МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет"

Медико-диагностический факультет

Кафедра фтизиопульмонологии

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Дипломная работа

Исполнитель: студентка группы Д-601 Шевцова А.В.

Руководители: к. м. н., доцент кафедры

фтизиопульмонологии Буйневич И.В.

Зав. клинико-диагностической лаборатории

УЗ "Гомельская областная туберкулезная

клиническая больница” Борисенко Т.Д.

Рецензент: Зав. кафедрой микробиологии,

вирусологии и иммунологии, к. м. н. Тапальский Д.В.

ГОМЕЛЬ, 2012 г.

# ***Реферат***

Дипломная работа \_\_\_\_ страниц, 5 рисунков, 4 таблицы, 15 источников.

***Ключевые слова:*** туберкулез, микробиологическая диагностика, определение лекарственной чувствительности, автоматизированные системы.

***Объект исследования:*** Пациенты с подозрением на туберкулез легких.

***Предмет исследования:*** Результаты бактериологического исследования мокроты.

***Методы исследования:*** Метод ретроспективного анализа; Бактериологические методы: выделение МБТ, определение лекарственной чувствительности МБТ к ПТП. Метод абсолютных концентраций для определения лекарственной чувствительности штаммов МБТ к противотуберкулезным препаратам. Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам основного ряда с использованием автоматизированных систем (BACTEC MGIT 960).

***Цель исследования:*** Проведение сравнительного анализа культивирования МБТ с использованием BACTEC MGIT 960 и плотных сред.

***Задачи исследования:***

1. Изучить метод культивирования МБТ на плотных средах;

. Изучить метод культивирования МБТ с использованием BACTEC MGIT 960.

# ***Список сокращений***

АСИС - аппарат для свертывания и инактивации сыворотки;

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека;

КОЕ - колониеобразующая единица;

КУМ - кислотоустойчивые микобактерии;

МБТ - микобактерии туберкулеза;

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость;

ПТП - противотуберкулезные препараты.

***Содержание***

Реферат

Список сокращений

Введение

Глава 1. Современная диагностика туберкулеза

1.1 Принцип работы полностью автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 для выявления микобактерий туберкулеза и постановки тестов на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам

1.1.1 Характеристика питательной среды, используемой в пробирке MGIT

1.1.2 Принципы детекции и постановки тестов на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам

1.1.3 Результаты и отчетность

1.1.4 Недостатки метода

1.1.5 Тесты на лекарственную чувствительность к препаратам первого ряда: стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол (SIRE)

1.1.5.1 Принципы проведения теста

1.1.5.2 Тесты, применяемые при более высоких концентрациях лекарственных препаратов

1.1.5.3 Учет результатов

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

2.2 Методы исследования

2.2.1 Предварительная обработка мокроты

2.2.2 Приготовлениее яичных сред и посев на них

2.2.3 Подготовка пробирок и посев образца для автоматизированной системы BACTEC MGIT 960

2.2.4 Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам первого ряда на плотных средах

2.2.5 Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам первого ряда с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1 Сравнительная характеристика высеваемости МБТ на плотной среде и на BACTEC MGIT 960

3.2 Сравнительная характеристика определения лекарственной чувствительности МБТ на плотной среде и на BACTEC MGIT 960

3.3 Сравнительная характеристика контаминации проб на плотной и жидкой питательных средах

Заключение

Список литературы

# ***Введение***

Туберкулез - и ровесник человечества, и его страшный бич на протяжении тысячелетий. Причина возникновения туберкулеза кроется в бактерии, которую в 1882 году открыл немецкий ученый Роберт Кох. Она чрезвычайно устойчива и поэтому часами сохраняется в воздухе, месяцами - в водной среде, не одномоментно гибнет при кипячении и дезинфекции. Туберкулезом может заболеть любой и где угодно. Распространенность туберкулеза, его устойчивость к лекарствам является вызовом современной системе здравоохранения и каждому из нас.

В целом по республике последние годы отмечается положительная динамика эпидемиологических показателей по туберкулезу. В Беларуси в прошлом году заболели туберкулезом на несколько человек меньше, чем в 2008 году, но при этом на 800 человек меньше, чем в 2004 году. За пять лет более чем вдвое (с 156 до 72) уменьшилось количество заболевших туберкулезом детей в возрасте до 18 лет. За пятилетие показатель заболеваемости туберкулезом в стране снизился на 12%. Смертность от туберкулеза по сравнению с 2005 годом уменьшилась на 33,1%, в том числе в прошлом году - на 5,8%. Улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу стало возможным благодаря усилению внимания к этой проблеме со стороны и общества, и государства.

В прошлом году успешно завершена Государственная программа "Туберкулез" на 2005-2009 годы, в рамках которой профинансированы противотуберкулезные мероприятия более чем на Br100 млрд. Реализована первая фаза проекта ПРООН по поддержке госпрограммы "Туберкулез", финансируемого за счет гранта Глобального фонда по борьбе со СПИДом, туберкулезом, малярией.

В последние годы удалось существенно оптимизировать диагностику и лечение туберкулеза, улучшить оказание противотуберкулезной помощи пациентам, а также усилить мониторинг и контроль за деятельностью региональных противотуберкулезных организаций и в целом за эпидситуацией по туберкулезу.

На базе РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии создана республиканская референс-лаборатория по бактериологической диагностике туберкулеза. В прошлом году начата реструктуризация бактериологических лабораторий в противотуберкулезных учреждениях и организация центров микроскопии на базе организаций общелечебной сети. В результате создана трехуровневая система лабораторной службы. Лаборатории первого уровня проводят микроскопическое исследование мазков мокроты, второго уровня - микроскопические и бактериологические исследования с определением чувствительности возбудителя к противотуберкулезным лекарственным средствам основного ряда, лаборатории третьего уровня определяют чувствительность микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным лекарственным средствам основного и резервного ряда.

За последние годы лаборатории, диагностирующие туберкулез, оснащены современным оборудованием и расходными материалами на сумму более Br4,5 млрд., включая автоматизированные системы для ускоренной бактериологической диагностики возбудителя туберкулеза (BACTEC MGIT-960), которые позволяют в 2,5 раза сократить время получения результатов исследований по сравнению с обычным посевом на плотные питательные среды.

В последние годы в практику противотуберкулезных организаций внедряются новые диагностические и лечебные технологии. Так, в прошлом году в РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии впервые внедрен Hain-test (Хаин-тест) - экспресс-метод молекулярно-генетической диагностики множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, который также позволяет проводить дифференциацию между нетуберкулезными микобактериями и вакцинным штаммом МБТ. По новой госпрограмме "Туберкулез 2010-2014" планируется внедрение этой технологии во всех областных противотуберкулезных диспансерах.

В 2009 г. совместно с РНПЦ эпидемиологии и микробиологии разработана отечественная тест-система для молекулярно-генетической диагностики мультирезистентного туберкулеза. В настоящее время на базе центра проходят клинические испытания этой системы, которая в перспективе будет внедрена в работу противотуберкулезной службы. []

Исходя из вышесказанного, можно сделать выводы, что туберкулез является довольно серьезным заболеванием в нашей стране. И для нас немаловажно знать, как с ним бороться: своевременно и точно устанавливать диагноз, правильно и эффективно лечить. "Золотым стандартом" в диагностике туберкулеза является выделение культуры МБТ с помощью посева на плотные питательные среды. Наиболее распространенной является среда Левенштейна-Йенсена. Особенностью метода является то, что в данном случае исследование занимает 2-3 месяца.

В связи с тем, что традиционное бактериологическое исследование является довольно продолжительным, в последнее время получили развитие высокочувствительные методы микобактериальной диагностики туберкулеза, биохимические, радиохимические и другие. Однако использование традиционных методов не позволяет во всех случаях активного туберкулезного воспаления выявить микобактерии туберкулеза из диагностического материала. В настоящее время значительные достижения получены в результате молекулярно-генетических исследований. В диагностике туберкулеза разработаны и внедрены автоматизированные системы с использованием жидких сред. []

Применение автоматизированных систем с использованием жидких сред - Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) или BacT/Alert 3D (BioMerieux) - сокращает время обнаружения возбудителя до 2-3 нед. Определение чувствительности МБТ к ПТП первого ряда продлевает время анализа еще на 1-3 нед, и чаще всего больным назначают ПТП независимо от того, каким по лекарственной чувствительности штаммом они заражены, хотя подбор схемы лечения с учетом характера устойчивости МБТ у больного в значительной степени определяет ее эффективность.

диагностика туберкулез автоматизированная система

# ***Глава 1. Современная диагностика туберкулеза***

Принципиальное решение проблемы быстрого обнаружения, идентификации возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности было найдено в результате разработки технологии биологических микрочипов.

