

Г.И. Алексеева, М.В. Черных, Н.Г. Павлов

СПОСОБ ПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Приводятся результаты определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза модифицированным прямым способом у 70 больных с впервые установленным с помощью метода микроскопии обильным и умеренным бактериовыделением. Дана оценка предложенному способу и непрямому методу абсолютных концентраций. Установлено 100%-ное совпадение результатов при тестировании чувствительных штаммов. Совпадение результатов устойчивости сравниваемыми методами определено к стрептомицину – 89,3% случаев, к изониазиду – 88,9, рифампицину – 90,5, канамицину – 81,8% случаев. Также отмечена высокая частота (94,4%) совпадений результатов выявления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, сокращение сроков определения лекарственной чувствительности до 25 дней. Предлагаемый способ дешев и доступен любой практической лаборатории. На предложенный способ получен патент Российской Федерации на изобретение №2244927 от 2 марта 2003 г.

We report the results of modified direct method of M.tuberculosis drug susceptibility testing in 70 patients with newly identified moderate to heavy bacterioexcretion using a microscopic technique. Test techniques under assessment were the described direct method and indirect absolute concentration method. Agreement in 100% of cases was found in test results of susceptible strains. In resistant strains, agreement between compared test techniques was 89.3%, 88.9%, 90.5%, and 81.8% for strains resistant to streptomycin, isoniazid, rifampycin and kanamycin, respectfully. Furthermore, high agreement rate of test results (94.1%) was observed in multidrug-resistant strains, while the time of drug susceptibility assessment reduced to 22-24 days. The described method is low-cost and is available for all kinds of laboratories. The method received a patent of Russian Federation (no. 2244927).

Исследования последних лет показывают, что основной проблемой фтизиатрии является распространение штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), устойчивых к противотуберкулезным препаратам (ПТП). Туберкулез, вызванный лекарственно-резистентными МБТ, трудно поддается лечению, возникает необходимость ранней, своевременной коррекции схем химиотерапии. Для этого врачу необходима более ранняя информация о чувствительности МБТ данного больного к ПТП.

Для определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) микобактерий туберкулеза в практических лабораториях широко используют не прямой метод абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена, в которую перед свертыванием добавляют различные концентрации препаратов. При его выполнении используются штаммы микобактерий, предварительно выделенные из диагностического материала больного. Поскольку сроки выделения возбудителя на питательных средах составляют не менее 1-1,5 месяцев, результаты определения лекарственной чувствительности указанным методом можно получить не ранее, чем через 2-2,5

месяца. В этом заключается основной недостаток непрямого метода.

Методы определения ЛЧ МБТ с применением современных технологий ограничены высокой стоимостью и используются далеко не во всех практических лабораториях.

В то же время в арсенале фтизиобактериологов имеется метод прямого определения чувствительности микобактерий к ПТП. Этот метод предполагает наличие микобактерий в исследуемом материале, подтвержденное методом прямой бактериоскопии, до 1000 микробных тел в 1 мл диагностического образца, т.е. должно быть достаточное массивное бактериовыделение [1].

Практикуется прямое определение ЛЧ МБТ на плотных средах с содержанием ПТП, результаты при использовании которого можно получить через 3 недели. Но при этом не всегда удается получить генерацию микобактерий и, по литературным данным, совпадение результатов между прямым и непрямым методом составляет 73,0% [1]. Прямое определение лекарственной чувствительности микобактерий также можно проводить, используя жидкие питательные среды, с дополнительным приготовлением мазков, их окраской и дальнейшим микроскопированием. В этом случае результаты получают в более короткие сроки – через 3-4 недели по сравнению с непрямым методом. Но этот метод определения лекарственной чувстви-

тельности МБТ в жидких средах более трудоемок и небезопасен.

Исходя из вышеизложенного, поиск достаточно быстрого и гарантированного определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП в условиях практических бактериологических лабораторий сохраняет свою актуальность и имеет предпосылки для усовершенствования.

Материалы и методы

Наряду с испытуемым способом использовались общепринятые методы: метод прямого определения лекарственной чувствительности МБТ и метод абсолютных концентраций с использованием плотной лекарственной среды Левенштейна – Йенсена с критическими концентрациями противотуберкулезных препаратов: стрептомицина, изониазида, рифампицина, канамицина. Предложенный способ апробирован на диагностическом материале 94 больных с обильным и умеренным бактериовыделением, установленным люминесцентной микроскопией.

Результаты и обсуждение

Нами предложен модифицированный прямой способ определения ЛЧ МБТ к ПТП бактериоскопически положительного материала – мокроты у больных туберкулезом органов дыхания с впервые выявленным обильным и умеренным бактериовыделением. Сущность способа заключается в том, что при его выполнении используется комплекс питательных сред: жидкой и

плотной яичной среды. На 1-м этапе используется жидкая среда Школьниковой для подращивания микобактерий в течение 3 суток. На 2-м этапе через 3-е суток надосадочная часть жидкой среды Школьниковой сливается. В оставшийся осадок добавляется свежая среда Школьниковой, после чего осадок перемешивается и засеивается по 0,2 мл на плотные яичные среды с разведениями противотуберкулезных препаратов.

