

ТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗЯТИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ МОКРОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

© А.В. Орлов¹, В.Н. Ковалев¹, М.Н. Игнатьева¹, Л.А. Антипова¹, Е.А. Егорова¹, М.О. Волкова²

¹СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги», Санкт-Петербург;

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» ФБМА, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию: 12.02.2016

Принята к печати: 01.06.2016

Резюме. Своевременная диагностика инфекционного процесса у больных муковисцидозом является первостепенной задачей. Особенно это важно для своевременного лечения при первичном высеве *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Раннее лечение позволяет в большинстве случаев предупредить формирование хронической синегнойной инфекции. Это касается и повторных высевок *Ps. aeruginosa* после предшествующей эрадикации данной инфекции. Однако не во всех городах имеются лаборатории, достаточно оснащенные для качественного выполнения бактериологических анализов мокроты у пациентов с муковисцидозом, особенно для выделения *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. В связи с этим актуален выбор метода сбора материала и способов его хранения и транспортировки в специализированные лаборатории. В 5 городах Северо-Западного региона России у 51 пациента с муковисцидозом проведены заборы мокроты с последующей ее доставкой и проведением посева в НИИДИ ФБМА России в Санкт-Петербурге. У 5 пациентов произведен забор откашливаемой мокроты, у 12 — индуцированной мокроты, у 24 — проводился смыв с задней стенки глотки, у 8 — мазок с задней стенки глотки, родители 2 пациентов принесли мокроту, которую дети откашливали дома накануне. В результате бактериологического исследования у 15 детей определенные патогены были выявлены впервые: стафилококк у 10 человек, синегнойная палочка — у 4 человек, ахромобактер — у 1 человека. Возбудители хорошо сохранялись при транспортировке образцов мокроты в специальной транспортной среде на холоде, что позволяет использовать бактериологические лаборатории крупных городов для проведения посевов мокроты пациентам из других регионов.

Ключевые слова: муковисцидоз; транспортировка мокроты; *Pseudomonas aeruginosa*; *Burkholderia cepacia*.

THE TECHNICAL ASPECTS OF COLLECTING AND TRANSPORTING THE SPUTUM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

© A.V. Orlov¹, V.N. Kovalev¹, M.N. Ignat'eva¹, L.A. Antipova¹, E.A. Egorova¹, M.O. Volkova²

¹St Petersburg "Child hospital of St Olga", Saint Petersburg, Russia;

²Science Research Institute of Children's Infection of FBMA of Russia, Saint Petersburg, Russia

For citation: Pediatrician (St. Petersburg), 2016;7(2):92-95

Received: 12.02.2016

Accepted: 01.06.2016

Abstract. Timely diagnosis of infection in cystic fibrosis patients is a major aim. This is especially important for timely treatment in primary seed *Ps. aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Early treatment allows in most cases to prevent the formation of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. This also applies to re-sowing *Ps. aeruginosa* after the previous eradication. However, not all cities and small towns have laboratories equipped sufficiently to do bacteriological analysis of cystic fibrosis patients sputum, especially for the allocation of *Ps. aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. In this regard, the choice of methods of collecting material and its storage and transportation to specialized laboratories is very relevant. In 5 cities of the North-West region of Russia in 51 patients with cystic fibrosis conducted fences sputum and its subsequent delivery and carrying out of sowing in NIIDA FMBA of Russia in St Petersburg. Five patients extract sputum by coughing, 12 — induced sputum, 24 — were held flush with the posterior wall of the pharynx, 8 — swab from posterior pharyngeal wall, the parents of 2 patients brought the sputum coughed in previous day at house. As the result of bacteriologic test in 15 children certain pathogens were detected for the first time: *Staphylococcus* in 10 patients, *Pseudomonas aeruginosa* in 4 patients, *Achromobacter* in 1 person. Pathogens are well preserved during transportation of specimens to the laboratory in transport medium in the cold, which allows the use of bacteriological laboratories of large cities for carrying out sputum cultures of patients from other regions.

Keywords: cystic fibrosis; sputum transporting; *Pseudomonas aeruginosa*; *Burkholderia cepacia*.

Муковисцидоз (МВ) — кистозный фиброз поджелудочной железы — часто встречающееся генетически детерминированное заболевание, характеризуется поражением всех экзокринных желез жизненно важных органов и систем организма, отличается выраженной генетической гетерогенностью и клиническим полиморфизмом, наследуется по аутосомно-рецессивному типу [1, 2].

Наряду с распространенным поражением экзокринных желез для МВ характерны кистозное перерождение поджелудочной железы (ПЖ) и поражение желез кишечника и дыхательной системы из-за закупорки их выводящих протоков вязким секретом, возникающим вследствие изменения функций хлорных каналов мембран эпителиальных клеток [1, 2, 4].