Идея создания биологического микрочипа возникла еще в конце 1980-х гг. одновременно в Великобритании, Югославии и СССР. В Советском Союзе эти работы были инициированы и проводились под руководством выдающегося ученого, академика А.Д. Мирзабекова, который не боялся разрабатывать принципиально новые направления, даже когда результат было трудно предугадать. Технология биологических микрочипов была последним и любимым "детищем" Мирзабекова, когда он возглавлял Институт молекулярной биологии им.В.А. Энгельгардта РАН и заведовал лабораторией биочипов. Суть этой технологии заключается в следующем.

Обычно для выявления или количественного анализа какого-либо вещества в окружающей среде или биологическом материале, полученном от пациента, проводят реакцию с реактивом, специфически взаимодействующим с этим веществом. В результате такой реакции образуется вещество с новыми физическими или химическими свойствами, количество которого определяют с помощью анализатора. В случае если образующееся вещество обладает цветом или может светиться под действием возбуждающего света, обнаружение и количественный анализ образовавшегося продукта определяют с помощью спектрофотометров или флуориметров. По количеству образовавшегося продукта судят о наличии и содержании в анализируемом образце того или иного вещества.

По такому же принципу работает и биологический микрочип. Он представляет собой твердую подложку с небольшими ячейками. В каждой ячейке иммобилизовано (закреплено) собственное вещество-реагент, которое служит зондом (щупом, пробой) для проведения той или иной реакции. Все реагенты расположены в определенном порядке и взаимодействуют с анализируемым образцом как ключи с замком. В том месте чипа, где есть соответствие (комплементарность) между молекулами исследуемого вещества и молекулами зонда, образуется новый продукт - дуплекс, который и определяется анализирующим оборудованием. Картина распределения ячеек биочипа, содержащих дуплексы, является индивидуальной характеристикой анализируемого образца.

Существуют биочипы, изготавливаемые методом синтеза зондов непосредственно на подложке. Плотность ячеек в таком чипе очень высока: на площади 1 мм2 может быть расположено более тысячи ячеек, а весь чип содержит миллионы ячеек. Такие биочипы предназначены для анализа крупных фрагментов ДНК, иногда для анализа всего генома организма. Стоимость таких чипов, как и анализирующего оборудования, очень высока. Принципиально другой тип чипов изготавливается путем нанесения раствора, содержащего зонд, на заранее подготовленную, "активированную" поверхность подложки. Такие "специализированные" чипы, имеющие гораздо меньшую плотность (на 1 мм2 расположены десятки ячеек), предназначены для работы с ограниченными фрагментами ДНК. Стоимость таких биочипов гораздо меньше.

Совместные исследования учен РАН - разработчиков технологии биочипов - с сотрудниками Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы (МНПЦБТ) и Центрального научно-исследовательского института туберкулеза РАМН (ЦНИИТ), специалистами в области микробиологии и молекулярной диагностики туберкулеза привели к идее создания биочипа для обнаружения возбудителя туберкулеза и определения его чувствительности к рифампицину и изониазиду (одновременная устойчивость к этим двум препаратам определяется термином "множественная лекарственная устойчивость" - МЛУ).

В настоящее время известно, что резистентность МБТ к изониазиду определяется мутациями в четырех основных генах: katG, inhA, ahpC/oxyR, kasA, а также в менее изученных furA и ndh.

В более 95% случаев резистентность МБТ к рифампицину у больных туберкулезом обусловлена мутациями в коротком фрагменте (81 пара нуклеотидов) гена rpoB, кодирующего β-субъединицу РНК-полимеразы МБТ.

Работы по созданию такого биочипа были начаты в 1997 г. Разработанный биочип позволяет в течение суток обнаружить в образце, полученном от пациента, наличие возбудителя туберкулеза и выявить его лекарственную чувствительность. В 2004 г., после клинико-диагностических испытаний, проведенных в МНПЦБТ и ЦНИИТ, тест-система "ТБ-БИОЧИП" и прибор для обработки результатов анализа получили Государственную регистрацию в Федеральной службе РФ по надзору в сфере здравоохранения и социального развития.

"ТБ-БИОЧИП" представляет возможность параллельного выявления чувствительности МБТ к рифампицину и изониазиду с определением 29 типов мутаций по гену rpoB и 19 типов мутаций по генам katG, oxyR, inhA, обнаруживая не менее 95% рифампицин - и более 80% изониазидустойчивых штаммов. Более того, как показали исследования профессора И.Р. Дорожковой в МНПЦБТ, с помощью этой тестсистемы можно определять лекарственную чувствительность к рифампицину и изониазиду у L-форм Mycobacterium tuberculosis.

Таким образом, сегодня фтизиатры имеют уникальный инструмент для определения лекарственной чувствительности МБТ непосредственно после поступления больного туберкулезом в клинику, что позволяет немедленно начать направленную противотуберкулезную терапию и уменьшить риск внутрибольничного заражения туберкулезом. Эта же тест-система может быть использована для контроля эффективности применяемой терапии и своевременного обнаружения у пациента лекарственно устойчивых МБТ.

К тому же возможности разработки новых биочипов для идентификации микобактерий, контроля проводимого лечения далеко не исчерпаны. В связи с этим лабораторная диагностика туберкулеза стоит на пороге эры молекулярно-биологических методов, имеющих огромные перспективы.

В 1969 г. Деланд и Вагнер разработали методику полуавтоматического определения метаболизма бактерии путем измерения количества CO2, освободившегося в процессе роста, и декарбоксилирования субстрата класса С, введенного в питательную среду. Этот радиометрический способ широко применялся для гемокультур с использованием систем BACTEC 460 ТВ. В 1980 г. данный метод был внедрен для выделения микобактерий из клинических образцов, а также для постановки тестов на лекарственную чувствительность.

Проведен ряд клинических испытаний для сравнения радиометрической системы BACTEC 460 TB с плотной средой в целях первичного посева и тестов на лекарственную чувствительность. Несколько исследований системы BACTEC 460 TB, результаты которых были опубликованы в 1980-1985 гг., продемонстрировали великолепные результаты со значительной экономией времени, особенно в отношении негативных по мазку образцов.

Согласно отчетам, при использовании системы BACTEC 460 TB достигается увеличение случаев положительного роста культуры на 1 5-20% в сравнении с обычными плотными средами (например, Левенштейна-Йенсена), при этом средний период определения положительного роста составляет 8-14 дней в сравнении с 3-5 неделями для плотной среды. Внедрение системы BACTEC 460 TB явилось революционным решением для лабораторных тестов на выявление микобактерий и явилось "золотым стандартом" для выполнения посевов и тестов на чувствительность.

Высокая эффективность системы BACTEC 460 TB обусловлена использованием жидкой среды. Кроме того, для снижения времени выявления к среде добавляется вещество для улучшения роста. После внедрения системы BACTEC 460 TB установлено, что жидкая среда достоверно превосходит плотную в отношении выявления микобактерий, сроков, детекции и тестов на лекарственную чувствительность. Описаны случаи, когда определенные виды микобактерий растут только в жидкой среде. В 1993 г. Центром контроля и профилактики заболеваний рекомендовали каждой клинической лаборатории использовать жидкую среду вместе с плотной для выявления микобактерий. В последующих исследованиях была отмечена растущая тенденция использования жидкой среды для обеспечения быстрой и максимально точной детекции микобактерий в клинических образцах. Однако жидкая среда более восприимчива к контаминации бактериями, которые обычно присутствуют в виде обычной флоры в некоторых клинических образцах, и иногда сохраняются после проведения деконтаминации. Таким образом, добавление антибактериальных препаратов необходимо для подавления контаминации в жидкой среде. В системе BACTEC 460 TB для этих целей применяется комплекс антибактериальных препаратов PANTA™ (полимиксин B, амфотерицин B, налидиксовая кислота, триметоприм, азлоциллин), благодаря которому уровень контаминации снижается до пределов, сопоставимых с плотной средой. Комплекс PANTA также используется в жидких средах, разработанных и появившихся в последние несколько лет.

Одним из недостатков системы BACTEC 460 TB является использование радиоактивного субстрата класса С. Из-за строгих требований к обработке и утилизации радиоактивных веществ, возникла необходимость в разработке методики без использования радиометрических технологий. Компания Becton & Dickinson (BD) разработала новую систему - индикаторную пробирку для выращивания микобактерий Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT™), не использующую радиометрию, но обеспечивающую такие же - быстрые, точные и надежные - методы тестирования, как и BACTEC 460 TB. BBL MGIT™ - система с ручным управлением, а BACTEC MGIT 960 (MGIT 960) - полностью автоматизированная система для роста, детекции микобактерий и тестов на лекарственную чувствительность *M. Tuberculosis*.

