

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УСКОРЕННОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

В статье приведен сравнительный анализ эффективности использования автоматизированной системы для выявления M.Tuberculosis продемонстрировал более высокие диагностические качества «ВАСТЕС MGIT-960». Совпадение результатов тестирования лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду и рифампицину на средах Левенштейна-Йенсена и Middlebrook 7H9 отмечены в 96,6% случаев.

Ключевые слова: диагностика туберкулеза, автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960, среда Левенштейна-Йенсена

На фоне напряженной эпидемической ситуации с туберкулезом наиболее важной проблемой остается раннее выявление возбудителя туберкулеза у больных. Одним из основных компонентов комплекса мер, направленных на диагностику, лечение и профилактику туберкулеза является применение эффективных методов диагностики и выявления лекарственно-устойчивых форм микобактерий туберкулеза (МБТ). Своевременная детекция мультирезистентных штаммов на ранних этапах заболевания позволяет контролировать дальнейшее распространение возбудителя заболевания, повысить эффективность лечения путём применения оптимальных схем химиотерапии на ранних этапах лечения. Однако определение спектра лекарственной чувствительности классическими методами на селекционных питательных средах занимает от 3– недель до 3 месяцев, что делает полученный результат ретроспективным [1].

Бактериологические методы определения чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена, принятый ВОЗ за международный стандарт, являются наиболее широко используемыми и включают стадию культивирования МБТ на специализированных питательных средах. Поскольку МБТ – медленно растущая бактерия, постановка диагноза лекарственно устойчивого туберкулеза занимает от нескольких недель до 2–2,5 месяцев. За это время больному не может быть назначена адекватная химиотерапия. Из-за низкой эффективности лечения, больной в этот период сохраняет контагиозность и продолжает распространять ЛУ штаммы.

Для сокращения сроков получения результатов тестирования на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) была разработана автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960. Эта система осуществляет постоянный компьютерный мониторинг состояния бактериальной популяции и сигнализирует о размножении минимального числа микроорганизмов. В основу технологии детекции заложено использование пробирки BD BBL™ MGIT™ с модифицированной средой Middlebrook 7H9 и встроенным флуоресцентным индикатором, который инактивирован высокими концентрациями кислорода [2, 3 4]. В процессе роста размножающаяся микробная популяция поглощает кислород, тем самым активируя флуоресцентный индикатор, который начинает светиться при ультрафиолетовом излучении. Положительная флуоресценция в пробирках MGIT™ является результатом роста культуры микобактерий. Контроль за внесенным в индикаторную пробирку материалом осуществляет встроенный в прибор компьютер [5, 6, 7].

Испытания, проведенные во многих лабораториях мира, показали, что применение автоматизированных систем в лабораторной практике позволяет: сократить сроки выявления микобактерий из диагностического материала в среднем до 3–20 дней и сократить сроки определения лекарственной чувствительности микобактерий до 5–14 дней. [8, 9]. Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960 используется в Республиканской референс- лаборатории Национального Центра Фтизиатрии.

Целью исследования явилось изучение основных показателей определения лекарственной чувствительности M.Tuberculosis к изониазиду и рифампицину на автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960.

Материалы и методы

Для оценки эффективности диагностической тест-системы ВАСТЕС MGIT 960 нами были проведены сравнительные исследования применения бактериологического посева на питательную среду Левенштейна – Йенсена и модифицированную среду Middlebrook 7H9 MGIT™ при выявлении M.Tuberculosis и определении лекарственной чувствительности. В работу были включены материалы обследования госпитализированных впервые выявленных и ранее принимавших лечение пациентов обоего пола, старше 15 лет с клинически, рентгенологически и микроскопически подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза.

Биологические образцы у больных, поступивших на стационарное лечение в НЦФ, собраны согласно общепринятым методикам.

