

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть
27 апреля 2007 г.
Регистрационный № 045-0506

**АЛГОРИТМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ К ПРЕПАРАТАМ
ОСНОВНОГО И РЕЗЕРВНОГО РЯДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук Л.К. Суркова, О.М. Залуцкая, Е.Р. Сагальчик

Минск 2007

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров и врачей-бактериологов.

Уровень внедрения: республиканские и областные противотуберкулезные учреждения республики, медицинская служба ДИН МВД.

Общая характеристика автоматизированных систем для ускоренной детекции и определения чувствительности микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам

В основу работы автоматизированных систем для ускоренной детекции микобактерий и определения лекарственной чувствительности положен принцип культивирования микобактерий в жидкой питательной среде. Интенсивность роста бактерий в автоматизированных системах определяется флуориметрической детекцией содержания O_2 в культуральной среде или колориметрической детекцией продукции CO_2 растущими в среде микроорганизмами.

В современных автоматизированных системах предусмотрен непрерывный контроль качества исследования, что обеспечивает высокую точность и надежность исследований.

Преимуществом использования автоматизированных систем является сокращение сроков диагностики туберкулеза в 2-3 раза по сравнению с традиционными методами, что позволяет своевременно назначать адекватные схемы химиотерапии, снизить частоту формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, уменьшить общепольничные затраты на лечение пациентов. Кроме того, использование автоматизированных систем обеспечивает высокий уровень безопасности медицинского персонала.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Ускоренную детекцию и определение лекарственной чувствительности МБТ с помощью автоматизированных систем следует проводить:

- ♦ при диагностике заболевания у пациентов с клиническими и рентгенологическими симптомами, подозрительными на туберкулез, при получении нескольких отрицательных результатов бактериоскопического исследования;

- ♦ диагностике легочных и внелегочных форм туберкулеза у детей;

- ♦ дифференциальной диагностике туберкулеза с другими заболеваниями легких;

- ♦ у больных туберкулезом категорий I-IIб с отрицательной клинико-рентгенологической динамикой и непрекращающимся бактериовыделением, у которых возбудителем заболевания могут быть штаммы микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью;

- ♦ при наличии исходной лекарственной устойчивости МБТ с целью назначения адекватного лечения, своевременной коррекции схем химиотерапии, контроля над эффективностью лечения у больных туберкулезом IV категории;

♦ при проведении экспертных и консультативных лабораторных исследований материалов, предоставляемых различными медицинскими учреждениями.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний к применению не имеется, т. к. 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.

Правила сбора диагностического материала

Эффективность бактериологического исследования с помощью автоматизированных систем зависит от качества диагностического материала. Исследованию подлежат биологические жидкости: мокрота, промывные воды бронхов и желудка (у детей), плевральный экссудат, синовиальная и цереброспинальная жидкость, асептически собранные образцы тканевого материала.

Материал для исследования на микобактерии туберкулеза с помощью автоматизированных систем собирают в стерильные флаконы с удобными плотно завинчивающимися или герметично закрывающимися крышками.

Сбор материала для исследования необходимо проводить до начала химиотерапии, т. к. специфическая терапия в течение даже нескольких дней может привести к гибели значительного количества микобактерии или снизить их жизнеспособность и исказить результаты исследования.

Для повышения результативности исследования мокроты следует собрать не менее **двух** проб утренней мокроты в течение двух последовательных дней.

Собранный материал необходимо немедленно доставить в лабораторию. В случае невозможности быстрой доставки материал сохраняется в холодильнике при 4°C. При транспортировке материала необходим тщательный контроль над целостностью флаконов и правильностью их маркировки.

Проведение исследования

Проведение предпосевной обработки диагностического материала, детекции и определения чувствительности микобактерии туберкулеза к лекарственным препаратам с помощью автоматизированных систем должны проводиться в строгом соответствии с инструкцией, прилагаемой к системе.

Детекцию и определение чувствительности микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам с помощью автоматизированных систем проводят параллельно с традиционными исследованиями диагностического материала, включающими:

- культуральные методы (посев на две плотные питательные среды с микроскопией по Цилю-Нельсену мазка осадка диагностического материала);

- определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза методом абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена.

