

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.711-002.5-078:681.5

Н.С. Соловьева, О.А. Маничева, Л.Н. Стеклова, В.В. Олейник, М.В. Шульгина

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ BACTEC MGIT 960 ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗНЫМ СПОНДИЛИТОМ**

ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России

*Проведено сравнение эффективности культивирования 290 операционных образцов из очагов деструкции больных туберкулезным спондилитом на жидкой среде Middlebrook 7H9 с флуоресцентной детекцией роста и двух плотных яичных средах – Левенштейна-Йенсена и Финн-II. Чувствительность методов посева на жидкую среду Middlebrook 7H9 и на плотные яичные среды не различается (38,2 и 43,1%,  $p = 0,271$ ). Продолжительность роста составила для жидких сред  $23 \pm 2,3$  дня, для плотных сред  $40,6 \pm 3,2$  дня. Разработан метод предпосевной обработки операционного материала. При посеве 440 проб в жидкие питательные среды контаминация составила 3,9%. При посеве костных фрагментов очагов деструкции в жидкую среду Middlebrook 7H9 удалось выделить культуру в 43,5% образцов от больных туберкулезным спондилитом.*

**Ключевые слова:** туберкулезный спондилит, жидкая среда Middlebrook 7H9

*N.S. Soloviyeva, O.A. Manicheva, L.N. Steklova, V.V. Oleynik, M.V. Shulgina*

THE EFFECTIVENESS OF BACTEC MGIT 960 SYSTEM IN ANALYSIS OF SURGERY MATERIAL OF PATIENTS WITH TUBERCULAR SPONDYLITIS

The St. Petersburg research institute of phthisiopulmonology of Minzdrav of Russia, St. Petersburg, Russia

*The article considers the comparison of effectiveness of cultivation of 290 surgery samples from focus of destruction in patients with tubercular spondylitis in liquid medium Middlebrook 7H9 with fluorescent detection of growth and two dense egg medium - Levenshtein-Yensen and Finn-II. The sensitivity of methods of inoculation in liquid medium Middlebrook 7H9 and in dense egg mediums has no difference (38.2% and 43.1%,  $p=0.271$ ). The duration of growth consisted  $23 \pm 2.3$  days for liquid mediums and  $40.6 \pm 3.2$  days for dense mediums. The method of pre-inoculation processing of surgery material. In case of inoculation of 440 samples in liquid mediums contamination consisted 3.9%. In case of inoculation of bone fragments of focus of destruction in liquid medium Middlebrook 7H9 the culture was isolated in 43.5% of samples of patients with tubercular spondylitis.*

**Key words:** tubercular spondylitis, liquid medium Middlebrook 7H9

**Введение.** Установление диагноза при туберкулезе внелегочной локализации всегда представляет трудности в силу множества опосредованных признаков заболевания и сложности этиологической диагностики. В настоящее время в основе предположений о туберкулезной этиологии заболевания лежит совокупность клинико-рентгенологических особенностей. Решающими при верификации диагноза являются гистологические и бактериологические методы. Бактериологические методы остаются до настоящего времени единственными методами, позволяющими подтвердить этиологию заболевания и определить спектр лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к широкому спектру противотуберкулезных препаратов – данные, необходимые для назначения адекватного курса химиотерапии. Используемые для выделения культур микобактерий плотные (яичные) среды не позволяют выделить культуру возбудителя в короткие сроки: время культивирования достигает 4–10 нед [1].

Появившаяся в арсенале лабораторной службы автоматизированная система культивирования на жидкой среде с флуоресцентной детекцией роста микроорганизмов BACTEC MGIT 960 повысила чувствительность метода посева на 15–20% по сравнению с плотными средами и сократила

сроки выделения культур *M. tuberculosis* из респираторного материала в среднем на 22 дня [2, 6]. Данные о применении этой системы при исследовании материала внелегочной локализации немногочисленны. Обычно в публикациях природа материала не конкретизируется. В ряде случаев различный материал объединен в группу «ткани» и представлен совокупно образцами лимфатических узлов, паренхиматозных органов, кожи, костей. Высеваемость для этого материала, по данным зарубежных авторов, не превышала 7,9% [3].