Каждый биологический образец делили на две части. Инокуляцию образцов для получения культуры M.Tuberculosis проводили параллельно - на питательную среду Левенштейна-Йенсена на модифицированную среду Middlebrook 7H9 MGIT™.

При культуральных методах исследования на яичной питательной среде Левенштейна - Йенсена для гомогенизации и деконтаминации биологических образцов применяли модифицированный метод Петрова (4% раствор гидроокиси натрия NaOH). Инокуляция образцов для получения культуры M.Tuberculosis (МБТ) на питательную среду Левенштейна – Йенсена проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ для национальных программ [10].

Бактериологические исследования на системе BD ВАСТЕС MGIT 960 проводили в соответствии с Руководством по работе системы MGIT 960 для диагностики легочного туберкулеза и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза [11]. Для разжижения мокроты и улучшения деконтаминации биологических образцов применяли стерильный раствор

N-ацетил-цистеина с гидроксидом натрия (BBL MucosPrep NALC-NaOH). Инокуляция образцов проводилась в соответствии с руководством в пробирки с жидкой питательной (модифицированной) средой Middlebrook 7H9. Для повышения деконтаминационных свойств питательной среды использовалась добавка PANTA (смесь антибиотиков) [12].

Учет результатов посевов проводили в течение всего период инкубации, при максимальных сроках на питательной среде Левенштейна – Йенсена - 2,5 месяца и на системе BD BACTEC MGIT 960 – 6 недель.

При оценке высеваемости МБТ из образцов клинического материала результаты исследований проверяли вычислением статистической погрешности процесса и средней ошибки разности для двух показателей. При разности между процентами в сравниваемых группах меньше средней ошибки разности, найденную разность считали ненадежной, при разности между процентами больше средней ошибки разности, разность считали статистически достоверной [13].

Тестирование на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) проводилось в параллельных исследованиях, по следующей схеме:

- культуры МБТ, полученные на системе MGIT исследовали на лекарственную чувствительность на системе MGIT;

- культуры МБТ, полученные на среде Левенштейна–Йенсена, на лекарственную чувствительность исследовали методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена;

Лекарственную чувствительность методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и на системе MGIT определяли к изониазиду и рифампицину.

Результаты ТЛЧ учитывали на среде Левенштейна – Йенсена от 28 до 42 дней, на системе BD BACTEC MGIT 960 – от 4 до 22 дней.

По результатам работы определяли следующие показатели ТЛЧ методом MGIT по отношению к классическому ТЛЧ на питательной среде Левенштейна – Йенсена: чувствительность теста (способность определять истинную лекарственную устойчивость), специфичность теста (способность определять истинную лекарственную чувствительность) и эффективность теста (частота правильных результатов к общему числу результатов) [13]

На основании полученных данных нами были рассчитаны основные показатели теста лекарственной чувствительности на системе BD BACTEC MGIT 960 по отношению к определению лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена.

В нашем исследовании чувствительность (Se) показывает процент верно идентифицированных лекарственно-устойчивых штаммов к противотуберкулезному препарату, специфичность (Sp) показывает процент верно идентифицированных лекарственно-чувствительных штаммов к ПТП, эффективность теста (частота правильных результатов к общему числу результатов).

Чувствительность и специфичность рассчитывали по общепринятым формулам: $Se = (a/(a+c)) \times 100$, $Sp = (d/(d+b)) \times 100$, где а – число штаммов с устойчивостью к препарату, подтвержденной обоими методами, с – устойчивые по результатам Л-Й, но чувствительные по MGIT. Во второй формуле: d – число штаммов, чувствительных к препарату, по результатам обоих методов, b – чувствительные по результатам Л-Й, но устойчивые по результатам MGIT. Оценку эффективности рассчитывали по формуле: $(a + d)/\text{все исследования}$ [14].

Результаты и обсуждение

При обследовании 117 больных было проведено 234 параллельных посева штаммов МБТ для проведения ТЛЧ (117- на среду Левенштейна –Йенсена и, соответственно, 117 - на диагностической тест-системе BACTEC MGIT 960).