При муковисцидозе в той или иной степени вовлекается в патологический процесс весь организм, но в большей степени — органы дыхания, пищеварительный тракт, печень, поджелудочная железа, желчные пути, потовые железы и половые органы (особенно у лиц мужского пола). Ведущим в клинической картине МВ является поражение двух систем организма: бронхолегочной и пищеварительной, степень нарушения деятельности которых определяет исход заболевания [1, 2].

С рождения больные муковисцидозом предрасположены к развитию бактериальной инфекции дыхательных путей. В ее основе лежит затрудненная эвакуация из бронхиального дерева характерного для МВ густого вязкого секрета. Вирусная инфекция повышает риск и ускоряет развитие бактериальной инфекции [3].

Спектр бактериальных патогенов при МВ с возрастом больного постепенно расширяется. На первых годах жизни при инфицировании бронхиального дерева в посевах мокроты выявляется пневмококк, затем развивается стафилококковая, а в последующем респираторная инфекция, обусловленная *H. influenzae* и *Ps. aeruginosa*. В последнее время возросла роль анаэробов и *Burkholderia cepacia*, при обсеменении которыми значительно осложняется терапия МВ [1–4]. В разных клинических центрах больные МВ дети с хронической синегнойной инфекцией составляют от 15 до 50% всех пациентов. Среди взрослых более половины больных имеют хроническую синегнойную инфекцию, утяжеляющую течение заболевания и приводящую к увеличению затрат на лечение. Применяемые в настоящее время различные режимы оральной, ингаляционной и внутривенной антибактериальной терапии могут предупредить или задержать развитие хронической инфекции дыхательных путей, вызванной синегнойной палочкой.

Своевременная диагностика инфекционного процесса у больных муковисцидозом является первостепенной задачей. Особенно это важно для своевремен-

ного лечения при первичном высеве *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Раннее лечение позволяет в большинстве случаев предупредить формирование хронической синегнойной инфекции [1, 2, 4]. Это касается и повторных высевов *Ps. aeruginosa* после предшествующей эрадикации данной инфекции. Однако не во всех городах имеются лаборатории, достаточно оснащенные для качественного выполнения бактериологических анализов мокроты у пациентов с муковисцидозом, особенно для выделения *Ps. aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. В связи с этим актуален выбор метода сбора материала и способов его хранения и транспортировки в специализированные лаборатории.

Целью работы явилось изучение возможности выполнения эффективных посевов мокроты больных муковисцидозом при доставке ее в сертифицированную бактериологическую лабораторию крупного города из отдаленных регионов в течение двух дней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У 51 пациента с муковисцидозом в 5 городах (Мурманск, Петрозаводск, Псков, Вологда, Калининград) были проведены заборы мокроты, которые доставили для исследования в бактериологическую лабораторию ФГБУ НИИДИ ФМБА России в Санкт-Петербурге. У 5 пациентов произведен забор откашливаемой мокроты, у 12 — индуцированной мокроты, у 24 — проводился смыв с задней стенки глотки, у 8 — мазок с задней стенки глотки, родители 2 пациентов принесли мокроту, которую дети откашливали дома накануне.

Согласно методическим указаниям МУ 4.2.2039-05¹, введенным в действие 01.07.2006, забор материала проводился натошак после полоскания рта кипяченой водой в асептических условиях в стерильные контейнеры. Мазок из зева проводили с использованием шпателя стерильным тампоном (миндалины, небные дужки, задняя стенка глотки), не касаясь щек, языка, десен и губ. Смыв с задней стенки глотки брали в виде аспирата в стерильный контейнер после инстилляций 2 мл стерильного физиологического раствора в глотку². Индуцированную мокроту получали после ингаляции 10–20–30 мл 5% раствора NaCl через ингалятор Омрон U-17. Перед ингаляцией первой порции раствора пациент получал ингаляцию беродуала (15 капель). Откашливаемую самостоятельно мокроту (без индуцирования гипер-

¹ Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания МУ 4.2.2039-05. Утверждены 23.12.2005. Введены в действие 01.07.2006. Раздел 3.

² Там же. Раздел 6.5.

тоническим раствором) также собирали в стерильные контейнеры³. После сбора мокроту с помощью стерильного тампона помещали в специальную транспортную среду: ESwab Collection and Transport System, которая должна была сохранять бактерии в течение 5 дней при комнатной температуре или 7 дней при температуре +40 °С.

Образцы мокроты собирались сотрудниками ДГБ Св. Ольги в каждом городе в субботу или в воскресенье, а утром в понедельник доставлялись в лабораторию ФГБУ НИИДИ ФМБА России в Санкт-Петербурге. Хранение образцов проводилось во время первой поездки (в Мурманск) при комнатной температуре, а в последующие поездки — в сумке-холодильнике⁴.

