

Ускоренное определение лекарственной чувствительности *m. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам резервного ряда микробиологическими методами исследования

В. Н. Барило, Э. В. Севастьянова, Л. Н. Черноусова.

Разработан оптимальный алгоритм ускоренного тестирования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза (ЛЧ МВТ) к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) основного и резервного рядов микробиологическими методами исследования, в соответствии с которым ЛЧ МВТ к ПТП резервного ряда рекомендуется определять модифицированным нитратредуктазным методом Грисса с использованием в качестве микобактериальной суспензии культуры, выращенной на автоматизированной системе «Вастес MGIT 960».

Применение предлагаемой методики тестирования позволяет сократить время получения результатов ЛЧ МВТ к ПТП резервного ряда до 16-28 сут с момента поступления в лабораторию диагностического материала.

Проведённое исследование позволяет рекомендовать предложенный способ исследования ЛЧ МВТ к применению в повседневной практической работе бактериологических лабораторий противотуберкулёзных учреждений России.

В последние годы в РФ отмечается рост первичной и вторичной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза (ЛУ МВТ), в связи с чем необходимо более быстро и качественно проводить определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) возбудителя к противотуберкулёзным препаратам (ПТП), включая препараты резервного ряда [4].

Для своевременного выявления ЛУ МВТ к ПТП резервного ряда следует выбрать оптимальную методику тестирования ЛЧ, обладающую достаточно высокой чувствительностью и специфичностью и позволяющую получить результаты в максимально короткие сроки.

Основным методом тестирования ЛЧ МВТ к ПТП резервного ряда, используемым в РФ, является традиционный непрямой метод абсолютных концентраций [3]. Для ускорения сроков получения результатов может быть применён нитратредуктазный метод с использованием реактива Грисса, принцип действия которого заключается в выявлении жизнеспособных МВТ путём регистрации их ферментативной активности задолго до появления видимого роста культуры. Нитратредуктазный метод определения ЛЧ МВТ основан на способности МВТ восстанавливать нитраты в нитриты, присутствие которых выявляется специфическими реагентами, дающими цветную реакцию [2].

Известно, что метод абсолютных концентраций обладает достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, однако имеет ряд недостатков, основным из которых является длительность получения результатов, что приводит к затягиванию сроков лечения, неадекватной химиотерапии, снижению эффективности лечения больного и распространению лекарственноустойчивых штаммов.

Так, длительность выращивания культуры микобактерий из диагностического материала составляет в среднем около 30 сут. Для определения ЛЧ МВТ традиционным методом абсолютных концентраций с подсчётом колониеобразующих единиц (КОЕ) требуется еще 21-28 сут. Кроме того, согласно принятой в РФ методологии исследования, многие лаборатории первоначально осуществляют постановку тестов на ЛЧ МВТ только к ПТП первого ряда и лишь при наличии устойчивости к ним проводят дальнейшее тестирование ЛЧ МВТ к ПТП

второго ряда, что требует дополнительно ещё 21-28 сут. В итоге сроки получения результатов ЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций к ПТП резервного ряда составляют в среднем более 70 сут.

Определение ЛЧ МБТ нитратредуктазным методом с колориметрической детекцией роста требует значительно меньше времени, так как длительность выполнения данного теста занимает от 10 до 14 сут, что с учётом срока, требующегося для получения культуры микобактерий из диагностического материала (составляющего порядка 18-38 сут), сокращает период ожидания клиницистами данных по ЛУ МБТ до 28-52 сут.

Провели сравнительное изучение частоты выявления и характера ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда, определённой традиционным методом абсолютных концентраций (с подсчётом выросших КОЕ) и нитратредуктазным методом (с регистрацией роста МБТ по наличию цветной реакции с реактивом Грисса). Испытания выполняли на культурах, выделенных из поступившего в лабораторию диагностического материала от 118 больных туберкулёзом с ЛУ МБТ, получавших лечение в стационаре ЦНИИТ РАМН в 2005-2008 гг. Результаты проведённого исследования представлены в табл. 1.