# ***1.1 Принцип работы полностью автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 для выявления микобактерий туберкулеза и постановки тестов на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам***

# ***1.1.1 Характеристика питательной среды, используемой в пробирке MGIT***

Содержимое пробирки MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) - это питательный бульон, благодаря которому достигается более эффективное выделение микобактерий и их ускоренный рост. Пробирка содержит 7 мл стерильного питательного бульона Мидлбрук 7H9, в которую перед использованием вносится обогатительная добавка BACTEC MGIT Growth Supplement OADC (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза). Она крайне важна для роста многих микобактерий, особенно бактерий, принадлежащих к группе *M. tuberculosis*. Для предотвращения контаминации необходимо добавить MGIT PANTA.

# ***1.1.2 Принципы детекции и постановки тестов на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам***

Кроме жидкой среды Мидлбрук 7H9, в пробирке MGIT содержатся: бескислородный флюорохром, трис - 4, 7-дифенил-1, 10-фенантролин пентагидрат хлорида рутения, помещенный на дно пробирки и покрытый силиконом. Во время бактериального роста внутри пробирки происходит поглощение свободного кислорода и его замещение углекислым газом. По мере расходования свободного кислорода прекращается ингибирование флюорохрома. Флюоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым светом и автоматически регистрируется фотодатчиками, встроенными в прибор BACTEC 960. Интенсивность свечения прямо пропорциональна уровню расходования кислорода и регистрируете в единицах роста (GU - growth units).

Пробирки MGIT инкубируются при температуре 37°C с последующим анализом, осуществляемым вручную при ультрафиолетовом излучении, либо путем помещения в прибор MGIT 960, где пробирки проходят инкубацию и мониторинг степени флюоресценции каждые 60 минут. Рост микобактерий и других бактерий вызывает усиление флюоресценции. В случае с *M. tuberculosis* в момент положительного посева пробы наблюдается около 105-106 колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1мл среды. Прибор оценивает пробу как отрицательную при отсутствии роста в течение шести недель (42 дня). Рост бактерий также может быть определен визуально в случае неоднородности и/или помутнения среды либо наличия в ней грануловидных или хлопьевидных вкраплений. Рост некоторых нетуберкулезных микобактерий (большинство из них обладает быстрым ростом) приводит к легкой замутненности, в то время как бактерии, вызывающие контаминацию, обычно вызывают выраженную мутность среды.

В основе теста на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза лежит модифицированный метод пропорций. В процессе определения происходит сравнение скорости роста микобактерий туберкулеза - в контрольной пробирке и в пробирках с лекарственными препаратами. Для проведения теста используются специальные держатели для 2, 3, 4, 5 и 8 пробирок. В первую пробирку не вносится лекарственный препарат - контрольную, в остальные пробирки добавляются известные концентрации тестируемых лекарственных препаратов, рост в которых сравнивается с ростом в контрольной пробирке. Если тестируемый лекарственный препарат активен по отношению к выделенным микобактериям, он будет ингибировать рост и подавлять флюоресценцию, при этом в контрольной пробирке рост не ингибируется и, соответственно, уровень флуоресцентности в данной пробирке будет выраженнный. Мониторинг роста осуществляется при помощи прибора BACTEC MGIT 960, который автоматически интерпретирует результаты на наличие чувствительности или резистентности к препарату.

# ***1.1.3 Результаты и отчетность***

Если в инокулируемой пробе присутствуют жизнеспособные микобактерии, они растут в питательной среде и обнаруживаются визуально, а также при помощи флюоресценции. О результатах сообщается только в том случае, если пробирка MGIT определена прибором как положительная и мазок, взятый из этой пробирки, также положителен на КУМ. В редких случаях пробирка MGIT может быть определена прибором как отрицательная, при этом мазок может быть положительный.

В таком случае сообщается о положительных результатах. Отчеты необходимо отсылать сразу после готовности результатов. Если идентификация требует дополнительного времени, о результатах можно сообщить как о культурах, положительных на КУМ, ожидающих идентификации. Предпочтительнее идентифицировать комплекс *M. tuberculosis* молекулярным зондом, при возможности, или другими экспресс-методами; о результатах сообщать сразу после идентификации.

Отчеты о негативных культурах составляются после получения протокола исследования и визуального осмотра негативных пробирок. Контаминированные культуры регистрируются после подтверждения мазком и субкультивированием на кровяном агаре.

*Виды отчетов:*

a. Мазок из пробы (флюорохромное окрашивание или метод Циль-Нильсена) - сообщается о положительном либо отрицательном результате и об использованном методе окрашивания. (В течение 24 часов после получения пробы, по рекомендации Центра контроля и профилактики заболеваний, отчет нужно предоставить).. Культура: положительная (подтверждение - мазок на КУМ). Желательно, после выполнения идентификации - комплекс *M. tuberculosis* или MOTT *bacilli (*по рекомендации Центра контроля и профилактики заболеваний сообщить в течение приблизительно 14 дней). В дальнейшем идентифицировать микобактерии и составить отчет.. По завершении теста на лекарственную чувствительность определяется выявлена ли чувствительность или резистентность к каждому исследуемому препарату и сообщается в течение 28 дней (по рекомендации Центра контроля и профилактики заболеваний).. Культура: отрицательная после подготовки протокола об инкубации (по рекомендации Центра контроля и профилактики заболеваний в течении 42 дней).

*Производительность системы*

По данным исследований, с использованием жидких сред, как правило, вырабатывается больше положительных культур, чем при использовании плотных сред, при этом имеет место значительное сокращение времени выявления положительного роста. Данные многочисленных сравнительных исследований производительности BACTEC MGIT 960, BACTEC 460 TB и обычных плотных сред представлены на научных конференциях и опубликованы в журналах.

# ***1.1.4 Недостатки метода***

a. Невозможность наблюдения структуры и окрашивания колонии в жидкой среде.. Если в процессе деконтаминации и ингибирования добавкой PANTA остается хотя бы одна живая контаминирующая бактерия, она может вызвать заражение всей среды. Контаминация может скрыть рост микобактерий.. Положительную культуру из клинической пробы невозможно соотнести с колониеобразующими единицами (КОЕ), присутствующими в пробе - иногда это используется для определения важной нетуберкулезной инфекции.. Пробирка MGIT, кажущаяся положительной, может содержать смесь культур более одного вида микобактерий. Микобактерии с более быстрым ростом могут вызвать положительную флуоресценцию раньше медленнорастущих микобактерий. Поэтому в случае признаков наличия более одного вида микобактерий в мазке на КУМ, взятом из культуры, большую роль играет субкультивирование положительной пробирки MGIT на агарной пластинке Мидлбрука.. Иногда высокая конечная рН пробы может вызвать ложную кратковременную флуоресценцию датчика.. Смесь антибиотиков PANTA, необходимая для подавления контаминирующих бактерий, может также оказывать ингибирующий эффект на некоторые виды микобактерий помимо комплекса *M. tuberculosis*. Подобное ингибирование различно у разных видов бактерий и происходит в рамках одного вида. Однако общее выделение нетуберкулезных бактерий достигается на более высоком уровне в жидкой среде, нежели в плотной.

# ***1.1.5 Тесты на лекарственную чувствительность к препаратам первого ряда: стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол (SIRE)***

Тесты на чувствительность к антибактериальным препаратам имеют исключительную важность для назначения эффективного лечения, особенно в случаях обнаружения лекарственной резистентности к противотуберкулезным препаратам. Они также важны для последующей коррекции антибактериальной терапии, в случае ее неэффективности.

Тест на чувствительность к препаратам - стрептомицину (S), изониазиду (I), рифампицину (R) и этамбутолу (E), сокращенно SIRE, проводимый при помощи прибора BACTEC MGIT 960, представляет собой быстрый и качественный метод определения чувствительности *M. tuberculosis* к четырем указанным лекарственным средствам в критически допустимых концентрациях. Кроме того, при необходимости можно проводить тесты с высокой концентрацией стрептомицина, изониазида и этамбутола.

# ***1.1.5.1 Принципы проведения теста***

Культуры, выделенные от пациентов, больных туберкулезом, выращиваются с добавлением известной концентрации тестового лекарственного препарата. Также используется контрольная пробирка без добавления лекарственного средства. Если изолят больного растет на контрольной пробирке, но не растет в среде с добавлением лекарственного препарата, он определяется как чувствительный к данному препарату. С другой стороны, если он растет в обеих пробирках, тем самым устанавливается его резистентность к указанному препарату.

