе продемонстрирована возможность определения загрязненности МБТ воздуха и поверхностей закрытых помещений ПТУ с помощью описанных пробоотборников.

2. Особенностями санитарно-бактериологических исследований загрязненности внешней среды МБТ являются:

– высокая информативность и чувствительность метода люминесцентной микроскопии;

– необходимость более длительного культивирования (до 20 недель) посевного материала на ППС при отсутствии роста.

3. Аэрозольная дезинфекция помещений с помощью мелкодисперсного распылителя «Ультраспрейер Р-60» и раствора препарата «Дезаргент» с концентрацией перекиси водорода 10 % при дозе 3 мл/м^3 способствует повреждению и уни-

чтожению клеточных форм МБТ как в воздухе, так и на поверхностях обрабатываемого помещения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мордовской Г.Г., Путырский В.П., Ямпольский В.А., Мордовская З.И., Устройство для отбора проб воздуха в помещении. Патент на полезную модель РФ, № 117183 от 27.01.2012 г.

2. Мордовской Г.Г., Поникаровская И.В., Якушкина А.Ю., Путырский В.П., Ямпольский В.А. Устройство для забора проб воздуха в помещении для выявления микобактерий туберкулёза. Уральский медицинский журнал, № 10, 105-108, 2012 г.

3. Мордовской Г.Г., Путырский В.П., Ямпольский В.А., Мордовская З.И., Устройство для отбора проб микобактерий с поверхностей: Патент на полезную модель РФ: № 133612 от 25.03.2013.

4. Голубев Д.Н., Мордовской Г.Г., Егорова О.С. Современные представления о нозокомиальном туберкулёзе у сотрудников противотуберкулёзных учреждений: http://fiziopulmo.ru/fp/i/full/1_2011_11_sovremennye_.pdf

5. Ямпольский В.А. Проведение аэрозольной дезинфекции помещений ЛПО с помощью аэрозольных генераторов. Поликлиника. 2012; 6: 52-53.

6. Инструкция № 20/12 по применению дезинфицирующего средства «Дезаргент» производства ООО «РАСТЕР». Екатеринбург, 2012; http://www.dezreestr.ru

Авторская справка
Мордовской Георгий Георгиевич
ГБУЗ СО «Противотуберкулёзный диспансер», г. Екатеринбург
д. м. н., зав. бак. лаборатории
Поникаровская Ирина Валентиновна
ГБУЗ СО «Противотуберкулёзный диспансер», г. Екатеринбург
врач
Якушкина Алена Юрьевна
ГБУЗ СО «Противотуберкулёзный диспансер», г. Екатеринбург
Биолог
Путырский Валерий Павлович
ООО «РАСТЕР», г. Екатеринбург
к. ф. м. н., генеральный директор
Ямпольский Валерий Абрамович
yampolskij@yandex.ru
ООО «РАСТЕР», г. Екатеринбург
к. т. н., начальник производственного отдела
Панов Григорий Валентинович
ГБУЗ СО «Противотуберкулёзный диспансер», г. Екатеринбург
врач

Российская Федерация, 620075, г. Екатеринбург, ул. Ленина, 79-а, оф. 24

Mordovskoy G. G., Ponikarovskaya I. V., Yakushkina A. Y., Putyrsky V.P., Yampolskiy V. A., Panov G. V.

A METHOD FOR ISOLATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN SANITARY-BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF CONTAMINATION OF AIR AND SURFACES OF TB INSTITUTIONS

State Health Establishment of the Sverdlovsk region "TB dispensary",

Yekaterinburg, Russian Federation;

RASTER LLC, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The present paper discusses the results of the survey of 12 TB Establishments (TBE) of the Sverdlovsk region conducted within the framework of the sanitary and bacteriological control of the mycobacteria tuberculosis (MBT) in the air of the enclosed spaces. The air sampling was carried out using the "Ultraproba-R" sampler based on a powerful water filtration vacuum cleaner "Rainbow D" [1, 2]. Surface sampling swab was done using a sampler based on a "Thomas Twin XT" washing vacuum cleaner [3]. Sampling was carried out before and after the aerosol treatment of the premises by "Desargent" solution with 10 % hydrogen peroxide concentration and 3ml/m^3 dosage, using "Ultrasprayer R-60" fine-dispersed sprayer.