*Таблица 1. Результаты определения лекарственной чувствительности 118 штаммов *M. tuberculosis* к препаратам резервного ряда методом абсолютных концентраций и нитратредуктазным методом.*

Препарат	Результат тестирования ЛЧМБТ	Метод абсолютных концентраций		Нитрат-редуктазный метод	
		Количество штаммов			
		абс.	%	абс.	%
Канамицин (К)	уст.	102	86,4 ± 2,6	96	81,3 ± 2,5
	чув.	16	13,6 ± 1,1	22	18,7 ± 1,2
Офлоксацин (Fq)	уст.	87	73,7 ± 2,4	82	69,5 ± 2,3
	чув.	31	26,3 ± 1,5	36	30,5 ± 1,6
Этионамид (Et)	уст.	72	61,0 ± 2,2	78	66,1 ± 2,3
	чув.	46	39,0 ± 1,8	40	33,9 ± 1,7
Капреомицин (Cap)	уст.	67	56,8 ± 2,1	61	52,0 ± 2,0
	чув.	51	43,2 ± 1,9	57	48,0 ± 2,0
Рифабутин (Rb)	уст.	105	88,9 ± 2,6	107	90,7 ± 2,6
	чув.	13	11,1 ± 1,0	11	9,3 ± 0,9
Циклосерин (Cs)	уст.	35	29,6 ± 1,6	28	23,7 ± 1,4
	чув.	83	70,4 ± 2,3	90	73,3 ± 2,4
ПАСК (Pas)	уст.	32	27,1 ± 1,5	33	27,9 ± 1,5
	чув.	86	72,9 ± 2,4	85	72,1 ± 2,4

Как следует из данных табл. 1, наиболее часто ЛУ МБТ по результатам обоих методов выявляли к рифабутину и канамицину. Частота встречаемости устойчивости к остальным изученным препаратам распределилась по убывающей следующим образом: к офлоксацину, этионамиду, капреомицину, циклосерину и ПАСКу.

Оценка совпадения результатов, полученных двумя использованными в ходе проведённого эксперимента методами тестирования ЛЧ МБТ, представлена в табл. 2. Анализ этих данных показал, что частота совпадения результатов, полученных двумя методами тестирования ЛЧ МБТ, является наиболее высокой для таких препаратов, как рифабутин и ПАСК (98,3 и 99,1% соответственно).

Наибольший процент расхождения результатов отмечался при определении чувствительности к циклосерину (5,9%). Однако статистический анализ данных, выполненный с помощью компьютерной программы «Биостатистика», показал, что полученные различия в результатах тестирования ЛЧ МБТ разными методами статистически недостоверны ($p > 0,5$) [11]. Это обстоятельство позволяет сделать вывод о том, что, наряду с традиционным методом абсолютных концентраций, нитратредуктазный метод также может быть использован

в практической работе для определения ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда.

*Таблица 2. Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности 118 штаммов *M. tuberculosis*, полученных методом абсолютных концентраций и нитратредуктазным методом.*

Препарат	Количество штаммов с совпавшими результатами тестирования ЛЧ МБТ к указанному препарату	Совпадение результатов, полученных различными методами, %
Канамицин (К)	112	94,9 ± 2,7
Офлоксацин (Fq)	113	95,8 ± 2,7
Этионамид (Et)	112	94,9 ± 2,7
Капреомицин (Cap)	112	94,9 ± 2,7
Рифабутин (Rb)	116	98,3 ± 2,7
Циклосерин (Cs)	111	94,1 ± 2,7
ПАСК (Pas)	117	99,1 ± 2,8

Таким образом, в результате проведённых исследований установлено, что ускоренный нитратредуктазный метод тестирования ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда является корректным и в целом не уступает по чувствительности традиционному методу абсолютных концентраций, обеспечивая полноценное определение спектра лекарственной устойчивости. Вместе с тем использование нитратредуктазного метода позволяет примерно вдвое сократить длительность теста на ЛЧ МБТ - с 21-28 до 10-14 сут.

