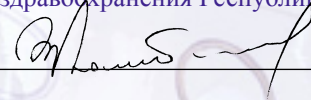


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра
здравоохранения Республики Беларусь



В.В. Колбанов

30 декабря 2002 г.
Регистрационный № 107-1102

**ОРГАНИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА**
(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик: НИИ пульмонологии и фтизиатрии

Авторы: д-р мед. наук Л.К. Суркова, О.М. Залуцкая, Е.Н. Николенко

[Перейти к оглавлению](#)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПОКАЗАНИЯ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ	3
ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ, РЕАКТИВОВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ	4
КРИТЕРИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ	6
ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА	7
Приготовление и хранение среды Левенштейна — Йенсена (без крахмала)	7
Приготовление среды для определения чувствительности МБТ к пиразинамиду	8
Приготовление растворов ПТП	9
Приготовление суспензии микобактерий, ее стандартизация, инокуляция, инкубирование посевов	13
Учет и интерпретация результатов	13
Контроль качества питательной среды	14
Документация	14
Анализ результатов определения лекарственной чувствительности МБТ	14
ПРИЧИНЫ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ	16
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	17

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного союза борьбы с туберкулезом повсеместно, в том числе в Республике Беларусь, для определения чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) рекомендуется использовать унифицированный метод абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна — Йенсена.

Принцип метода абсолютных концентраций заключается в определении концентраций ПТП, которые ингибируют рост штамма МБТ при выращивании его на питательных средах с различными концентрациями препаратов. В научной литературе имеются рекомендации о необходимости исследования устойчивости микобактерий к 2–3 концентрациям каждого ПТП. В практических целях при определении лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций достаточно определить степень лекарственной устойчивости МБТ к одной (пороговой, или критической) концентрации ПТП.

Определение лекарственной чувствительности с использованием других методов обязательно должно осуществляться параллельно с классическим методом на среде Левенштейна — Йенсена, который является «золотым стандартом» в определении лекарственной чувствительности микобактерий.

ПОКАЗАНИЯ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ

Определение спектра и степени чувствительности МБТ к ПТП проводится со следующими целями:

- определение тактики химиотерапии больных туберкулезом;
- контроль за эффективностью лечения;
- определение прогноза заболевания;
- проведение эпидемиологического мониторинга лекарственной устойчивости МБТ в пределах отдельных территорий.

Определение лекарственной чувствительности МБТ проводится больным туберкулезом в начале лечения. При продолжительном бактериовыделении повторное определение лекарственной чувствительности микобактерий проводится через 3 мес. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, определение чувствительности микобактерий к резервным ПТП следует проводить в случае устойчивости штаммов МБТ к основным ПТП.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ, РЕАКТИВОВ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

- Весы аналитические или торсионные;
- автоклавы (2 шт.);
- бокс 2-го класса защиты (ламинарный шкаф);
- дистиллятор;
- холодильники (2 шт.);
- шкаф сухожаровой;
- аппарат для свертывания питательных сред (в Республике Беларусь используют аппараты для свертывания и инактивации сыворотки (АСИС));
- центрифуга с крышкой мощностью 3000 g;
- бусы стеклянные или мешалка настольная;
- термостат на 35–37° С (термостатная комната);
- плитка электрическая;
- микроскоп бинокулярный с иммерсионным объективом ($\times 100$), окуляром $\times 8$ или $\times 10$;
- облучатели бактерицидные;
- лопатки бактериологические платиновые или никелево-хромовые;
- палочки стеклянные;
- часы процедурные;
- спиртовки или газовые горелки;
- шпатель для взвешивания;

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

- стандарт мутности оптический;
- колбы стеклянные плоскодонные емкостью 2 л;
- флаконы стеклянные емкостью 400 мл;
- пробки ватно-марлевые для колб и флаконов;
- пробирки стеклянные;
- пробки ватные для пробирок;
- пипетки градуированные концевые емкостью 2, 5 и 10 мл или дозаторы автоматические;
- груши резиновые для пипеток;
- стекла предметные;
- цилиндр или стакан мерный;
- лотки эмалированные;
- пинцеты;
- физические, химические и биологические индикаторы контроля стерилизации;
- пробки резиновые диаметром 12,5 и 14,5 мм;
- штативы металлические для пробирок;
- ящики металлические для пробирок;
- биксы металлические или ведра с крышками для сброса использованной лабораторной посуды;
- емкость с отмытым речным песком и 96° спиртом;
- щетки для мытья яиц;
- фильтр марлевый;
- салфетки марлевые;
- вата медицинская;
- халаты лабораторные;
- маски лицевые промышленные, одноразовые;
- перчатки одноразовые;
- передник резиново-клеенчатый;
- реактивы для окрашивания по методу Циля — Нильсена (приказ МЗ РБ № 106 от 04.07.2002 г.);
- реактивы для приготовления питательной среды Левенштейна — Йенсена (приказ МЗ СССР № 558 от 08.06.1978 г.);
- масло иммерсионное;

- эфир;
- спирт 70° и 96°;
- дезинфектант микобактерицидный;
- парафин;
- лабораторный журнал для регистрации результатов исследований на лекарственную чувствительность микобактерий;
- бланки для выдачи ответа о результатах исследования;
- журнал контроля качества питательных сред;
- журнал контроля стерильности питательных сред;
- журнал регистрации работы облучателей бактерицидных;
- журнал контроля работы термостатов.

КРИТЕРИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ

В качестве критериев для отнесения штаммов МБТ к категории чувствительных или устойчивых используют пороговые значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) ПТП, избранные на основе комплекса микробиологических, фармакокинетических и клинических показателей. Данные о величине МИК ПТП в отношении штаммов МБТ, выделенных от больных, служат микробиологическим критерием для определения величины пороговых концентраций. Кроме этого при определении пороговых МИК учитывают данные о фармакокинетике ПТП. Основным показателем при этом является максимальная концентрация ПТП, создающаяся в сыворотке крови при приеме ПТП в среднетерапевтической дозе. Четкая зависимость между этим показателем и величинами пороговых МИК отсутствует. В самом общем виде можно лишь сказать, что пороговые МИК не могут быть выше максимально достижимых в сыворотке крови. Третьим критерием для определения пороговых значений МИК служат данные о клинической эффективности ПТП при заболевании, вызываемом микроорганизмами с различными величинами МИК.

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

Таким образом, предложенные в разных странах величины пороговых значений МИК ПТП являются плодом консенсуса между ведущими экспертами, а не результатом точных расчетов. В зависимости от накопления опыта происходит их периодический пересмотр. Несмотря на определенную условность рекомендованных пороговых значений МИК ПТП, они являются основой для интерпретации результатов оценки чувствительности МБТ к ПТП. Степень лекарственной устойчивости МБТ в Республике Беларусь определяется в соответствии с установленными критериями (см. табл.).

Пороговые значения МИК

Название препарата	Предельная концентрация, мкг/мл
Стрептомицин	10
Изониазид	1
Рифампицин	40
Этамбутол	2
Канамицин	30
Этионамид (протионамид)	30
Вiomоцин	30
Циклосерин	30
Амикацин	8
Пиразинамид	200
Капреомицин	50
ПАСК	1
Рифабутин (микобутин)	4
Ломефлоксацин (максаквин)	10
Офлоксацин	10
Тиоацетазон	2

В лабораториях, проводящих исследования на лекарственную чувствительность МБТ, обязательно должно проводиться определение лекарственной чувствительности к основным ПТП (стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу).

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Приготовление и хранение среды Левенштейна — Йенсена (без крахмала)

Солевой раствор: калий фосфорнокислый однозамещенный, безводный 2,4 г; магний сернокислый 0,24 г; магний лимоннокислый 0,6 г; l-аспагарин 3,6 г; глицерин 12 мл; вода дистиллированная 600 мл. Реактивы растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом нагревании и стерилизуют автоклавированием при 121° С в течение 30 мин. Стерильный солевой раствор может храниться в холодильнике в течение 1 мес.

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

Яичная масса: 24–27 (в зависимости от величины) свежих (не более 7 дней) диетических яиц тщательно моют щеткой с мылом проточной теплой водой, погружают на 15 мин в 70% раствор этилового спирта, затем над спиртовкой в боксе разбивают стерильным пинцетом в стерильную колбу с бусами, хорошо размешивают. Добавляют 1 л яичной массы к 600 мл солевого раствора. Смесь фильтруют через марлевый фильтр, добавляют 20 мл стерильного 2% раствора малахитовой зелени и раствор ПТП, разливают в пробирки по 5 мл. Коагуляцию среды проводят не более чем через 15 мин после ее разлива. Пробирки со средой помещают в аппарат для свертывания в наклонном положении, чтобы получить скошенную поверхность среды. Свертывание среды проводят при 80–85° С в течение 45 мин. После коагуляции крышку свертывателя не открывают. Пробирки должны оставаться в исходном наклонном положении до полного остывания среды. При этом конденсационная жидкость полностью сохраняется и стекает на скошенную поверхность среза, не контактируя с пробкой. Для посева лучше применять свежеприготовленную среду. Если расход среды небольшой, следует готовить половинный объем.

Контроль стерильности каждой серии питательных сред производят инкубацией произвольно выбранных пробирок со средой при 37° С течение 24 ч.

Пробирки со средой Левенштейна — Йенсена хранят в холодильнике в туго завязанных целлофановых пакетах с указанием даты ее приготовления. Для получения достоверных результатов не следует хранить среду более 4 недель.

Приготовление среды для определения чувствительности МБТ к пиразинамиду

Во всем мире пиразинамид не включен в список препаратов для определения лекарственной чувствительности МБТ в связи со сложностью стандартизации метода, хотя необходимость этого очевидна. В настоящее время ведутся работы по разработке стандартного метода определения чувствительности к этому препарату. Ниже приводится состав среды для определения чувствительности к пиразинамиду, предложенный ЦНИИТ РАМН (Москва).

