

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
27 июня 2008 г.  
Регистрационный № 025-0308

**КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА**

инструкция по применению

ОРГАНИЗАЦИЯ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Научно-исследовательский институт  
пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Е.М. Скрягина, О.М. Залуцкая

Минск 2008

Данная инструкция предназначена для врачей-бактериологов.

Уровень внедрения: противотуберкулезные организации системы Министерства здравоохранения.

Сложность количественной оценки роста микобактерий туберкулеза (МБТ) связана с наличием у *M.tuberculosis* корд-фактора (трегалоза-6,6'-димиколат), обуславливающего слипание бактериальных клеток в микроколониях. Обычные микробиологические методы количественной оценки числа бактериальных клеток для определения роста микобактерий не пригодны. В частности, принятая система подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ) указывает лишь на концентрацию частиц, загруженных микобактериальными клетками, но не на количество клеток микобактерий. Современные автоматизированные системы позволяют значительно сократить сроки исследования, однако требуют использования дорогостоящего специального оборудования и питательных сред, что в настоящее время не позволяет широко применять эти методы в практике.

Лекарственную чувствительность МБТ в жидких питательных средах определяют с использованием колориметрического метода, основанного на восстановлении тетразолиевого соли МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) в нерастворимый формазан, который при экстракции окрашивает среду в пурпурный цвет. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна числу живых клеток и может быть объективно оценена путем измерения оптической плотности на спектрофотометре.

Использование новых простых, чувствительных и дешевых методов исследования, в частности колориметрического, основанного на восстановлении МТТ, позволит сократить время определения лекарственной чувствительности МБТ и проводить коррекцию схем химиотерапии у больных туберкулезом в более ранние сроки.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Термостат.
2. Холодильник.
3. Центрифуга.
4. Многоканальный спектрофотометр.
5. Водяная баня.
6. Эксикатор.
7. Автоматические дозаторы с наконечниками.
8. Планшеты плоскодонные на 96 лунок.
9. Чистые субстанции противотуберкулезных препаратов.
10. Среда Middlebrook 7H9.
11. Пробирки стеклянные.
12. Пробки резиновые.
13. Палочки стеклянные.

- 14.3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ).
15. Додecilсульфат натрия.
  16. Диметилформаид.
  17. Уксусная кислота.
  18. Соляная кислота.
  19. Физиологический раствор.
  20. Стандарт мутности.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Противопоказаний к применению не имеется, так как данный метод относится к лабораторным исследованиям. Поскольку использование данного метода связано с работой с чистой культурой возбудителя туберкулеза, необходимо строгое соблюдение техники безопасности и общего санитарно-гигиенического режима в лаборатории, проводящей исследования.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

#### **Приготовление растворов:**

**Раствор 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромида**

МТТ растворяют при комнатной температуре в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) до концентрации 5 мг/мл, хранят в темноте не более 1 месяца при +4 °С.

#### **Экстракционный буфер**

Додecilсульфат натрия при +37 °С растворяют в 50% водном растворе диметилформаида до получения 20% раствора. рН доводят до 4,7 добавлением 2,5% 80% раствора уксусной кислоты и 2,5% 1 N HCl. Буфер хранят при +4 °С не более 6 месяцев, перед употреблением подогревают на водяной бане до +37 °С.

#### **Приготовление суспензии *Mycobacterium tuberculosis***

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 мин. Затем в пробирку добавляют 3 мл стерильного физраствора, аккуратно (чтобы не замочить пробку) встряхивают несколько раз до получения однородной суспензии. Суспензию оставляют на 10 мин 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.

#### **Приготовление растворов противотуберкулезных препаратов**

Разведения противотуберкулезных препаратов готовят в соответствии с инструкцией по применению «Алгоритм бактериологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам основного и резервного ряда с использованием автоматизированных систем» от 27 апреля 2007 г. (регистрационный № 045-0506).

### **Проведение исследования**

В лунки 96 луночного планшета вносят по 180 мкл суспензии микобактерий, содержащей  $10^6$  бактериальных клеток/мл в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и по 20 мкл растворов противотуберкулезных препаратов. Для контроля и каждого препарата используют по 9 лунок для оценки интенсивности роста на 1, 5 и 8 сутки инкубирования (в триплетах). В контрольные лунки вносят по 20 мкл дистиллированной воды.

Планшеты с суспензией микобактерий инкубируют в течение 8 суток при 37°C в эксикаторе для предотвращения высыхания.

### **Учет результатов**

Количество клеток микобактерий оценивают колориметрически в исходной суспензии на 1, 5 и 8 сутки инкубации. Для этого по 100 мкл суспензии из соответствующих контрольных и опытных лунок (в триплетах) переносят в лунки плоскодонного 96 луночного планшета, добавляют по 25 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Планшеты инкубируют в течение 4 ч при +37 °С. Экстракцию формазана проводят добавлением в каждую лунку по 100 мкл экстракционного буфера, и планшеты далее инкубируют в течение 18 ч в темноте при +37 °С. Количество образовавшегося формазана в лунках планшета определяют по оптической плотности при длине волны 570 нм. Вносят данные в протокол исследования. Рассчитывают среднее арифметическое от оптической плотности формазана в контроле и каждом варианте.

### **Интерпретация результатов**

Интерпретацию результатов проводят, рассчитывая отношение средней оптической плотности в каждом варианте на разных сроках инкубирования к оптической плотности контрольного варианта. Если это отношение менее или равно 0,5, штамм считают чувствительным к препарату, если более или равно 0,75 — устойчивым, если показатель находится в пределах от 0,5 до 0,75 — умеренно устойчивым. Исключение составляет изониазид, для которого увеличение оптической плотности по сравнению с контрольным вариантом, вызванное особенностями механизма действия, является свидетельством чувствительности штамма микобактерий к препарату.