Туберкулезный спондилит (ТС) – наиболее тяжелая и распространенная нозологическая форма в структуре внелегочного туберкулеза. В доступной литературе работ по исследованию с помощью системы BACTEC MGIT 960 материала из очагов деструкции больных туберкулезным спондилитом туберкулеза не обнаружено.

Цель исследования – оценить эффективность посевов на жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 с флуоресцентной детекцией роста в автоматической системе BACTEC MGIT 960 и на плотные питательные среды при исследовании операционного материала из очагов деструкции больных туберкулезным спондилитом.

**Материалы и методы.** Использовали наборы реагентов для работы с автоматизированной системой BACTEC™ MGIT™ 960 ("Becton Dickinson", США), плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-II, приготовленные в лаборатории в соответствии с инструкцией [1], тест-система НПО «ДНК-технология» (Россия) для исследования методом ПЦР.

В исследование включены результаты бактериологиче-

Для корреспонденции:

Соловьева Наталья Сергеевна, зав. бактериол. лаб.  
Адрес: 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2–4  
E-mail: baclab@niif.ru

ских исследований операционного материала, полученного от больных с инфекционным поражением позвоночника, проходивших лечение в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии в 2007–2011 гг. В группу с диагнозом «туберкулезный спондилит» включены пациенты с характерной клинико-рентгенологической и патоморфологической картиной. В группу с диагнозом «остеомиелит» включали пациентов с нехарактерной для ТС клинико-рентгенологической картины и соответствующим для данного диагноза результатом гистологического исследования. Исследовано 673 образца патологического материала от 584 больных спондилитом инфекционной природы. Исследование проводили в соответствии с Инструкцией Приказа № 109 и с Руководством к работе на автоматизированной системе для детекции и определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам ВАСТЕС™ MGIT™ 960 ("Becton Dickinson", США).

Число образцов от пациентов с диагнозом ТС (1-я группа) составило 440, из них 290 исследовали на жидкой среде Middlebrook 7H9 и плотных средах Левенштейна–Йенсена (Л–Й) и Финн-II, 150 образцов – только на плотных средах. От пациентов с диагнозом остеомиелита (ОМ) (2-я группа) было 233 образца, в том числе 158 на плотных и жидкой средах и 76 – только на плотных средах.

Операционный материал из очагов деструкции представлял собой гной, грануляции, секвестры, фрагменты межпозвоночных дисков и костей, часто со значительным содержанием крови.

**Предпосевная обработка** диагностического материала включала следующие этапы: образец гомогенизировали в небольшом объеме стерильного 0,9% раствора хлорида натрия, с целью уменьшения ингибирующего действия крови на рост *M. tuberculosis* отмывали 2–3 раза фосфатным буфером в соотношении 1:1 (BBL MycoPrep Phosphate Buffer). Далее ресуспендированный осадок в количестве 0,5 мл инокулировали в пробирку MGIT с жидкой средой Middlebrook 7H9, в которую предварительно добавляли антибактериальную (MGIT PANTA) и ростовую (MGIT Growth Supplement) добавки и по 0,2 мл на плотные среды. Этап деконтаминации гомогенизированной пробы раствором BBL MycoPrep NALC-NaOH был исключен.