В бактериологической лаборатории ФГБУ НИИДИ ФМБА России исследование мокроты включало предварительную микроскопию мазков клинического материала, окрашенных по Граму, и культуральный посев. При помощи бактериоскопии мазков мокроты оценивали количество полиморфноядерных лейкоцитов, эпителиальных клеток, а также грамположительных и/или грамотрицательных кокков и/или палочек. Бактериологический посев мокроты производили стандартным полуколичественным методом, число микроорганизмов определяли в 1 мл исследуемого материала. Для бактериологического посева мокроты использовали различные стандартные питательные среды. Для выявления «прихотливых» микроорганизмов, таких как пневмококк, менингококк и др., непосредственно перед посевом в лаборатории готовили кровяной агар на основе колумбийского агара (bioMérieux, Франция) с добавлением 5% донорской эритроцитарной массы и 10% лошадиной сыворотки. Микроорганизмы рода *Haemophilus* выращивали на шоколадном агаре с ростовыми добавками Poly Vitex (bioMérieux, Франция). При посеве мокроты на шоколадный агар для селекции гемофилов, устойчивых к бацитрацину, использовали диски с бацитрацином 10 ЕД (НИИ им. Пастера). Посев клинического материала с целью выявления представителей семейства *Enterobacteriaceae* и ферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *B. ceracia* и др.) осуществлялся на агар Мак-Конки (bioMérieux), агар Эндо (Микроген, Москва), для выделения *S. aureus* — на маннитол-солевой агар (bioMérieux, Франция). Для обнаружения патогенных грибов использовали агар Сабуро (НИЦФ). Инкубация кровяных и шоколадных чашек

проводилась в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (3–7%) при температуре 36 °С в течение 24 часов.

Идентификация пневмококков осуществлялась на основе характерной морфологии колоний на кровяном агаре, наличия α-гемолиза, чувствительности к оптохину (bioMérieux, Франция), лизиса в присутствии солей желчных кислот с 10% раствором дезоксихолата натрия (Sigma, США). Идентификация микроорганизмов осуществлялась на MALDI-ToF MS Biotyper Microflex LT (Bruker Inc., Germany).

Чувствительность выделенных патогенов к антибактериальным препаратам определяли на агаре Мюллера–Хинтона (bioMérieux, Франция) диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями EUCAST: Breakpoint table v5.0.2015. Для оценки антибиотикочувствительности *Streptococcus pneumoniae* использовали 5% кровяной агар на основе агара Мюллера–Хинтона. Для определения чувствительности *Streptococcus pneumoniae* к бета-лактамам антибиотикам проводили скрининг с диском, содержащим 1 мкг оксациллина, что позволяло разделить микроорганизмы на чувствительные и устойчивые к бета-лактамам. Для устойчивых штаммов *Streptococcus pneumoniae* чувствительность определяли методом серийных микроразведений. У штаммов *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus parainfluenzae* определяли чувствительность к ампициллину диско-диффузионным методом на шоколадном агаре и проводили тест на продукцию бета-лактамаз с нитроцефином (цефиназой). Для выявления метициллинрезистентного штамма *S. aureus* (MRSA) использовали скрининговый метод определения чувствительности к оксациллину (1 мкг) или цефокситину (30 мкг) (НИИ им. Пастера). Набор необходимых антибиотиков, учет и интерпретацию размеров зоны ингибции роста исследуемого микроорганизма вокруг диска с антибиотиком определяли в соответствии с рекомендациями EUCAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 5 пробах из 11 (первая поездка в Мурманск), т. е. почти в половине случаев, при хранении образцов при комнатной температуре в посеве не было выявлено патогенов. Во всех следующих поездках образцы мокроты после сбора помещали в холодильник и транспортировали в сумке-холодильнике.

При последующих поездках, когда образцы мокроты с транспортной средой хранились в холодильнике, во всех пробах определялись разнообразные бактерии. Не обнаружено преимуществ по высеваемости синегнойной палочки при получении индуцированной мокроты в сравнении со смывами с задней стенки глотки. В обоих случаях, когда родители принесли собранную накануне мокроту,

³ Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. МУ 4.2.2039-05. (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005). Раздел 6.5.2.1.

⁴ Там же. Раздел 4.

не получено высева стафилококка и синегнойной палочки (в предыдущих посевах они выделялись).

При проведении посевов мокроты пациентов с муковисцидозом в бактериологической лаборатории ФГБУ НИИДИ ФМБА у 15 человек отдельные микроорганизмы были выявлены впервые: *Staphylococcus aureus* (у 10 чел.), *Pseudomonas aeruginosa* (у 4 чел.), *Achromobacter xylosoxidans* (у 1 чел.).