Существуют несколько методов проведения теста на чувствительность, самый распространенный - метод пропорций. В таком методе резистентность для большинства лекарственных средств устанавливается на уровне 1 %. Это означает, что если общая тестируемая бактериальная популяция 1 % или более резистентна к лекарственному средству, она считается резистентной в клинических целях. На протяжении длительного времени в методе пропорций используется плотная агаровая среда Мидлбрук. После 3-4 недель инкубации для определения резистентности на среде, содержащей лекарственный препарат, подсчитывается процент колоний по сравнению со средой, в которой отсутствуют лекарственные препараты.

В 1980 г. был внедрен метод пропорции на основе бульона, известный под названием - радиометрический тест на чувствительность BACTEC 460 TB. В этом методе используется радиометрическая среда BACTEC 12B с субстратом класса C14.

Бактериальный инокулят в контрольном образце в 100 раз меньше инокулята в содержащей лекарственный препарат среде. CO2, образующийся во время роста и метаболизма микобактерий в такой среде, измеряется и обозначается как индекс роста (Growth Index - GI). Как только GI в контрольном образце достигает значения 30 (обычно после 4-6 дней инкубации - максимум 1 2 дней), сравнение показателей GI в содержащей лекарственный препарат среде и не содержащей его является основой пропорции резистентности.

Тест на чувствительность с использованием BACTEC MGIT 960 был внедрен на основе аналогичных принципов, при этом увеличение флуоресценции в датчике измеряется автоматически и обозначается как значение роста (Growth Value - GV).

Если лекарственный препарат добавляется в среду, обладающую бактериостатическими или бактерицидными свойствами по отношению к тестируемым микобактериям, он ингибирует рост, таким образом, кислород поглощается либо в малых количествах, либо не поглощается совсем, поэтому отсутствует флуоресценция датчика. Результаты теста на лекарственную чувствительность, полученные при использовании системы BACTEC MGIT 960, идентичны данным, получаемым при помощи системы BACTEC 460TB, длительность исследования также примерно одинаковая. Концентрации лекарственных препаратов в тесте на чувствительность SIRE с использованием BACTEC MGIT 960 несколько ниже, чем в методе пропорций на плотной среде (во избежание ложных результатов чувствительности).

Тест на чувствительность BACTEC MGIT 960 был подвергнут детальной оценке путем сравнения со средой Мидлбрук 7H10, а также с системой BACTEC 460 TB System.

# ***1.1.5.2 Тесты, применяемые при более высоких концентрациях лекарственных препаратов***

Рекомендуется всегда тестировать лекарственные препараты ряда SIRE в критических концентрациях. Однако в некоторых ситуациях показано тестирование при более высокой концентрации. Оно играет роль для изолятов, имеющих низкий уровень резистентности, т.е. изолят проявляет резистентность при предельной концентрации, но чувствителен к высокой концентрации препарата. Поэтому во многих лабораториях сначала проводится тест при критической концентрации препарата, и в случае резистентности изолята он тестируется при высокой концентрации.

При высоких концентрациях тестируют только стрептомицин, изониазид и этамбутол. Из трех данных препаратов изониазид наиболее важен, поскольку врачи-клиницисты могут посчитать необходимым продолжить использование изониазида в терапевтическом режиме, если выделенная культура пациента резистентна при критической концентрации и чувствительна при высокой концентрации (т. н. "резистентность низкого уровня"). В продаже имеются указанные высокие концентрации стрептомицина, изониазида и этамбутола для BACTEC MGIT 960.

Конечная концентрация препарата в среде должна быть следующей:

стрептомицин 4,0 мг/мл среды

изониазид 0,4 мг/мл среды

этамбутол 7,5 мг/мл среды

# ***1.1.5.3 Учет результатов***

По завершении теста (4-21 день) на приборе появится сообщение о готовности результатов. Необходимо просканируйте штрих-код держателя и распечатать отчет. В распечатке прибора указаны результаты теста на чувствительность к каждому лекарственному препарату. Результаты имеют качественный характер: чувствительный (S),резистентный (R), либо результат теста не определен (X).

Прибор интерпретирует результаты, когда единица роста (GU) в контроле роста достигает значения 400 (в течение 4-13 дней). В этот момент оцениваются показатели единицы роста флакона с лекарственным препаратом.чувствительный - единица роста пробирки с лекарственным препаратом составляет менее 100.резистентный - единица роста пробирки с лекарственным препаратом составляет 100 и более.ошибка - неясные результаты, получаемые при определенных обстоятельствах, которые могут повлиять на процедуру теста, например, при достижении единицей роста контрольного образца величины ≥400 менее чем за 4 дня. В подобных случаях тест необходимо повторить с чистой, активнорастущей культурой, которая подтверждена как комплекс *M. tuberculosis*. Некоторые лекарственноустойчивые штаммы растут в среде очень медленно, и со стандартным инокулятом результаты могут быть не достигнуты в течение 13 дней. В таком случае необходимо также повторить исследование.

# ***Глава 2. Материалы и методы исследования***

Работа проводилась на базе бактериологической лаборатории Гомельской областной туберкулёзной клинической больницы (ГОТКБ).

В основу работы положены результаты 777 лабораторных исследований мокроты от больных с подозрением на туберкулез легких, направленных в бактериологическую лабораторию в период с мая 2009 г. по апрель 2010 г.

Основными задачами исследования была сравнительная оценка:

высеваемости МБТ на плотной среде Левенштейна-Йенсена и на жидкой среде с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960;

длительности микробиологического исследования на плотной среде и на BACTEC MGIT 960;

определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП на плотной среде Левенштейна - Йенсена и на жидкой среде с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960;

контаминации проб на плотной и жидкой питательных средах.

# ***2.1 Материалы исследования***

Образцы мокроты были взяты от больных с подозрением на туберкулез легких (777 проб) и направлены в бактериологическую лабораторию ГОТКБ. Основным критерием отбора проб являлся одновременный посев полученного материала на плотную (Левенштейна-Йенсена) и жидкую (BACTEC MGIT 960) среды.

Всего в ходе работы исследовано 777 (708 проб для оценки высеваемости и 69 проб для определения лекарственной чувствительности) образцов мокроты.

Для исследования применялись:

. реактивы для приготовления питательной среды Левенштейна-Йенсена (приказ МЗ СССР № 558 от 08.06.78), реактивы из набора BACTEC MGIT 960.

2. аппараты для свертывания и инактивации сыворотки (АСИС).

. Реактивы, использованные для деконтаминации мокроты в соответствии с инструкцией №787 от 29.08.07. по организации определения лекарственной чувствительности микобактерии туберкулёза.

. Противотуберкулезные препараты для определения лекарственной устойчивости: изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол.

# ***2.2 Методы исследования***

Применялись следующие методы исследования:

. Бактериологические методы: выделение МБТ, определение лекарственной чувствительности МБТ к ПТП.

2. Метод абсолютных концентраций для определения лекарственной чувствительности штаммов МБТ к противотуберкулезным препаратам. Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам основного ряда с использованием автоматизированных систем (BACTEC MGIT 960) среды.

# ***2.2.1 Предварительная обработка мокроты***

**Обработка мокроты 10% раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия**

Трехзамещенный фосфорнокислый натрий (*Na3PO4*) хорошо подавляет сопутствующую флору и даже при 2-3-х-дневном хранении материала при +4°С не повреждает микобактерии и мало влияет на их способность к росту на питательных средах.

Обработку материала 10% раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия производят следующим образом:

Исследуемый материал, находящийся в стерильном флаконе, заливают равным объемом 10% трехзамещенного фосфата натрия и помещают на 10 мин во встряхиватель, затем на 18-20 часов - в термостат при 37°C. После этого материал центрифугируют при 3000*g* в течение 15 минут. При указанном режиме происходит осаждение 95% присутствующих в материале микобактерий.

Надосадочную жидкость отбирают, осадок отмывают 10-15 мл изотонического раствора *NaCl* или дистиллированной воды.

Супернатант удаляют, а осадок в объеме 0,8-1,0 мл засевают на питательную среду с параллельным приготовлением мазка.

**Обработка с использованием N-ацетил-l-цистеина и гидроокиси натрия (NALC-NаOH).**

Применение муколитического препарата *N*-ацетил-*L*-цистеина (*NALC*), используемого для быстрого разжижения мокроты, позволяет снизить концентрацию деконтаминирующего вещества (NaOH) до конечной концентрации 1% при смешивании с пробой. Этот метод повышает высеваемость микобактерий, однако требует больше затрат времени и средств. Ацетилцистеин в растворе быстро теряет активность, поэтому раствор нужно готовить ежедневно. Цитрат натрия включен в литическую смесь для связывания ионов тяжелых металлов, которые могут присутствовать в пробе и инактивировать действие *N*-ацетил-*L*-цистеина.