В руководствах по использованию автоматизированных систем представлено описание методик определения чувствительности микобактерий туберкулеза к основным противотуберкулезным препаратам в следующих концентрациях (мкг/мл): изониазид (I) – 0,1 (критическая) и 0,4 (высокая), стрептомицин (S) – 1,0 (критическая) и 4,0 (высокая), рифампицин (R) – 1,0, этамбутол (E) – 5,0 (критическая) и 7,5 (высокая), пиперазид (Pza) – 5,0. Нами адаптированы методы определения чувствительности микобактерий туберкулеза с использованием ВАСТЕС MGIT 960 к препаратам резервного ряда в следующих критических концентрациях (таблица 1).

Таблица 1 – Критические концентрации противотуберкулезных препаратов резервного ряда

Препарат	Критическая концентрация для ВАСТЕС MGIT 960, мкг/мл
Офлоксацин	2,0
Канамицин	5,0
Протионамид	2,5
Этионамид	5,0
Амикацин	1,0
Капреомицин	2,5
ПАСК	8,0
Рифабутин	0,5

Для исследований на лекарственную чувствительность используют только химически чистые субстанции препаратов, учитывая содержание активного начала препарата в используемой химической субстанции. Расчет требуемого количества субстанции ПТП проводят по формуле:

$$\text{количество субстанции} = \frac{\text{количество действующего вещества}}{\text{содержание действующего вещества в субстанции}}$$

Пример: содержание действующего вещества в субстанции канамицина – 797 мкг в 1 мг субстанции (0,797). Количество субстанции, необходимое для получения навески, содержащей 83 мг действующего вещества канамицина, равняется $83/0,797=104,1$ мг.

Приготовление рабочих разведений противотуберкулезных препаратов для определения лекарственной чувствительности к препаратам резервного ряда с использованием автоматизированной системы проводят следующим образом.

Офлоксацин 2 мкг/мл

Навеску, содержащую 66,4 мг действующего вещества офлоксацина, растворяют в 1 мл 0,1% NaOH, затем добавляют 3 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 16600 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 166 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения офлоксацина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 2 мкг/мл.

Канамицин 5 мкг/мл

Навеску, содержащую 83 мг действующего вещества канамицина, растворяют в 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 41500 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 415 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения канамицина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 5 мкг/мл.

Протионамид 2,5 мкг/мл

Навеску, содержащую 83 мг действующего вещества протионамида, растворяют в 1 мл диметилсульфоксида, затем добавляют 3 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 20750 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 207,5 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения протионамида добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 2,5 мкг/мл.

Этионамид 5 мкг/мл

Навеску, содержащую 83 мг действующего вещества этионамида, растворяют в 1 мл диметилсульфоксида, затем добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 41500 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 415 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения этионамида добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 5 мкг/мл.

Амикацин 1 мкг/мл

Навеску, содержащую 66,4 мг действующего вещества амикацина, растворяют в 8 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 8300 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе

составляет 83 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения амикацина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 1 мкг/мл.

Капреомицин 2,5 мкг/мл

Навеску, содержащую 83 мг действующего вещества капреомицина, растворяют в 4 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 20750 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 207,5 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения капреомицина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 2,5 мкг/мл.

ПАСК 8,0 мкг/мл

Навеску, содержащую 132,8 мг действующего вещества ПАСК, растворяют в 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 66400 мкг/мл. Проводят два последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 664 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения ПАСК добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 8 мкг/мл.

Рифабутин 0,5 мкг/мл

Навеску, содержащую 83 мг действующего вещества рифабутина, растворяют в 1 мл спирта, затем добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 41500 мкг/мл. Проводят три последовательных десятикратных разведения раствора стерильной дистиллированной водой. Концентрация препарата в полученном растворе составляет 41,5 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения рифабутина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация препарата в среде составляет 0,5 мкг/мл.

Дальнейшее исследование проводится в соответствии со стандартным протоколом определения лекарственной чувствительности с использованием автоматизированной системы для препаратов первого ряда.