У пациентов из всех городов, которые периодически лечились в центрах Москвы, Санкт-Петербурга и Ярославля, в 2 раза чаще выделяли синегнойную палочку — 6 случаев из 19 (31%) — в сравнении с пациентами, которые лечились в своем регионе, — 5 случаев из 32 (15%; $p = 0,323$). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, можно говорить о тенденции, правомерность которой подтверждают следующие данные. Пациенты в городах, где нет оформленных центров муковисцидоза — Мурманск, Псков, Петрозаводск, госпитализировались реже, и у них реже выделяли *Pseudomonas aeruginosa*, который высевали статистически значимо чаще у регулярно госпитализируемых пациентов в тех городах, где есть оформленный центр муковисцидоза: 1 человек из 23 (4%) против 9 человек из 28 (32%; $p = 0,0443$).

ВЫВОДЫ

1. Транспортировка образцов мокроты в течение 2 суток возможна с использованием специальной транспортной среды и при хранении образцов мокроты в холодильнике (сумке-холодильнике).

Эта методика может использоваться при отсутствии сертифицированной лаборатории в регионе проживания больного муковисцидозом.

2. С учетом большей частоты выделения синегнойной палочки у часто госпитализируемых пациентов в регионах с оформленными центрами муковисцидоза для этих регионов актуальны рекомендации по более тщательной профилактике перекрестной инфекции в стационаре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муковисцидоз / Под ред. Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской. — М.: Медпрактика-М, 2014. [Mukovistsidoz. Ed by N.I. Kapranova, N.Yu. Kashirskoy. Moscow: Medpraktika-M; 2014. (In Russ).]
2. Орлов А.В., Симонова О.И., Рославцева Е.А., Шадрин Д.И. Муковисцидоз (Клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация). — СПб.: Издание СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014. [Orlov AV, Simonova OI, Roslavl'tseva EA, Shadrin DI. Mukovistsidoz (Klinicheskaya kartina, diagnostika, lechenie, reabilitatsiya, dispanserizatsiya). St Petersburg: Izdanie SZGMU im. I.I. Mechnikova; 2014. (In Russ).]
3. Рекомендации по профилактике инфекций у больных муковисцидозом. Информация для специалистов / Перевод на русский язык. — М.: Практика, 2010. [Rekomendatsii po profilaktike infektsiy u bol'nykh mukovistsidozom. Informatsiya dlya spetsialistov. Moscow: Praktika; 2010. (In Russ).]
4. Cystic Fibrosis. Edited by Marcus A. Mall and J. Stuart Elborn. ERS monograph; 2014.

◆ Информация об авторах

Александр Владимирович Орлов — канд. мед. наук, доцент, заведующий, инфекционно-боксированное отделение № 3. СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги». E-mail: orlovcf@rambler.ru.

Виктор Николаевич Ковалев — канд. мед. наук, врач-педиатр, инфекционно-боксированное отделение № 3. СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги». E-mail: kovalevpma2009@rambler.ru.

Марина Николаевна Игнатьева — врач-педиатр, инфекционно-боксированное отделение № 3. СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги». E-mail: sinc.mariya@mail.ru.

Любовь Анатольевна Антипова — врач-педиатр, инфекционно-боксированное отделение № 3. СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги». E-mail: twolusu@mail.ru.

Екатерина Андреевна Егорова — медицинская сестра, приемное отделение. СПб ГБУЗ «Детская городская больница Святой Ольги». E-mail: Egorova-Ekat@mail.ru.

Марина Олеговна Волкова — канд. мед. наук, врач-бактериолог. ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» ФБМА России. E-mail: mwolkowa@mail.ru.

◆ Information about the authors

Aleksandr V. Orlov — MD, PhD, Associate Professor, Head, Infectious Boxed Department No 3. Saint Petersburg "Child Hospital of St Olga". E-mail: orlovcf@rambler.ru.

Viktor N. Kovalev — MD, PhD, Pediatrician, Infectious Boxed Department No 3. Saint Petersburg "Child Hospital of St Olga". E-mail: kovalevpma2009@rambler.ru.

Marina N. Ignatieva — Pediatrician, Infectious Boxed Department No 3. Saint Petersburg "Child Hospital of St Olga". E-mail: sinc.mariya@mail.ru.

Lubov A. Antipova — Pediatrician, Infectious Boxed Department No 3. Saint Petersburg "Child Hospital of St Olga". E-mail: twolusu@mail.ru.

Ekaterina A. Egorova — Nurse, Admission Department. Saint Petersburg "Child Hospital of St Olga". E-mail: Egorova-Ekat@mail.ru.

Marina O. Volkova — MD, PhD, bacteriologist. FSBI "Scientific-Research Institute of Children's Infection" of FBMA of Russia. E-mail: mwolkowa@mail.ru.