**Оценка роста.** При использовании автоматической системы ВАСТЕС MGIT 960 с флюоресцентной детекцией роста оценка роста культуры проводилась в ростовых единицах – единицах измерения интенсивности роста по нарастанию флюоресценции в результате снижения содержания в пробирке свободного кислорода, поглощаемого растущими бактериальными клетками. Ростовые единицы не соответствуют количеству колониеобразующих единиц (КОЕ). Прибор автоматически отмечает пробирку как положительную, начиная в среднем с показателя ростовых единиц, равного 70. Меньший показатель оценивается как отрицательный результат. Максимальное время инкубации пробирок MGIT в приборе 42 дня. В протоколе, предоставляемом прибором, в случае отрицательного результата посева, указывается показатель ростовых единиц, равный нулю. Если по истечении 42 дней в протоколе отрицательного роста обозначено даже незначительное число ростовых единиц, то данную пробирку ставили еще на один цикл культивирования.

Посев на плотные среды, культивирование и учет роста проводили в соответствии с Приказом № 109 [1].

**Идентификация.** Принадлежность выделенной культуры к *M. tuberculosis* подтверждали микроскопией с окрашиванием по Цилю–Нильсену и последующим исследованием методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РТ) амплификацией нуклеотидной последовательности IS6110 – маркера *Mycobacterium tuberculosis* complex на анализаторе iCycler iQ5 (BioRad, США).

Чувствительность метода посева определяли как процент положительных результатов при посеве материала от больных ТС, специфичность – как процент отрицательных результатов при посеве материала от больных ОМ [4]. Эффективность питательной среды определяли как процент

культур, выросших на данной среде от общего числа культур, выделенных на всех исследуемых средах.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0, используя критерий  $\chi^2$ . Значимыми считали различия при доверительном интервале равном 95% ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** В Руководстве по работе с системой ВАСТЕС MGIT 960, прилагаемом к прибору, посев в жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 материалов, содержащих костные фрагменты, не описан. Разработан алгоритм предпосевной обработки операционных материалов, в том числе содержащих костные фрагменты, а также проведена оценка диагностической информативности различных видов операционного материала. Предварительные исследования показали, что исключение этапа деконтаминации раствором MycoPrep NALC-NaOH не влияет на долю контаминации посевов из операционных материалов. Такой подход позволяет избежать подавляющего воздействия деконтаминанта (щелочи) на рост возбудителя, в особенности учитывая, что операционный материал, как правило, олигобациллярный. Для снижения риска контаминации неспецифической микрофлорой использование смеси антибиотиков MGIT PANTA вполне достаточно. При посеве 290 проб в жидкие питательные среды контаминация составила 3,9%, по данным зарубежных авторов, уровень контаминации в пробирках MGIT колеблется от 3,7 до 16,6% как для легочных, так и для внелегочных образцов [2, 3].

На питательные среды Л–Й и Финн-II посеяны 440 образцов от больных ТС (1-я группа) и 237 – от пациентов ОМ (2-я группа). В 1-й группе положительный результат зафиксирован в 197 посевах. Ни в одном из случаев посева материала от больных из 2-й группы культура микобактерий туберкулеза не выделена. Чувствительность метода составила 44,7%, специфичность – 100%. Продолжительность роста колебалась в пределах 18–75 дней и в среднем составила  $40,6 \pm 3,2$  дня.

Плотная среда Финн-II адаптирована для выделения культур микобактерий из очагов, характеризующихся повышенным кислотозом и анаэробизмом [5]. Такие условия присущи очагам в костях при спондилитах. При сравнении эффективности культивирования 440 образцов на двух плотных средах выделено 197 культур *M. tuberculosis*, из которых только на среде Финн-II выросло 24,8% штаммов, только на среде Л–Й – 8,6% ( $p < 0,001$ ). В абсолютных цифрах на среде Финн-II выросло на 32 культуры больше, чем на среде Л–Й (см. табл. 1).