На рисунке 1 представлен алгоритм бактериологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам основного и резервного ряда с использованием автоматизированных систем.

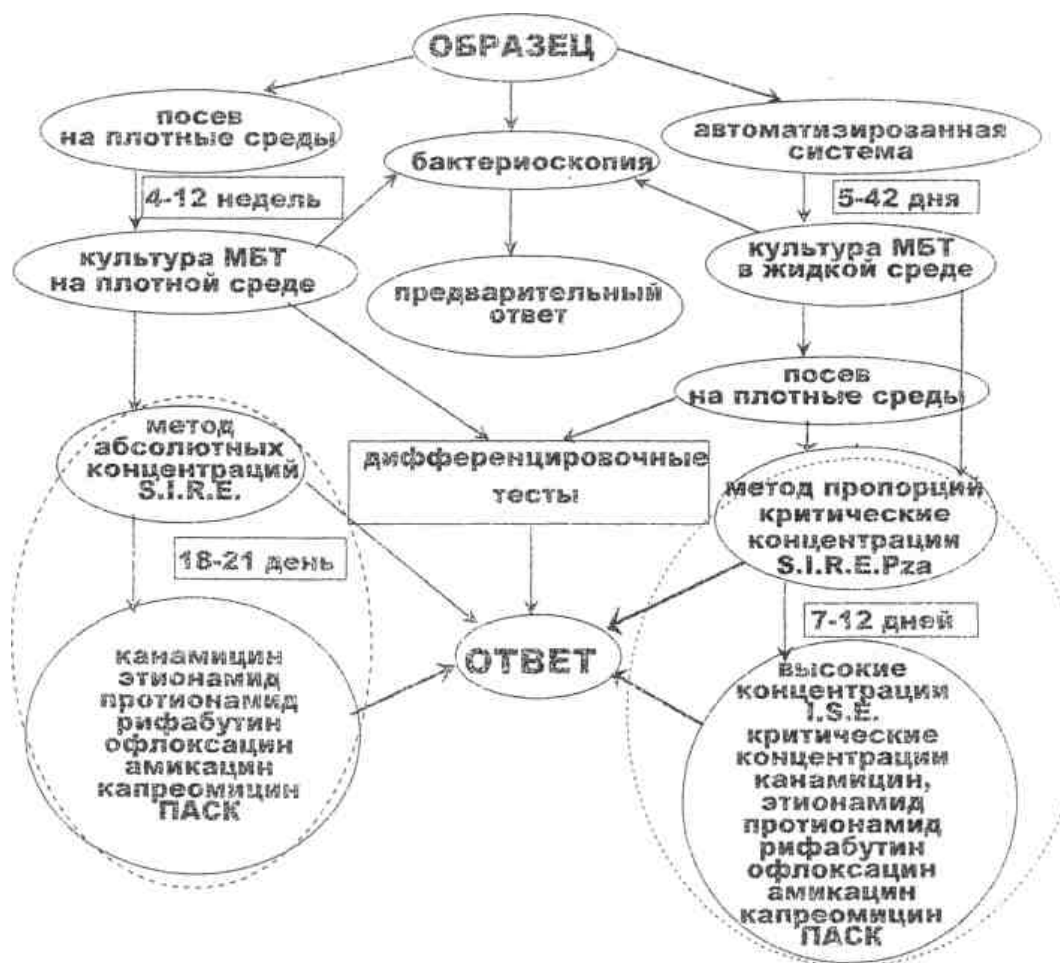


Рисунок 1 – Алгоритм бактериологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности микобактерий к препаратам основного и резервного ряда с использованием автоматизированных систем

Доставленный в лабораторию для исследования образец диагностического материала обрабатывают с целью разжижения и деконтаминации в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе, засевают в жидкую и на плотную питательные среды. Параллельно проводят микроскопическое исследование осадка диагностического материала по Цилю-Нельсену, дают предварительный ответ о наличии кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в мазке осадка материала. Засеянные пробирки с плотной средой помещают в термостат, пробирки с жидкой средой устанавливают в прибор.