Однако, как уже указывалось выше, срок выполнения данного анализа от момента посева диагностического материала на питательные среды до момента получения результата ЛЧ МБТ ускоренным нитратредуктазным методом не является достаточно быстрым.

Существенные недостатки данного метода (так же, как и традиционного метода абсолютных концентраций) - высокий риск возможного инфицирования персонала туберкулёзом в процессе приготовления микобактериальной суспензии, необходимой для постановки теста, а также наличие опасности микробной контаминации.

Таким образом, несмотря на достигнутые успехи, проблема поиска альтернативных вариантов и возможностей для проведения ускоренного тестирования ЛЧ МБТ микробиологическими методами продолжает оставаться весьма актуальной, в связи с чем требуется разработка новых подходов к проведению указанного теста.

Для решения задачи максимального сокращения длительности определения ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда и получения достоверных результатов исследования ко всем ПТП, используемым во фтизиатрической практике, представлялось целесообразным вместо микобактериальной суспензии, приготовленной из культуры, выросшей на плотной питательной среде, использовать для постановки тестов на ЛЧ МБТ нитратредуктазным методом культуру в жидкой среде, полученную на автоматизированной системе «Вастес MGIT 960» и представляющую собой фактически готовую бактериальную суспензию (содержащую необходимое для засева стандартное количество микробных клеток) [5].

Следует отметить, что более 60 специализированных лабораторий РФ оснащены автоматизированными системами бульонного культивирования «Вастес MGIT 960», использование которых позволяет существенно сократить сроки получения результатов ЛЧ МБТ.

Однако проведение тестирования ЛЧ МБТ к некоторым из ПТП резервного ряда (таким, как канамицин, циклосерин, ПАСК) с помощью автоматизированной системы «Вастес MGIT 960» не может быть рекомендовано, поскольку критические концентрации данных препаратов на жидких средах являются нечёткими и спорными, что в итоге не позволяет получить достоверные данные по ЛУ МБТ к этим препаратам при проведении исследования в данной системе.

В то же время нитратредуктазный метод, использующий плотные питательные среды, лишён вышеуказанных ограничений и может быть применён для быстрой и точной детекции штаммов, имеющих лекарственную устойчивость к данным ПТП. Кроме того, ценным преимуществом нитратредуктазного метода является то обстоятельство, что он несоизмеримо дешевле метода «Вастес MGIT 960».

Отметим также, что, несмотря на то что длительность тестирования ЛЧ МБТ с помощью ускоренного нитратредуктазного метода несколько превышает сроки определения ЛЧ с помощью автоматизированной системы «Вастес MGIT 960», эти различия не столь существенны, как в случае использования традиционного метода абсолютных концентраций.

Исходя из вышеизложенного, был разработан оптимальный алгоритм ускоренного тестирования ЛЧ МБТ к ПТП основного и резервного рядов, регламентирующий порядок проведения рутинного исследования, в соответствии с которым для практического выполнения процедуры ускоренного определения ЛЧ МБТ микробиологическими методами предложена следующая методика. Обработанный соответствующим образом диагностический материал вносят (в объёме 0,5 мл) в пробирку с жидкой питательной средой Миддлбрук, после чего помещают эту пробирку в автоматизированную систему «Вастес MGIT 960». При получении положительного сигнала, свидетельствующего о наличии роста популяции, материал рекомендуется направить на ПЦР-исследование для подтверждения принадлежности данной популяции к *M. tuberculosis*. После этого определяют ЛЧ к ПТП основного ряда на автоматизированной системе «Вастес MGIT 960» и одновременно осуществляют посев (в объёме 0,2 мл) имеющейся бактериальной суспензии (культуры в жидкой среде, выросшей на «Вастес MGIT 960») на плотные питательные среды (содержащие ПТП резервного ряда) для определения ЛЧ МБТ нитратредуктазным методом. Поскольку в этом случае этап приготовления бактериальной суспензии ручным способом исключается, то снижается риск инфицирования персонала лаборатории, а также устраняются условия возникновения микробной контаминации.