В жидкую среду Middlebrook 7H9 с последующим использованием автоматического анализатора ВАСТЕС MGIT 960 посеяно 290 операционных образцов от больных туберкулезным спондилитом. 179 посевов зарегистрированы как отрицательные. В 111 случаях выявлены МБТ. Ни в одном случае посева операционного материала больных 2-й группы роста микобактерий не получено. Для жидких сред чувствительность метода составила 38,3%, специфичность – 100%. Из 111 положительных образцов 5 зарегистрированы прибором как отрицательные, но с незначительным количеством ростовых единиц – от 2 до 14. Повторное культивирование этих пробирок позволило получить положительный результат. Продолжительность роста колебалась в пределах 8–63

Таблица 1

**Сравнительная эффективность сред Левенштейна–Йенсена и Финн-II**

всего культур <i>M. tuberculosis</i>	Число выделенных культур (абс. и в %)				
	только на Л–Й	только на Ф-II	одновременно на Л–Й и Ф-II	всего на Ф-II	всего на Л–Й
197	17	49	131	180	148
100%	8,6%*	24,9%*	66,5%	91,4%*	75,1%*

Примечание. Л–Й – Левенштейна–Йенсена, Ф-II – Финн II. \* $\chi^2 = 21,246, p < 0,001$ .

Таблица 2

**Сравнительная эффективность жидкой среды Middlebrook 7H9 и плотных сред (Левенштейна–Йенсена и Финн-П)**

Число выделенных культур (абс. и в %)					
всего культур <i>M. tuberculosis</i>	только на ЖС	только на ПС	одновременно на ЖС и ПС	всего на ПС	всего на ЖС
144	19	33	92	125	111
100%	13,2%*	23,0%*	63,8%	86,8%*	77,1%*

Примечание. ЖС – жидкая среда Middlebrook 7H9, ПС – плотные среды Л–Й, Финн П, \* $\chi^2 = 3,966, p < 0,046$ .

Таблица 3

**Чувствительность и специфичность бактериологических методов при этиологической диагностике туберкулезного спондилита (в %)**

Питательная среда	Число исследований	Чувствительность, %	Специфичность, %
Левенштейна–Йенсена	440	33,6	100
Финн-П	440	40,9	100
Middlebrook 7H9	290	38,3	100

дней и в среднем составила  $23 \pm 2,3$  дня, в первые 2 нед дали рост 34,6% культур *M. tuberculosis*.

Чувствительность метода культивирования с помощью системы BACTEC MGIT 960 сравнивают с чувствительностью метода культивирования на среде Левенштейна–Йенсена, как «золотого стандарта» фтизиобактериологии. При исследовании респираторного материала большую эффективность показывает жидкая среда Middlebrook 7H9 в сравнении с плотными средами (87,1–95,5% против 73,2%) [6, 7]. В нашем исследовании при параллельном посеве 290 образцов на жидкую и две плотные среды чувствительность методов составила соответственно 38,3 и 42,7% ( $\chi^2 = 1,207, p = 0,271$ ). Применение трех питательных сред позволило выделить из 290 посевов в общей сложности 144 культуры *M. tuberculosis* (49,7%), в том числе только на среде Middlebrook 7H9 выросло 19 (13,2%) культур, только на плотных средах – 33 (23%). Доля культур, выделенных при посеве на плотные яичные среды, значимо выше, чем при посеве на жидкую среду (86,8 и 77,1% соответственно ( $\chi^2 = 3,966, p = 0,046$ ) (табл. 2). Возможно, такая эффективность плотных сред связана с большей питательной ценностью (по содержанию белка) и адаптацией сред к исследуемому материалу (о чем было сказано выше), обеспечивающих наилучшие условия для роста *M. tuberculosis*, выделенных из костной ткани.

Анализ видов операционного материала выявил равную диагностическую информативность как материала, содержащего гной и грануляции, так и материала, включающего костные фрагменты, что подтверждается данными литературы [8]. Из 391 образца, содержащего гной и грануляции, на плотных средах выделили 175 (44,7%) штаммов *M. tuberculosis*. При исследовании 267 проб в системе BACTEC MGIT 960 *M. tuberculosis* выявлены в 98 (37,8%) случаях. На плотных средах при посеве материала, содержащего костные фрагменты, из 49 проб выделили 22 штамма, а на жидких – из 23 образцов выделили 10 штаммов. Высеваемость составила 44,9 и 43,5% соответственно (табл. 3).