Результат исследования диагностического материала с помощью автоматизированных систем расценивается как положительный при наличии флуоресценции (в системах с флуориметрической детекцией) или изменении цвета сенсора (в системах с колориметрической детекцией) в пробирке с диагностическим материалом. После проведения бактериоскопии мазка выделенной культуры по Цилю-Нельсену и обнаружения КУМ дается предварительный ответ о выделении культуры КУМ. Суспензию микобактерий из пробирки с жидкой средой засевают на плотную среду для

получения колоний микобактерий. Для идентификации микобактерий проводят бактериологические и биохимические тесты, после чего дают окончательный ответ о наличии микобактерий туберкулеза в образце диагностического материала,

Определение лекарственной чувствительности микобактерий можно проводить с использованием культуры микобактерий в жидкой среде или колоний микобактерий, полученных при засеве суспензии микобактерий из пробирки с жидкой средой на плотную. Исследование проводят в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе.

Отсутствие флуоресценции (в системах с флуориметрической детекцией) или изменения цвета сенсора (в системах с колориметрической детекцией) в пробирке с препаратом при наличии флуоресценции или при изменении цвета сенсора в контрольной пробирке интерпретируется как «лекарственная чувствительность МБТ».

Наличие флуоресценции (в системах с флуориметрической детекцией) или изменение цвета сенсора (в системах с колориметрической детекцией) в пробирке с препаратом при наличии флуоресценции или при изменении цвета сенсора в контрольной пробирке интерпретируется как «лекарственная устойчивость МБТ».

В случае устойчивости выделенной культуры микобактерий к критическим концентрациям противотуберкулезных препаратов дополнительно проводят определение чувствительности к высоким концентрациям изониазида, стрептомицина и этамбутола. В случае устойчивости выделенной культуры микобактерий к критическим и высоким концентрациям основных противотуберкулезных препаратов проводят определение чувствительности к резервным противотуберкулезным препаратам (офлоксацину, ПАСК, этионамиду/протионамиду, канамицину, амикацину, рифабутину, капреомицину).

Определение лекарственной чувствительности микобактерий на плотной питательной среде проводят в соответствии с инструкцией по применению «Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза», утвержденной МЗ РБ 30.12.2002 г. (регистрационный № 107-1102).

Интерпретация результатов детекции в определении чувствительности микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам с помощью автоматизированных систем

Различие в составе питательных сред и избирательность штаммов МБТ к химическим и биотехнологическим особенностям питательного субстрата приводят к расхождению результатов бактериологического исследования с использованием традиционного метода и автоматизированной системы в 5-10% случаев.

Оценка результатов, полученных при использовании автоматизированных систем для детекции микобактерии туберкулеза

При проведении бактериологического исследования образца диагностического материала с помощью автоматизированных систем с

параллельным традиционным культуральным исследованием возможны следующие варианты результатов исследования (таблица 2).

Таблица 2 – Интерпретация результатов бактериологического исследования с помощью автоматизированных систем (АС) и культурального метода

Вариант	Результат бактериологического исследования
АС +, культура +*	положительный
АС +, культура -	положительный
АС -, культура +	положительный
АС -, культура -	отрицательный

* Примечание «+» – положительный результат
«-» – отрицательный результат

Результат бактериологического исследования диагностического материала на туберкулез у пациентов в случаях «АС+, культура-» и «АС-, культура+» интерпретируется как положительный.

По данным литературы, совпадение результатов бактериологического исследования на МБТ с помощью автоматизированных систем и культуральным методом («АС+, культура+», «АС-, культура-») имеет место более чем в 90% случаев.

Оценка результатов, полученных с использованием автоматизированных систем, при определении чувствительности микобактерий туберкулеза к лекарственным препаратам

По данным литературы, совпадение результатов определения лекарственной чувствительности МБТ с помощью автоматизированных систем и культуральным методом имеет место более чем в 90% случаев для основных противотуберкулезных препаратов.

При интерпретации результатов определения лекарственной чувствительности МБТ у пациентов в случае несовпадения данных, полученных с использованием автоматизированных систем и метода абсолютных концентраций, принимают во внимание результаты обоих методов.