Указанный алгоритм исследования позволяет сократить время получения культуры МБТ из диагностического материала в среднем с 30 до 10 сут (обычно для выращивания культуры в автоматизированной системе «Вастес MGIT 960» требуется ориентировочно от 6 до 14 дней). В дальнейшем использование полученной с помощью «Вастес MGIT 960» культуры в жидкой среде в качестве бактериальной суспензии для постановки тестов на ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда нитратредуктазным методом потребует еще от 10 до 14 дней. Таким образом, использование разработанного способа исследования ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда позволяет сократить срок получения результатов до 16-28 сут с момента доставки в лабораторию мокроты или другого диагностического материала. Для подтверждения эффективности разработанной методики провели сравнительное исследование результатов ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда, полученных тремя различными методами: традиционным методом абсолютных концентраций, стандартным нитратредуктазным методом (с приготовлением бактериальной суспензии для засева из культуры, выросшей на плотной яичной среде) и разработанным методом (модифицированный нитратредуктазным методом с использованием в качестве бактериальной суспензии культуры в жидкой среде, полученной в системе «Вастес MGIT 960»), Исследование выполняли на 118 клинических штаммах МБТ, выделенных из диагностического материала от больных туберкулёзом. Полученные результаты представлены в табл. 3.

*Таблица 3. Сравнение результатов определения лекарственной чувствительности 118 штаммов *M. tuberculosis*, полученных традиционным методом абсолютных концентраций и модифицированным нитратредуктазным методом (с использованием культуры, выращенной в системе «Вастес MGIT 960»)*

Препарат	Количество штаммов с совпавшими результатами тестирования ЛЧ МБТ к указанному препарату	% совпадения результатов, полученных различными методами
Канамицин (К)	115	97,4±2,7
Офлоксацин (Fq)	115	97,4±2,7
Этионамид (Et)	111	94,1±2,7
Капреомицин (Cap)	115	97,4±2,7
Рифабутин (Rb)	117	99,2±2,8
Циклосерин (Cs)	113	95,8±2,7
ПАСК (Pas)	118	100

Анализ полученных данных показал, что тестирование ЛЧ МБТ модифицированным нитратредуктазным методом с использованием культуры, выращенной в автоматизированной системе «Вастес MGIT 960», привело к снижению различий в результатах между традиционным методом абсолютных концентраций и разработанной методикой по сравнению с различиями, наблюдавшимися между традиционным методом абсолютных концентраций и классическим нитратредуктазным методом, использующим культуру, выращенную на плотной питательной среде.

Результаты, полученные при определении ЛЧ МБТ в соответствии с разработанной методикой исследования, оказались более близкими к данным, полученным при оценке ЛЧ МБТ традиционным методом абсолютных концентраций, который оценивался как контрольный метод. Так, например, при определении чувствительности к ПАСКу было получено стопроцентное совпадение результатов обоих методов исследования. Результаты определения ЛЧ МБТ к канамицину, офлоксацину, капреомицину, рифабутину и циклосерину модифицированным нитратредуктазным методом с использованием культуры, полученной на «Вастес MGIT 960», также имели меньшие различия с данными контрольного метода по сравнению с различиями, наблюдавшимися между методом абсолютных концентраций и обычным нитратредуктазным методом. При этом расхождения при определении чувствительности к этионамиду (5,9%) и циклосерину (4,2%) были более выражены (однако разница статистически недостоверна). В остальных случаях частота расхождений составила от 0,9 до 2,6%.

В табл. 4 представлена характеристика разработанной методики тестирования ЛЧ МБТ (модифицированный нитратредуктазный метод, использующий культуру, полученную в системе «Вастес MGIT 960») в сравнении с традиционным методом абсолютных концентраций, принятым за эталон. Как следует из представленных данных, предлагаемый способ ускоренного тестирования ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью.