**Выводы.** 1. Жидкая среда Middlebrook 7H9 эффективна при выделении *M. tuberculosis* из очагов деструкции при туберкулезном спондилите, даже из такого сложного диагностического материала, как костные фрагменты очага деструкции (43,5%).

2. При параллельном посеве операционного материала чувствительность методов посева на жидкую среду Middlebrook 7H9 с использованием автоматической системы с флюоресцентной детекцией и на плотные яичные среды не различается (38,3 и 42,7%,  $p = 0,271$ ). Преимущество жидкой

среды и флюоресцентной детекции роста состоит во временном факторе (средняя продолжительность роста составила  $23 \pm 2,3$  дня против  $40,6 \pm 3,2$  дня на плотных средах).

3. Учитывая уникальность диагностического материала и большую важность получения культуры *M. tuberculosis* для верификации диагноза и определения лекарственной чувствительности штаммов, в алгоритм этиологической диагностики туберкулезных спондилитов необходимо включать три питательные среды (жидкую среду Middlebrook 7H9, плотные яичные среды Левенштейна–Йенсена и Финн-П).

4. Диагностическая информативность операционного материала, содержащего как гной и грануляции, так и включающего костные фрагменты, одинакова.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Приложение 11 «Инструкция по унифицированным микробиологическим исследованиям при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза».
2. Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 2321–5.
3. Hilleman D., Richter E. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 96–Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9 558 extrapulmonary specimens, including urine samples. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4014–7.
4. Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. BMJ. 1994; 308: 1552.
5. Финн Р.Э. Пути повышения высеваемости и ускорения роста микобактерий туберкулеза в современных условиях их изменчивости. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Кишинев; 1973.
6. Балабанова Я.М., Дробневский Ф., Федорин И.М., Игнатъева О.Л., Малованова Н.А. Оптимизация лабораторной диагностики туберкулеза с использованием современных бактериологических и молекулярно-генетических методов. Проблемы туберкулеза. 2011; 2: 36–42.
7. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Макарова М.В., Галкина К.Ю., Краснова М.А. Централизованная микобактериологическая лаборатория: организация, задачи и современные методы исследования. Научные труды к 70-летию В.И. Литвинова. М.; 2011: 14–27.
8. Wang D. Diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis (TVO) in a developed country and literature review. Spinal Cord. 2005; 43: 531–42.

## REFERENCES

1. On improvement of TB control action in the Russian Federation. Supplement 11. Instructions on standardized microbiological research in the identification, diagnosis and treatment of tuberculosis. Decree of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation from March 21, 2003. No 109.
2. Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 2321–5.
3. Hilleman D., Richter E. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 96–Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9 558 extrapulmonary specimens, including urine samples. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4014–7.
4. Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. BMJ. 1994; 308: 1552.
5. Finn R.E. Ways to improve the effectiveness of the isolation and accelerate the growth of Mycobacterium tuberculosis in the current conditions of their variability. Dr. med. sci. diss. Kishinev; 1973 (in Russian).
6. Balabanova Ya.M., Drobnevskiy F., Fedorin I.M., Ignat'eva O.L., Malovanova N.A. Optimization of laboratory diagnosis of tuberculosis using modern bacteriology and molecular genetic methods. Problemy tuberkuleza. 2011; 2: 36–42 (in Russian).
7. Dorozhkova I.R., Freyman G.E., Makarova M.V., Galkina K.Yu., Krasnova M.A. Centralized mycobacterial laboratory: organization, tasks, and modern methods of investigation. Scientific works of the 70th anniversary V.I. Litvinov. Moskva; 2011: 14–27 (in Russian).
8. Wang D. Diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis (TVO) in a developed country and literature review. Spinal Cord. 2005; 43: 531–42.

Поступила 23.04.13