Обработку материала NALC-NаOH производят следующим образом:

К 10 мл или меньше диагностического материала добавляют равный объем раствора NALC-NаOH, встряхивают в течение 10-20 секунд для перемешивания пробы, затем оставляют на 15 минут при комнатной температуре. Если необходима более эффективная деконтаминация, можно повысить концентрацию NaOH до 5-6%, не увеличивая время экспозиции пробы с деконтаминирующим раствором.

После 15-минутной экспозиции доводят объем пробы до 50 мл дистиллированной водой, перемешивают и центрифугируют при 3000*g* в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отбирают. Осадок немедленно засевают на питательную среду с параллельным приготовлением мазка.

# ***2.2.2 Приготовлениее яичных сред и посев на них***

**Среда Левенштейна-Йенсена**

Среда Левенштейна-Йенсена применяется во всем мире в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности. Эта среда рекомендуется для использования всеми микробиологическими лабораториями противотуберкулезной службы Республики Беларусь для получения сравнимых результатов. Это плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерий туберкулеза получают на 15-25-й день после посева микроскопически положительного материала. В состав этой питательной среды входит глицерин, который способствует росту *M. tuberculosis*.

***Состав среды:***

*Раствор минеральных солей:*

Калий однозамещенный фосфорнокислый - 2,4 г,

Магний лимоннокислый - 0,24 г

Магний сернокислый - 0,6 г

*L*-аспарагин - 3,6 г

Глицерин - 12,0 мл

Вода дистиллированная - 600 мл

Ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Затем стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. (112°С) в течение 30 минут. Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

*Раствор малахитового зеленого:*

Малахитовый зеленый - 2 г

Вода дистиллированная - 100 мл

Малахитовый зеленый растворяют в стерильной дистиллированной воде, поместив раствор в термостат на 1-2 часа. Стерилизуют при 0,5 атм. (112°С) в течение 20 минут. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, и при появлении осадка или изменении окраски его следует заменить свежим раствором.

*Яичная масса:*

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, оставляют на 30 мин в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70° этиловый спирт на 30 мин. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20-25 яиц в зависимости от их величины). Тщательно гомогенизируют в стерильном миксере.

*Приготовление среды****.***

В большую стерильную емкость вносят 600 мл раствора минеральных солей, 1000 мл гомогенизированной яичной массы, тщательно перемешивают и фильтруют через четырехслойный стерильный марлевый фильтр. Добавляют 36 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены,разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не образовался осадок. Для предупреждения выпадения осадка пробирки с яичной средой помещают в свертыватель не позже чем через 15 минут после разлива среды.

*Свертывание среды.*

Пробирки с разлитой в них средой помещают в штативы со специально подобранным углом наклона для формирования скошенной среды. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 80°С в течение 45 минут.

*Контроль стерильности:*

После свертывания каждую вновь приготовленную партию среды подвергают контролю на стерильность. Для этого несколько пробирок со средой из партии помещают в термостат и выдерживают в нем 2-3 суток при 37°С.

*Хранение:*

На пробирках с приготовленной партией среды указывают дату изготовления. Среду хранят в холодильнике при 4°С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели

**Процедура посева**

Перед процедурой посева необходимо подготовить пробирки с питательными средами, промаркировать их согласно нумерации анализов в рабочем журнале и последовательно расположить в вертикальном штативе. Аналогичным образом подготовить и промаркировать предметные стекла для приготовления мазков.

В нижней части пробирки со скошенной питательной средой нередко наблюдается образование конденсата. До посева биологического материала этот конденсат желательно удалить. Не следует производить посев на среды, только что вынутые из холодильника. Нужно вынимать их из холодильника заранее, чтобы среда к моменту посева согрелась до комнатной температуры.

Посев диагностического материала производят следующим образом:

– стерильной пипеткой набирают 1,0-1,2 мл полученного после обработки и нейтрализации осадка, оставив приблизительно 0,2 мл для последующего приготовления мазка для микроскопии;

– соблюдая стерильность, вносят равные объемы пробы диагностического материала (примерно по 0,5-0,6 мл) на верхнюю треть скошенной питательной среды в 2 пробирки с разными плотными питательными средами;

– засеянные пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и помещают их в наклонном положении в штатив таким образом, чтобы материал равномерно распределился по всей поверхности питательной среды;

– по завершении посева всех проб засеянные пробирки помещают в термостат при температуре 37°С; наклон штатива должен обеспечивать горизонтальное расположение поверхности питательной среды и исключать смачивание пробки засеянным материалом.

После посева пробирки желательно инкубировать так, чтобы поверхность скошенной среды оставалась горизонтальной - по крайней мере, в течение первых 2-3 суток после посева. Затем ватно-марлевые пробки заменяют герметичными резиновыми или силиконовыми, после чего засеянные пробирки переводят в вертикальное положение.

Микобактерии туберкулеза размножаются чрезвычайно медленно. С этим связана необходимость длительного срока инкубации для получения видимого роста колоний. При первичном посеве микроскопически отрицательного материала средняя продолжительность появления видимого роста микобактерий туберкулеза на плотных питательных средах может составить 20-46 дней. Рост отдельных штаммов появляется через 60 и даже 90 дней. Это обусловливает необходимость выдерживать посевы в термостате до 10 недель для выдачи отрицательного результата при отсутствии роста микобактерий.

# ***2.2.3 Подготовка пробирок и посев образца для автоматизированной системы BACTEC MGIT 960***

Пробирка MGIT 960 содержит модифицированную бульонную основу 7H9. Примерная формула содержит следующие компоненты на 1000 мл дистиллированной воды:

модифицированная бульонная основа Мидлбрук 7H9 - 5,9 г

казеиновый пептон - 1,25 г.

Формула корректируется с возможным внесением добавок в зависимости от функциональных требований. На дне пробирки имеется помещенный в силикон флуоресцентный датчик. Пробирку во время наполнения промывают 10% CO2, затем закрывают полипропиленовой завинчивающейся крышкой. Крышку открывать следует только в случае необходимости внесения каких-либо веществ в среду.

Для системы BACTEC MGIT 960 предусмотрена ростовая добавка MGIT (MGIT Growth Supplement. Добавку необходимо добавлять в пробирку MGIT до инокуляции пробы. В состав ростовой добавки MGIT на 1 000 мл дистиллированной воды входят:

бычий альбумин 50,0 г

декстроза 20,0 г

каталаза 0,03 г

олеиновая кислота 0,1 г

полиоксиэтилена стеарат 1,1 г

Для снижения риска контаминации используется смесь антибиотиков PANTA, которая вносится в пробирку MGIT до инокуляции проб вместе с обогатительной добавкой. Каждый флакон MGIT PANTA (для MGIT 960) содержит лиофилизированную смесь антибактериальных препаратов со следующей концентрацией на момент изготовления:

полимиксин B 6,000 ед.

амфотерицин B 600 мг

налидиксовая кислота 2,400 мг

триметоприм 600 мг

азлоциллин 600 мг

*Процедура подготовки пробирок MGIT и посев образца.. Разведение лиофилизированной добавки PANTA*

Растворить PANTA (добавку с антибиотиками для подавления роста посторонней флоры) в 15 мл обогатительной добавки MGIT Growth Supplement, добавив ее во флакон с PANTA. Оставить на 15 минут.

Добавить 0,8 мл полученного раствора в каждую пробирку MGIT непосредственно перед посевом материала.

Все манипуляции проводить в ламинарном боксе II - класса защиты.

*b. Посев в пробирку MGIT*

Все этапы работы должны выполняться только в ламинарном боксе II - класса защиты.

Внимательно осмотреть пробирку MGIT и убедиться, что она пригодна для работы (наличие силиконового кольца на дне пробирки, объем жидкости - 7 мл, крышка плотно закрыта).

Написать на пробирках идентификационные лабораторные номера.

С помощью стерильной одноразовой пипетки внести 0,5 мл ресуспендированного осадка в подготовленною пробирку MGIT и 0,1-0,25 мл в пробирку с плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена.

Закрыть немедленно после внесения плотно крышку пробирки и аккуратно несколько раз перевернуть пробирку, чтобы перемешать содержимое.

Обработать снаружи пробирки и пробки дезсредством, поместить пробирки в штатив и оставить на 30 минут при комнатной температуре.

Для исключения перекрестной контаминации и поддержания оптимальной концентрации углекислого газа в пробирках, всегда необходимо открывать только одну пробирку на минимально возможное время.

*с. Меры предосторожности*

Основным источником контаминации среды MGIT являются микроорганизмы из окружающей среды, попавшие в пробирку во время внесения добавок и материала, поэтому необходимо соблюдать следующие правила:

. Все добавки вносить только в ламинарном боксе II-класса защиты.