Следует также отметить, что разработанная методика хорошо зарекомендовала себя и успешно применяется в отделе микробиологии ЦНИИТ РАМН.

Таким образом, проведенное исследование позволяет считать предлагаемый алгоритм ускоренного микробиологического тестирования ЛЧ МБТ к ПТП основного и резервного рядов (предусматривающий применение как стандартного, так и модифицированного нитратредуктазных методов) оптимальным для использования на территории РФ в современных условиях и рекомендовать его для повсеместного применения в отечественной лабораторной практике.

В том случае, если лаборатория оснащена автоматизированной системой «Вастес MGIT960», целесообразно проводить тестирование ЛЧ МБТ к ПТП основного ряда с помощью «Вастес MGIT 960», а к ПТП резервного ряда - модифицированным

нитратредуктазным методом, при постановке которого в качестве микобактериальной суспензии для засева используют культуру, выросшую на жидкой среде (на «Вастес MGIT 960»),

Для лабораторий, не имеющих автоматизированной системы «Вастес MGIT 960», рекомендуется проводить тестирование ЛЧ МБТ к ПТП основного и резервного рядов стандартным нитратредуктазным методом, предусматривающим засев пробирок с препаратами суспензией культуры, выросшей на плотной питательной среде.

Таблица 4. Основные параметры оценки модифицированного нитратредуктазного метода, использующего культуру, выращенную в системе «Вастес MGIT 960», по отношению к традиционному методу абсолютных концентраций.

Препарат	Чувствительность, %	Специфичность, %	Эффектив- ность
Канамицин (K)	99,1	96,4	0,99
Офлоксацин (Fq)	99,3	98,8	0,99
Этионамид (Et)	96,4	96,2	0,99
Капреомицин (Cap)	90,6	91,2	0,98
Рифабутин (Rb)	99,6	99,3	0,99
Циклосерин (Cs)	95,7	94,4	0,98
ПАСК (Pas)	99,5	99,2	1,0

Заключение

Разработан оптимальный алгоритм ускоренного тестирования ЛЧ МБТ к ПТП основного и резервного рядов микробиологическими методами исследования. ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда рекомендуется определять модифицированным нитратредуктазным методом с использованием в качестве микобактериальной суспензии культуры, полученной на автоматизированной системе «Вастес MGIT 960».

Сравнение результатов изучения ЛЧ МБТ к ПТ резервного ряда с использованием традиционного метода абсолютных концентраций, стандартного нитратредуктазного метода и предлагаемой методики с культурой МБТ, выращенной на «Вастес MGIT 960», не выявило достоверных различий между указанными методами по чувствительности, специфичности и эффективности. Вместе с тем применение модифицированного нитратредуктазного метода, предусматривающего проведение засева плотных питательных сред с ПТП культурой МБТ, выращенной на «Вастес MGIT 960», позволяет сократить время получения результатов ЛЧ МБТ к ПТП резервного ряда до 16-28 сут с момента поступления в лабораторию диагностического материала.

Проведённое исследование даёт основание рекомендовать разработанный алгоритм исследования ЛЧ МБТ к применению в повседневной практической работе бактериологических лабораторий противотуберкулёзных учреждений России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. - М.: Практика, 1998.
2. Голышевская В. И., Шульгина М. В., Севастьянова Э. В. и др. Культуральные методы диагностики туберкулёза: Уч. пособие / под ред. чл.-корр. РАМН, проф. В. В. Ерохина. - М. - Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. - 208 с.
3. Приложение № 11 к Приказу МЗ РФ от 21.03.03 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации».

4. Туберкулёз в Российской Федерации, 2009 г.: Аналитический обзор статистических показателей по туберкулёзу, используемых в Российской Федерации. - М., 2010. - 224 с.

Siddiqi S. H., Riisch-Gerdes S. MGITTM Procedure Manual. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT). -Foundation for Innovative New Diagnostics, 2006. - 89 p.