Основные показатели определения лекарственной устойчивости на диагностической тест-системе BACTEC MGIT 960 к изониазиду и рифампицину представлены в таблицах 1, 2.

В 87 случаях была определена устойчивость к изониазиду методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 85 случаях ЛУ подтверждена на BACTEC MGIT 960. В 2 –х случаях ЛУ не подтверждена на MGIT. В 34 случаях определена чувствительность к изониазиду методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 32 случаях ЛЧ подтверждена на тест-системе BD BACTEC MGIT 960. В 2 –х случаях ЛЧ не подтверждена на BACTEC MGIT 960. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к изониазиду на тест-системе BD BACTEC MGIT 960 составили, соответственно 97,7% и 91,4%, эффективность теста – 96,6%.

Таблица 1 - Показатели определения устойчивости МБТ к изониазиду (H) на BACTEC MGIT 960

Диагностическая тест-система BD BACTEC MGIT 960	среда Левенштейна – Йенсена		сего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к H	МБТ чувствительные к H				
МБТ устойчивые к H	85	2	87	97,7	91,4	96,6
МБТ чувствительные к H	2	32	34			
ВСЕГО	87	34	121			

В 56 случаях была определена устойчивость к рифампицину методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 54 случаях ЛУ подтверждена на тест-системе BD BACTEC MGIT 960. В 2 –х случаях ЛУ к рифампицину не подтверждена на

MGIT. В 63 случаях определена чувствительность к рифампицину методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 61 случае ЛЧ подтверждена на тест-системе BD BACTEC MGIT 960. В 2 –х случаях ЛЧ не подтверждена на MGIT. Таким

образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к рифампицину на тест-системе BD BACTEC MGIT 960

составили, соответственно 96,4% и 96,8%, эффективность теста – 96,6%.

Таблица 2 - Показатели определения устойчивости МБТ к рифампицину на BACTEC MGIT 960

Диагностическая тест-система BD BACTEC MGIT 960	Среда Левенштейна – Йенсена		всего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к R	МБТ чувствительные к R				
МБТ устойчивые к R	54	2	56	96,4	96,8	96,6
МБТ чувствительные к R	2	61	63			
ВСЕГО	56	63	119			

Кроме высоких показателей определения чувствительности/устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам на диагностической тест-системе BACTEC MGIT 960 необходимо отметить, что время исследования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза на аппарате BACTEC существенно сокращается. Если на определение лекарственной чувствительности МБТ унифицированным методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах затрачивается 3-4 недели, то на жидких средах данный тест длится, в среднем, 6,8 суток. Результаты ТЛЧ M.Tuberculosis на автоматизированной системе клиницисты получают на 21 сутки, а при использовании традиционных методов, более чем через 2 месяца.

Выводы.