. Не открывать несколько пробирок одновременно.

. Открывать пробирку MGIT на максимально короткое время.

. При внесении ростовой добавки рекомендуется пользоваться дозатором.

. Всегда плотно закручивать крышку. Если она сидит неплотно, могут возникнуть сложности с детекцией флуоресценции.

. Проба, внесенная в пробирку объемом более 0,5 мл, может повлиять на показатель pH среды и вызвать ложную флуоресценцию, а также может усилить контаминацию.

*d. Инкубация*

Все засеянные пробирки MGIT необходимо поместить в прибор. Протокол исследования на автоматизированной системе BACTEC MGIT 960 - 6 недель.

Температура инкубации для микобактерий туберкулеза + 37°С, допустимые колебания температуры от + 35°С до +38°С. В процессе инкубации встряхивание и перемещение пробирок запрещено.

*е. Детекция положительного роста*

О появлении положительной пробирки прибор сообщает появлением красной индикации на наружной панели соответствующего ящика и значка "+", а также звуковым сигналом.

При наличии индикации о положительном результате необходимо открыть указанный ящик; нажать клавишу под иконкой "извлечь положительные пробирки"; извлечь пробирку из указанной прибором ячейки; считать штрих-код извлеченной пробирки.

Следует просмотреть пробирку и визуально определить наличие роста микобактерий. Обычно в жидкой среде микобактерии растут в виде своеобразной "зернистости" или белых хлопьев, при этом прозрачность среды может почти не меняться. Как правило, рост микобактерий сосредоточен на дне пробирки. Сильное помутнение среды может свидетельствовать о наличии контаминации посторонней флорой.

Максимальное время инкубации пробирок в приборе MGIT - 42 дня. Пробирки, в которых размножение микобактерий не зафиксировано прибором в течение указанного времени, идентифицируются системой как отрицательные. В этом случае прибор сообщает появлением зеленой индикации на наружной панели соответствующего ящика и звуковым сигналом.

Для того чтобы извлечь "отрицательные" пробирки, необходимо открыть соответствующий ящик и нажать клавишу под иконкой "извлечь положительные пробирки" - прибор укажет зеленым световым сигналом на те пробирки, которые необходимо удалить. Необходимо извлечь пробирку из ячейки и отсканировать штрих-код, а также просмотреть пробирку, пытаясь визуально определить наличие возможного роста микобактерий и контаминации (мутность, дисперсность и т.д.).

При наличии сомнений в правильности отрицательного результата (наличие мутности, зернистости и т.д.), следует приготовить мазки для микроскопического исследования и произвести посев материала на кровяной агар для контроля контаминации и на среду Левенштейна.

# ***2.2.4 Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам первого ряда на плотных средах***

**Приготовление растворов противотуберкулезных препаратов.**

Для приготовления растворов ПТП должны использоваться только химически чистые субстанции противотуберкулезных препаратов. Лекарственные формы препаратов для определения лекарственной чувствительности микобактерий непригодны. Для приготовления навесок ПТП необходимо использовать аналитические весы или другие равного класса точности. Концентрации рабочих растворов должны учитывать содержание активного начала препарата в используемой химической субстанции, а также фактор разбавления раствора ПТП в питательной среде.

Стрептомицина сульфат 10 мкг/мл

Для определения лекарственной чувствительности к стрептомицину используют порошковидную форму химически чистого вещества стрептомицина сульфата. Содержание активного препарата - 1000 мг в 1 г.

мг стрептомицина сульфата растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл.

Рабочее разведение стрептомицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Изониазид 1 мкг/мл

Для определения лекарственной чувствительности к изониазиду используют порошковидную форму химически чистого вещества изоникотиновой кислоты гидразида. Содержание активного начала препарата - не менее 990 мг в 1 г.

мг изониазида растворяют в 1 мл этилового спирта, затем добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл.

К 1 мл раствора 1 добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе составляет 100 мкг/мл.

Рабочее разведение изониазида добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1мл раствора изониазида к 99 мл среды.

Рифампицин 40 мкг/мл

Для определения лекарственной чувствительности к рифампицину используют порошковидную форму химически чистого вещества рифампицина. Содержание активного начала препарата - не менее 950 мг в 1 г.

Рифампицин не растворим в дистиллированной воде. Навеску препарата растворяют в этиловом спирте.

мг рифампицина растворяют в 5 мл этилового спирта. Концентрация рифампицина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочее разведение рифампицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Этамбутол 2 мкг/мл

Для определения лекарственной чувствительности к этамбутолу используют порошковидную форму химически чистого вещества этамбутола гидрохлорида. Содержание активного начала препарата - 1000 мг в 1 г.

мг этамбутола дигидрохлорида растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 500 мкг/мл.

К 2 мл раствора 1 добавляют 3 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 200 мкг/мл.

Рабочее разведение этамбутола добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

**Приготовление суспензии микобактерий, её стандартизация, инокуляция, инкубирование посевов.**

Выросшую на плотной питательной среде культуру микобактерий (обязательно несколько колоний) снимают стерильной платиновой лопаткой, переносят в стерильную пробирку и растирают стерильной стеклянной палочкой на стенках пробирки, не касаясь дна, в течение 1 минуты. Затем в пробирку добавляют 3 мл стерильного физраствора, аккуратно (чтобы не замочить пробку) встряхивают несколько раз до получения однородной суспензии. Суспензию оставляют на 10 минут для осаждения крупных конгломератов. Полученную суспензию вносят пипеткой по каплям в пробирку с 5 мл стерильного физраствора до достижения концентрации микобактерий 500 млн клеток/мл по оптическому стандарту мутности с последующим разведением стерильным физраствором в 10 раз. Инокуляция не стандартизованной смеси дает отклонение от истинного результата. Необходимо микроскопически контролировать приготовленную суспензию в мазке по Цилю-Нильсену для оценки качества дезинтеграции колоний и исключения наличия плотной среды во взвеси.

Засевают 0,2 мл суспензии на пробирку. В пробирке должно быть небольшое количество конденсационной жидкости. Если ее нет, то допустимо при соблюдении правил стерильности добавить в каждую пробирку несколько капель физиологического раствора.

После посева пробирки помещают в термостат при 37°С в наклонном положении, так, чтобы поверхность среды располагалась горизонтально, для того, чтобы равномерно распределить суспензию микобактерий по поверхности среды. Через 2-3 суток инкубации пробирки закрывают резиновыми пробками и переводят в вертикальное положение.

**Учет и интерпретация результатов.**

Пробирки с посевами инкубируют в течение 3-4 недель, еженедельно просматривая, отмечают время появления видимого роста, обильность роста в контрольных и опытных пробирках, контаминацию пробирок и т.д. Учет результатов определения лекарственной чувствительности проводят после 3 недель инкубирования. Поскольку сроки выделения возбудителя на яичных питательных средах составляют не менее 1 - 1,5 месяца, результат определения лекарственной чувствительности МБТ указанным методом обычно получают не ранее чем через 2 - 2,5 месяца после посева.

Штамм микобактерий считается чувствительным к препарату в случае присутствия в популяции менее 1% резистентных микобактерий, то есть роста 20 колоний и менее на среде с препаратом при обильном росте в контроле. Штамм микобактерий считается устойчивым к препарату в случае присутствия в популяции более 1% резистентных микобактерий, то есть роста более 20 колоний на среде с препаратом при обильном росте в контроле. В случае скудного роста в контроле исследование необходимо повторить.

# ***2.2.5 Определение лекарственной чувствительности МБТ к препаратам первого ряда с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960***

В состав набора BACTEC MGIT 960 SIRE Kit для критически допустимых концентраций входят указанные ниже препараты в лиофилизированной форме. Каждый набор содержит по одному флакону S, I, R и E (стрептомицин - S, изониазид - I, рифампицин - R, этамбутол - E), а также 8 флаконов ростовой добавки MGIT 960 SIRE.

**Лекарственные препараты**

стрептомицин: 332мг

изониазид: 33.2 мг

рифампицин: 332 мг

этамбутол: 1660 мг

**Методика исследования**

*a. Разведение лиофилизированных лекарственных препаратов*

Все процедуры по растворению и добавлению препаратов необходимо выполнять в ламинарном боксе II-класса защиты!

Для получения указанных концентраций следует разводить лиофилизированные лекарственные препараты 4 мл стерильной деионизированной или дистиллированной воды.

*b. Добавление лекарственного препарата в пробирку со средой*

При помощи автоматической пипетки со стерильным наконечником добавляется по 100 мкл (0,1 мл) раствора препарата в соответственно промаркированные пробирки MGIT.