The paper provides the data of bacteriological and molecular genetic methods (MGM) of air samples and swab analysis, and gives the comparative characteristic of the methods when exercising sanitary and bacteriological control.

The sanitary bacteriological analysis revealed that the luminescent microscopy test-sensitivity excels that of cultural method. However, only cultural method can confirm the vitality of mycobacteria (MB) — MBT and mycobacteria nontuberculous (MBNT). The authors also found out that — in comparison with a diagnostic study — it is necessary to considerably lengthen the incubation period when sanitary and bacteriological studies of the inoculation in a solid medium (SM) due to a reduced metabolic rate of MB cells persistent in difficult environments, and to a slower growth of MB culture.

The paper demonstrates the effectiveness of the aerosol treatment. The luminescent microscopy shows the increase of damaged MB cells, and the cultural study shows the lack of detection of viable MB.

Key words: sampler, "Ultrasprayer R-60", "Desargent", luminescent microscopy, bacteriological study, molecular genetic study, mycobacteria tuberculosis

REFERENCES

1. Mordovskoj G.G., Putyrskij V.P., Jampol'skij V.A., Mordovskaja Z.I., Ustrojstvo dlja otbora prob vozduha v pomeshhenii. Patent na poleznuju model' RF, № 117183 ot 27.01.2012 g.

2. Mordovskoj G.G., Ponikarovskaja I.V., Jakushkina A.Ju., Putyrskij V.P., Jampol'skij V.A. Ustrojstvo dlja zabora prob vozduha v pomeshhenii dlja vyjavlenija mikobakterij tuberkuljoza. Ural'skij medicinskij zhurnal, № 10, 105-108, 2012 g.

3. Mordovskoj G.G., Putyrskij V.P., Jampol'skij V.A., Mordovskaja Z.I., Ustrojstvo dlja otbora prob mikobakterij s poverhnostej: Patent na poleznuju model' RF: № 133612 ot 25.03.2013.

4. Golubev D.N., Mordovskoj G.G., Egorova O.S. Sovremennye predstavlenija o nozokomial'nom tuberkuljoze u sotrudnikov protivotuberkuljoznyh uchrezhdenij: http://fiziopulmo.ru/fp/i/full/1_2011_11_sovremennye_.pdf

5. Jampol'skij V.A. Provedenie ajerozol'noj dezinfekcii pomeshhenij LPO s pomoshh'ju ajerozol'nyh generatorov. Poliklinika. 2012; 6: 52-53.

6. Instrukcija № 20/12 po primeneniju dezinficirujushhego sredstva «Dezargent» proizvodstva OOO «RASTER». Ekaterinburg, 2012; http://www.dezreestr.ru

Authors
Mordovskoy Georgiy G.
State Health Establishment of the Sverdlovsk region "TB dispensary", Yekaterinburg, Russian Federation
M.D, Head of Bacteriological Laboratory
Ponikarovskaya IrinaV.
State Health Establishment of the Sverdlovsk region "TB dispensary", Yekaterinburg, Russian Federation
Doctor
Yakushkina Alyona U.
State Health Establishment of the Sverdlovsk region "TB dispensary", Yekaterinburg, Russian Federation
Biologist
Putyrsky V.P.
RASTER LLC, Yekaterinburg, Russian Federation
PhD, Director General
Yampolskiy Valeriy A.
yampolskij@yandex.ru
RASTER LLC, Yekaterinburg, Russian Federation
PhD, Head of Manufacturing Department
Panov Grigoriy V.
State Health Establishment of the Sverdlovsk region "TB dispensary", Yekaterinburg, Russian Federation
Doctor

Lenina St. 79-a, apt. 24, 620075 Yekaterinburg, Russian Federation