Сравнительный анализ эффективности использования автоматизированной системы для выявления возбудителя туберкулеза продемонстрировал более высокие диагностические качества «BACTEC MGIT-960». Внедрение в лабораторную практику данной системы является целесообразным, поскольку она сокращает сроки выявления микобактерий из диагностического материала. Использование автоматизированной системы «BACTEC MGIT-960» необходимо для максимально быстрого и эффективного выявления возбудителя туберкулеза у лиц с подозрением на наличие туберкулезной инфекции, контроля эффективности лечения и своевременной коррекции химиотерапии. Совпадение результатов тестирования лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду и рифампицину на средах Левенштейна-Йенсена и Middlebrook 7H9 отмечены в 96,6% случаев.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Бочкарев Е.Г., Денисова Т.С., Генерозов Э.В., Говорун В.М., Кузнецов П.В., Никитченко Е.Ю., Черноусова Л.Н. Генодиагностика во фтизиатрии. - М., 2000.
- 2 Brunello F., Favari F., Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 1206–1209.
- 3 Brunello F., Fontana R. Reliability of the MB/Bactec system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex isolates to antituberculosis drugs // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 872–873.
- 4 Иртуганова О.А., Смирнова Н.С., Мороз А.М., Литвинов В.И. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием систем BACTEC MGIT и MB/Bact // Метод. рекомендации МНПЦБТ. – М., 2001. – 16 с.
- 5 Rusch-Gerdes S., Domehl C, Nardi G. et al. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of M.tuberculosis to first-line drugs // J. Clin. Microb. – 1999. – Vol. 37. – P. 45–48.
- 6 Yew W.W., Chan C.K., Chau C.H. et al. Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin-containing regimens // Chest. – 2000. – № 117. – P. 744–751.
- 7 Голышевская В.И., Иртуганова О.А., Смирнова Н.С. и др. Сравнение нитратредуктазного и автоматизированного BACTEC MGIT 960 AST методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. – 2003. – №8. – С. 34–37.
- 8 Roberts G., Goodman N., Heifets L., et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of M **tuberculosis** // J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 8. – P. 689–696.
- 9 Diaz-Infantes M., Ruiz-Serrano M., Martinez-Sanchez L. et al. Evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system for susceptibility testing of M.tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 1988–1989.
- 10 Chaulet P., Spinaci S., Harries A. Для Глобальной программы борьбы с туберкулезом, ВОЗ. Лечение туберкулеза: рекомендации для Национальных программ. 2-е издание. Женева, Швейцария, 1998:21.
- 11 Salman H. Siddiqi, Sabine Rusch-Gerdes. Руководство по работе с Системой BACTEC MGIT 960. FIND, 2006.
- 12 Скрыгина Е.М., Залуцкая О.М., Рот А., Маух Х. Тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза с использованием различных методов. Ж. Проблемы туберкулеза. №5, 2001. С.44.
- 13 Сепетлиев Д., 1978 Статистические методы в научных медицинских исследованиях. – Москва.: Медицина, 1978. - С.102 – 104.
- 14 Lazlo A., Rahman M., Raviglione M., Bustero F. Программа обеспечения качества при проведении тестов на лекарственную чувствительность Mycobacterium tuberculosis в сети межнациональных референс-лабораторий ВОЗ/МСБТБЛ: первый раунд исследования качества работы лабораторий. Ж. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007; (4):42-48

А.Д. АДАМБЕКОВА

**М. TUBERCULOSIS АНЫҚТАУДЫҢ ЖӘНЕ ДӘРІЛІК СЕЗІМТАЛДЫҚТЫ АНЫҚТАУДЫҢ АВТОМАТТЫ
ӘДІСІНІҢ ТИІМДІЛІГІ**

Түйін: M.Tuberculosis анықтау үшін автоматтандырылған жүйені пайдалану тиімділігінің салыстырмалы талдауы «BACTEC MGIT-960» жоғары диагностикалық қасиеттерін көрсетті. Левенштейн-Йенсен және Middlebrook 7H9 орталарында изониазид және рифампицинге МБТ дәрілік сезімталдық тестілеуінің нәтижелерінің сәйкес келуі 96,6% жағдайда білінді.

Түйінді сөздер: туберкулез диагностикасы, BACTEC MGIT 960 автоматтандырылған жүйесі, Левенштейн-Йенсен ортасы.

A.D. ADAMBEKOVA

**AN EFFICIENCY OF THE AUTOMATED METHOD OF DETECTION M.TUBERCULOSIS
AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING**

Resume: Comparative analysis of an efficiency of the automated BACTEC MGIT 960 for diagnosis of M.Tuberculosis has demonstrated its higher diagnostic advantages. Concurrence of drug susceptibility testing to isoniazid and rifampicin on the Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H9 is 96,6%.

Keywords: diagnosis of tuberculosis, automated BACTEC MGIT 960, Lowenstein-Jensen medium