Содержание препаратов в питательной среде (критические концентрации):

Стрептомицин (STR) 1,0 мкг/мл пит. среды

Изониазид (INH) 0,1 мкг/мл пит. среды

Рифампицин (RIF) 1,0 мкг/мл пит. среды

Этамбутол (EMB) 5,0 мкг/мл пит. среды

*c. Подготовка инокулята. Посев и инкубация*

**Приготовление микобактериальной суспензии из положительной пробирки MGIT.**

Для правильного определения лекарственной чувствительности концентрация МБТ в инокуляте должна находиться в определенных пределах. Поэтому важным фактором является "возраст" культуры в днях, прошедших от момента индикации "положительной" пробирки в системе MGIT.

. День, в который данная культура была впервые определена системой как положительная, считается "НУЛЕВЫМ" ("день 0").

. Для получения культуры, пригодной к дальнейшим тестам на ЛУ, пробирку необходимо инкубировать в системе BACTEC по меньшей мере еще сутки (т.е. до "дня 1 "). Если прибор загружен и дополнительное время сдерживает

его производительность, пробирка может быть удалена из системы после "дня 0" и культивироваться в последующие дни в термостате при температуре 37°С.

. Культура является пригодной для посева на ЛУ в течение 5 дней, следующих за "днем 0" (т.е. в течение дней: от 1 до 5). Если культура инкубировалась в системе или термостате более 5 дней после сообщения о положительном результате (т.е. начиная с "дня 6" и далее), она непригодна к проведению теста на лекарственную чувствительность в системе MGIT, ее необходимо субкультивировать, т.е.0,5 мл этой культуры посеять в новую пробирку MGIT.

Процедуры подготовки суспензии для постановки теста на лекарственную чувствительность различаются в зависимости от "возраста" культуры.

*Для культуры в "возрасте" 1-2 дня*

1. Энергично встряхнуть пробирку для гомогенизации и измельчения имеющихся сгустков (скоплений микобактерий).

. Оставить пробирку на 5-10 мин для осаждения крупных частиц.

. Использовать надосадочную жидкость для инокуляции пробирок с препаратами.

*Для культур в "возрасте" 3, 4, 5 дней со дня положительной индикации роста*

1. Энергично встряхнуть пробирку для гомогенизации и измельчения имеющихся сгустков (скоплений микобактерий).

. Оставить пробирку в вертикальном положении на 5-10 минут для осаждения крупных частиц.

. В отдельную стерильную пробирку поместить 1 мл надосадочной жидкости и развести ее 4 мл стерильного изотонического раствора NaCl, получив таким образом разведение 1: 5.

. Использовать его для инокуляции в пробирке с препаратами.

**Приготовление микобактериальной суспензии из культуры выращенной на плотной питательной среде**

Для постановки теста на лекарственную чувствительность используется культура с плотной питательной средой Левенштейна-Йенсена не "старше" 15 дней с момента появления роста микроколоний микобактерий. Более "старые", как и совсем "молодые" культуры, снижают достоверность результатов определения лекарственной чувствительности МБТ.

**Подготовка суспензии культуры МБТ для посева в пробирки MGIT с препаратами.**

1. В стерильную стеклянную пробирку добавить 4 мл среды BBL Middlebrook 7H9 (или 4 мл физ. раствора) и поместить также 8-10 бусин из боросиликатного стекла диаметром 3 мм.

. С помощью микробиологической петли (можно использовать стерильный шпатель или деревянный аппликатор) собрать как можно больше колоний с поверхности среды. Избегать снятия самой среды.

. Перенести собранные колонии в пробирку с питательной средой (физраствором) и стеклянными бусинами. Плотно закрыть пробку и ресуспендировать на "Вортексе" в течение 1 - 3 минут для полного измельчения сгустков.

. Проконтролировать мутность суспензии по стандарту мутности *McFarland (*мутность суспензии должна быть более 1,0).

. Оставить пробирку с суспензией на столе на 20 минут для осаждения крупных частиц.

. Аккуратно перенести надосадочную жидкость пипеткой в другую стерильную пробирку, не касаясь осадка на дне пробирки. Оставить пробирку с надосадочной жидкостью в вертикальном положении на 15 минут для осаждения всех оставшихся крупных частиц.

. Аккуратно перенести надосадочную жидкость в следующую стерильную пробирку, не касаясь осадка.

. Проконтролировать мутность полученной суспензии по стандарту мутности *McFarland (*она должна быть больше 0,5 ед.). Довести мутность суспензии точно до 0,5 ед путем добавления в пробирку стерильного физраствора.

. Развести полученную суспензию в соотношении 1: 5 стерильным физраствором. Для этого перенести 1 мл полученной микобактериальной суспензии в пробирку с 4 мл стерильного физраствора и ресуспендировать. Использовать полученное разведение (1: 5) для инокуляции в пробирки MGIT с препаратами.

**Посев и инкубация**

1. Пронумеровать 5 пробирок MGIT: 1 - контроль (GC), 2 - стрептомицин (STR), 3 - изониазид (INH), 4 - рифампицин (RIF), 5 - этамбутол (EMB).

. В асептических условиях (ламинарный бокс II-класса защиты) внести в каждую пробирку 0,8 мл обогатительной добавки BACTEC 960 SIRE.

. Добавить по 0,1 мл разведенного лекарственного препарата в соответствующую пробирку при помощи автоматической пипетки, пользуясь отдельным стерильным наконечником для каждого препарата.

. Внести 0,5 мл микобактериальной суспензии, приготовленной одним из способов, в пробирки, содержащие лекарственные препараты, используя стерильную одноразовую пипетку. Не инокулировать контрольную пробирку!

. Для посева в контрольную пробирку, использовать разведение тестовой суспензии 1: 100. Для этого 0,1 мл тестовой суспензии развести в 10 мл стерильного физраствора, закрыть крышку и перемешать содержимое, переворачивая пробирку 5-6 раз.0,5 мл полученной суспензии внести в контрольную пробирку.

. Плотно закрутить крышки пробирок, перевернуть каждую пробирку несколько раз (чтобы перемешать содержимое) и оставить на некоторое время.

. Поместить засеянные пробирки на специальные держатели для постановки лекарственной чувствительности в строгой последовательности: GC, STR, INH, RIF, EMB.

. Далее открыть секцию прибора BACTEC MGIT 960, нажать клавишу под иконкой "внести пробирки", считать штрих-код держателя и установить пробирки вместе с держателем в станции, которые укажет прибор зеленым свечением.

Не перемещать пробирки во время тестирования.

. Проверить чистоту инокулята, сделав посев каплей культурной суспензии на чашку с кровяным агаром. При отсутствии чашки с кровяным агаром использовать шоколадный агар BHI. Инкубировать и проверить рост через 48 часов. Если на чашке с посевом заметны следы роста, прервать тест на чувствительность и не использовать его результаты. Повторить тест после получения чистой культуры.

# ***Глава 3. Результаты собственных исследований***

# ***3.1 Сравнительная характеристика высеваемости МБТ на плотной среде и на BACTEC MGIT 960***

Для исследования были отобраны 622 пробы мокроты. Данные пробы парно высевались на плотную и жидкую среду в один и тот же день или с разницей в одни сутки. Получены следующие результаты:

из 622 исследованных проб мокроты по данным BACTEC MGIT 960 было выдано 379 положительных результатов и 245 отрицательных;

из 622 исследованных проб мокроты по данным посевов на плотную питательную среду было выдано 295 положительных и 327 отрицательных результатов.

***Таблица 1.* Результаты микробиологического исследования**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Плотная среда* | *BACTEC MGIT 960*  | *Совпадения*  |
| *Отрицательные результаты* | 327 (53%)  | 245 (39%)  | 228 (46%)  |
| *Положительные результаты* | 295 (47%)  | 379 (61%)  | 273 (54%)  |
| *Всего* | 622 (100%)  | 622 (100%)  | 501 (81%)  |

Из данных таблицы 1 можно сделать следующие выводы:

Культивирование МБТ при помощи BACTEC MGIT 960 является более чувствительным методом по сравнению с культивированием на плотной среде, поскольку дает большее количество положительных результатов (на 14%);

Но BACTEC MGIT 960 нельзя использовать как самостоятельный диагностический тест для выявления туберкулеза, так как совпадение результатов исследования на обеих средах наблюдается только в 81% случаев.

***Таблица 2.* Продолжительность микробиологического исследования**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | *Плотная среда* | *BACTEC MGIT 960*  |
| *Положительные результаты* | 295 | 379 |
| *Средняя продолжительность одного исследования* | 38±4,2 дней | 16± 2,5 дней |

Из данных таблицы 2 следует, что микробиологическое исследование с использованием BACTEC MGIT 960 занимает в 2,4 меньше времени, чем аналогичное исследование на плотной питательной среде. Это имеет немаловажное значение при постановке диагноза и своевременном начале лечения.