Проведенными экспериментами было доказано, что если произвести пересев осадка диагностического материала без замены жидкой среды на свежую, сроки выхода культур МБТ удлинятся в среднем до 15,5 дней и интенсивность роста на яичной среде – в контроле и при наличии устойчивости к тому или иному препарату – оценивается до 1+ (20 КОЕ). Если среда, в которой производили инкубирование в течение 3 дней, сливается и заменяется на свежую, то отмечается укорочение сроков выхода культур в среднем до 12,5 дней. И что самое важное, интенсивность роста микобактерий в контроле оценивается до 3+ (более 20 КОЕ), что является основным показателем при оценке роста микобактерий на яичной среде при определении лекарственной чувствительности.

Следовательно, обязательным условием выполнения этого способа является замена жидкой среды Школьниковой, в которую проведен первичный посев бактериоскопически положительного диагностического материала, на свежую.

После внесения в питательную среду бактериоскопически положительно диагностического материала бактерии, как известно, адаптируются к ее условиям и начинают размножаться, при этом среда истощается, т.к. в ней аккумулируются токсические продукты метаболизма. По нашему мнению, данная манипуляция способствует удалению продуктов метаболизма микобактерий, образовавшихся во время лаг-фазы и экспоненциальной фазы размножения микроба. Свежая питательная среда обеспечивает более «комфортные» условия для дальнейшего роста микроорганизма.

Таким образом, 2-этапное использование комплекса питательных сред: на 1-м этапе – жидкой среды Школьниковой и на 2-м этапе – плотной яичной среды Левенштейна-Иенсена для прямого определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП, способствует:

- подращиванию имеющейся попу-

ляции микобактерий в жидкой питательной среде;

- удалению токсических продуктов метаболизма микобактерий, образовавшихся во время лаг-фазы размножения микроба;

- непосредственному определению лекарственной чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам: получению положительного результата в 100% случаев и в более короткие сроки.

Проведено 2 серии опытов. В 1-й серии проведено сравнение получения роста МБТ при определении лекарственной чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам прямыми методами: известным – с использованием плотных питательных сред с содержанием противотуберкулезных препаратов, и предложенным у 24 больных – с установленным обильным и умеренным люминесцентно-положительным мазком мокроты. При использовании известного прямого метода у 18 пациентов (75%) получен рост микобактерий туберкулеза в контроле и на среде с противотуберкулезными препаратами, у 6 (25%) рост МБТ не зарегистрирован. При использовании предложенного способа рост МБТ получен у всех 24 больных, т.е. в 100% случаев.

Во 2-й серии опытов проведено изучение результатов лекарственной чувствительности МБТ у 70 больных к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, канамицину предложенным прямым способом и общепринятым непрямым методом (методом абсолютных концентраций).

При этом отмечено, что из 70 больных у 33 при тестировании предложенным прямым способом выделены чувствительные к противотуберкулезным препаратам микобактерии туберкулеза, что подтверждено определением лекарственной чувствительности у выделенных штаммов МБТ всех 33 больных непрямым методом абсолютных концентраций.

У 37 больных зарегистрирована лекарственная устойчивость к противотуберкулезным препаратам. Совпадение результатов устойчивости МБТ сравниваемыми методами определено к стрептомицину – 89,3% случаев (из 28 у 25), изониазиду – 88,9 (из 27 у 24), рифампицину – 90,5 (из 21 у 19), канамицину – 81,8% случаев (из 11 у 9). При использовании предложенного способа регистрируется высокая частота совпадений результатов выявления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью – 94,4%

(из 18 у 17) случаев, что является наиболее актуальным показателем для более ранней диагностики мультирезистентного туберкулеза у конкретного больного.

Сравнительные сроки получения результатов определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП при применении предложенного прямого определения лекарственной чувствительности и непрямого метода составили 25 и 75 дней соответственно. Таким образом, происходит сокращение сроков определения лекарственной чувствительности МБ в 2,2-2,5 раза, что крайне важно для возможной более ранней коррекции химиотерапии у данной категории больных и проведения адекватного лечения с учетом выявленной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, в т.ч. множественной.

Заключение

Таким образом, в практических лабораториях возможно прямое, гарантированное определение ЛЧ микобактерий у больных, имеющих положительный результат микроскопии в течение 25 дней.

Показанием к применению предложенного способа является обильное или умеренное впервые диагностированное бактериовыделение в мокроте больных туберкулезом органов дыхания, установленное методом люминесцентной или световой микроскопии. Противопоказаний к применению нет.

Предлагаемый нами прямой способ определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза не сложен в выполнении, не требует дополнительных средств, сокращает время проведения анализа, доступен для любой бактериологической лаборатории и не исключает использование общепринятого метода абсолютных концентраций определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП (приказ Минздрава РФ № 109, 2003 г.).

На предложенный способ определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза получен патент Российской Федерации на изобретение №2244927 от 22 марта 2003 г.

Литература

1. Соловьева Н.С. // Новые технологии в диагностике и лечении туберкулеза различных органов и систем: науч. тр. и материалы Всерос. конф. XV.- СПб., 1998. - Т.1.- С. 35-37.
2. Яценко Т.Н. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе / Т.Н. Яценко, И.С. Мечева. - М.: Медицина, 1973. - 259 с.