# ***3.2 Сравнительная характеристика определения лекарственной чувствительности МБТ на плотной среде и на BACTEC MGIT 960***

Для исследования были отобраны 69 проб. Это парные пробы (мокрота от одного больного одновременно засевается на плотную и жидкую питательную среду). Затем было проведено сравнение на совпадение результатов высеваемости на обеих средах. Результаты отражены в таблицах 3 и 4.

***Таблица 3.* Сравнение результатов, полученных методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и на системе BACTEC MGIT****960**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  ПТП | Количество исследований | Плотная среда | BACTEC MGIT 960  | Совпадения |
|  |  | Отрицательные результаты\* | Положительные результаты\* | Отрицательные результаты\* | Положительные результаты\* |  |
| Изониазид | 69 | 11 | 58 | 7 | 62 | 60 (87%)  |
| Стрептомицин | 69 | 13 | 56 | 8 | 61 | 62 (90%)  |
| Рифампицин | 57 | 17 | 40 | 10 | 47 | 49 (86%)  |
| Этамбутол | 69 | 31 | 38 | 17 | 52 | 48 (70%)  |

*Примечание:* Отрицательные результаты\* - МБТ чувствительна к данному ПТП; Положительные результаты\* - МБТ устойчива к данному ПТП.



***Рисунок 4.* Результаты определения лекарственной чувствительности на плотной среде**

*Примечание:* I - изониазид; S - стрептомицин; R - рифампицин; E - этамбутол.



***Рисунок 5.* Результаты определения лекарственной чувствительности на BACTEC MGIT 960**

*Примечание:* I - изониазид; S - стрептомицин; R - рифампицин; E - этамбутол.

***Таблица 4.* Сравнительная характеристика определения лекарственной чувствительности на BACTEC MGIT 960 с международным стандартом**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ПТП | Совпадения результатов на плотной среде и BACTEC MGIT 960 | Международный стандарт |
| Изониазид | 60 (87%)  | 86-100% |
| Стрептомицин | 62 (90%)  | 82-100% |
| Рифампицин | 49 (86%)  | 73-98% |
| Этамбутол | 48 (70%)  | 59-93% |

Международный стандарт является индикатором качества определения лекарственной устойчивости МБТ на BACTEC MGIT 960. Исходя из данных, приведенных выше, можно сделать вывод, что BACTEC MGIT 960 можно использовать в качестве диагностического теста на чувствительность МБТ к ПТП, поскольку его результаты являются весьма достоверными.

# ***3.3 Сравнительная характеристика контаминации проб на плотной и жидкой питательных средах***

Для исследования были отобраны 86 (из 708 исследованных) контаминированных проб. Пробы парные и были взяты в один день. Получены следующие результаты:

на жидкой среде контаминировано 49 проб (7%);

на плотной среде контаминировано 37 проб (5%)

Таким образом установлено, что жидкая среда контаминируется чаще плотной. Это связано с тем, что жидкая среда обладает лучшими культуральными свойствами по сравнению с плотной средой. Но это одновременно является и ее недостатком, поскольку диагностические пробы чаще являются непригодными для исследования в связи с их загрязнением посторонней микрофлорой.

# ***Заключение***

Проанализировав данные, приведенные выше в результатах собственных исследований, можно сделать следующие выводы:

. При микробиологическом исследовании мокроты от больных с подозрением на туберкулез легких более высокая высеваемость МБТ наблюдается на жидких средах, чем на плотных. Кроме того, период тестирования образца на автоматизированной системе BACTEC MGIT 960 занимает значительно меньше времени, чем на среде Левенштейна-Йенсена (в среднем 16 дней вместо 38 дней в случае положительного результата; и 42 дня вместо 10 недель в случае отрицательного результата). Но имеются и недостатки в использовании BACTEC MGIT 960 - результаты исследований на обеих средах совпадают лишь на 81%.

2. Современные бактериологические способы определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам на жидкой среде с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС 960 дают возможность получить результаты, хорошо сопоставимые с традиционными методами абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Наибольшая согласованность данных наблюдалась для изониазида (87%), рифампицина (86%) и стрептомицина (90%), а наименьшая - для этамбутола (70%). Высокая степень совпадения двух методов по определению лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам первого ряда позволяет рассматривать их как взаимозаменяемые и отдавать предпочтение автоматизированному как более объективному, стандартизованному и ускоренному.

. Успех культурального исследования в значительной степени зависит от качества пробоподготовки. Поступающий в лабораторию диагностический материал должен быть преобразован в гомогенную взвесь, в которой максимально уничтожена любая другая микрофлора, кроме микобактерий. Иначе исследование придется повторить. Особенно данное условие актуально по отношению к жидкой среде, поскольку она чаще подвергается контаминации по сравнению с плотной (7% и 5% соответственно. А это, бесспорно отрицательно сказывается на качестве микробиологического исследования.

Сравнение эффективности использования автоматизированных систем для выявления и определения лекарственной чувствительности МБТ с традиционными методами на плотных средах демонстрирует более высокие диагностические качества. Однако ВАСТЕС 960 также имеет свои недостатки и не может полностью заменить собой применение плотных питательных сред. Метод необходим для составления ориентировочного плана лечения больного с учетом лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам. Поэтому более целесообразно его использование в качестве дополнительного метода в диагностике туберкулеза наряду с традиционными методами.

# ***Список литературы***

1. Голышевская В.И. Современная лабораторная диагностика туберкулеза органов дыхания. / В.И. Голышевская // Пульмонология. - 1999. - №4. - с.89-94.

2. Гуревич Г. Отразить удар палочки Коха/ Г. Гуревич // БЕЛТА [Электронный ресурс]. - 2010. - Режим доступа: http://www.belta. by/ru/actualinterviev? id=503474. - Дата доступа: 22.04.2010.

. Инструкция по организации определения лекарственной чувствительности микобактерии туберкулёза: утв. Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 29 августа 2007 г № 787 // Нац. реестр правовых актов Респ. Беларусь. - 2007. - 2 октября (№ 79) - С.26-34.

. Итруганова О.А. Современные возможности микобактериологической лаборатории. /О.А. Итруганова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2006. - №1. - с.21-35.

. Лекарственно-устойчивые формы туберкулеза: клинико-эпидемиологическое значение, профилактика и методика антибактериальной терапии: Методические рекомендации / НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ; Сост.: Гуревич Г.Л., Борщевский В.В., Богомазаова А.В. и др. - Минск, 1999. - 62с.

. Ломако М.Н. Руководство по фтизиатрии // М.Н. Ломако, С.И. Судник, С.А. Соболь; под ред. М.Н. Ломако. - Минск: Выш. Школа, 1978. - 336 с.

. Микробиологическая диагностика туберкулеза/ В.И. Голышевская [и др.] // Вестник Рос АМН. - 1995. - №7. - с.16-18.

. Мороз А. Биочипы для решения задач диагностики туберкулеза/ А. Мороз // Здоровье Украины [Электронный ресурс]. - 2010. - Режим доступа:

http://www.health-ua.org/article/health/2158.html. - Дата доступа: 22.04.2010.

. Пилипчук Н.С. Туберкулез/ Н.С. Пилипчук. - Киев: Вища школа, 1987. - 285 с.

. Поздеев О.К. Медицинская микробиология/ О.К. Поздеев; под ред.В.И. Покровского. - Москва.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. - 768 с.

. Разработка критериев оценки качества и эффективности микробиологических исследований в учреждениях противотуберкулезной службы и общелечебной сети/ Севастьянова Э.В. [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2009. - №1. - с.53-60.

. Суркова Л.К. Основные пути оптимизации микробиологической диагностики туберкулеза в современных условиях/ Л.К. Суркова // Медицинские новости. - 2001. - №8. - с.10-16.

. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием автоматизированных систем BACTEC MGIT 960 и MB/BacT: Методические рекомендации/ Комитет здравоохранения Москвы; Сост.: Итруганова И.А., Смирнова Н.С., Мороз А.М. и др. - Москва, 2001. - 15 с.

. Хомченко А.Г. Основы диагностики туберкулеза легких/ А.Г. Хомченко // Проблемы туберкулеза. - 1995. - №2 - с.27-30

. Хомченко А.Г. Туберкулез органов дыхания: руководство для врачей/ А.Г. Хомченко. - Минск: Медицина, 1981. - 560 с.

. Черноусова Л. Современные тенденции и способности микробиологической диагностики туберкулеза/ Л. Черноусова // Журнал справочник medasia.ru [Электронный ресурс]. - 2009. - Режим доступа: http://www.