Солевой раствор: магния сульфат 0,3 г; натрия цитрат 0,6 г; калия фосфат однозамещенный 7,2 г; соль Мора 0,03 г; аминокислотная кислота (глицин) 1,2 г; аминокислотная кислота (L-аспарагин) 1,2 г; аммоний янтарнокислый 1,8 г; натрия фосфат однозамещенный 1,8 г; кислота янтарная 1,2 г; глицерин 10 мл; вода дистиллированная до 560 мл; рН 5,5. Реактивы растворяют в указанной последовательности при слабом подогревании и стерилизуют 2 ч текучим паром.

Яичная масса: 10 свежих (не более 7 дней) диетических яиц моют щеткой с мылом проточной теплой водой, погружают на 15 мин в 70% раствор этилового спирта, затем над спиртовкой в боксе разбивают стерильным пинцетом в стерильную колбу с бусами, хорошо размешивают и добавляют к 560 мл солевого раствора. Смесь фильтруют через марлевый фильтр, добавляют 10 мл стерильного 2% раствора малахитовой зелени, 30 мл гидролизина и раствор пиперазина, разливают в пробирки по 5 мл. Свертывание среды проводят при 80–85° С в течение 45 мин.

Приготовление растворов ПТП

Для приготовления растворов должны использоваться только химически чистые субстанции ПТП. Лекарственные формы препаратов для определения лекарственной чувствительности микобактерий непригодны. Для приготовления навесок ПТП необходимо использовать аналитические весы или другие равного класса точности. Концентрации рабочих растворов должны учитывать содержание активного начала препарата в используемой химической субстанции, а также фактор разбавления раствора ПТП в питательной среде.

Стрептомицина сульфат 10 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к стрептомицину используют порошковидную форму химически чистого вещества стрептомицина сульфата. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 10 мг стрептомицина сульфата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл. Рабочее разведение стрептомицина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Изониазид 1 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к изониазиду используют порошковидную форму химически чистого вещества изоникотиновой кислоты гидразида. Содержание активного начала препарата — не менее 990 мг в 1 г. Растворяют 10 мг изониазида в 1 мл этилового спирта, затем добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл. К 1 мл раствора добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе составляет 100 мкг/мл. Рабочее разведение изониазида добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора изониазида к 99 мл среды.

Рифампицин 40 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к рифампицину используют порошковидную форму химически чистого вещества рифампицина. Содержание активного начала препарата — не менее 950 мг в 1 г. Рифампицин не растворяется в дистиллированной воде. Растворяют 21 мг рифампицина в 5 мл этилового спирта. Концентрация рифампицина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл. Рабочее разведение рифампицина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Этамбутол 2 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к этамбутолу используют порошковидную форму химически чистого вещества этамбутола гидрохлорида. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 5 мг этамбутола дигидрохлорида в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 500 мкг/мл. К 2 мл раствора добавляют 3 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 200 мкг/мл. Рабочее разведение этамбутола добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Канамицина сульфат 30 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к канамицину используют порошковидную форму химически чистого вещества канамицина сульфата. Содержание активного начала препарата — не менее 750 мг в 1 г. Растворяют 40 мг канамицина сульфата в 10 мл стерильной дистиллированной воды (40 мг канамицина сульфата соответствует 30 мг канамицина). Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 3000 мкг/мл. Рабочее разведение канамицина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора канамицина к 99 мл среды.

Этионамид (протионамид) 30 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к этионамиду используют порошковидную форму химически чистого вещества этионамида. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 30 мг этионамида в 3 мл этилового спирта, затем добавляют 7 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этионамида в полученном растворе составляет 3000 мкг/мл. Рабочее разведение этионамида добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Циклосерин 30 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к циклосерину используют порошковидную форму химически чистого вещества циклосерина. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 15 мг препарата в 5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация циклосерина в полученном растворе составляет 3000 мкг/мл. Рабочее разведение циклосерина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Капреомицина сульфат 50 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к капреомицину используют порошковидную форму химически чистого вещества капреомицина сульфата. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 20 мг препарата в 4 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация капреомицина в полученном растворе составляет 5000 мкг/мл. Рабочее разведение капреомицина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Амикацин 8 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к амикацину используют порошковидную форму химически чистого вещества амикацина. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 8 мг препарата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация амикацина в полученном растворе составляет 800 мкг/мл. Рабочее разведение амикацина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Рифабутин (микобутин) 4 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к рифабутину используют порошковидную форму химически чистого вещества рифабутина. Растворяют 8 мг препарата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация рифабутина в полученном растворе составляет 800 мкг/мл. К 2 мл раствора добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация рифабутина в полученном растворе составляет 400 мкг/мл. Рабочее разведение рифабутина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Офлоксацин 10 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к офлоксацину используют порошковидную форму химически чистого вещества офлоксацина. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 10 мг препарата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация офлоксацина в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл. Рабочее разведение офлоксацина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Ломефлоксацин гидрохлорид (максаквин) 10 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к ломефлоксацину используют порошковидную форму химически чистого вещества ломефлоксацина гидрохлорида. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 10 мг препарата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация ломефлоксацина в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл. Рабочее разведение ломефлоксацина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Пиразинамид 200 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к пиразинамиду используют порошковидную форму химически чистого вещества пиразинамида. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 100 мг препарата в 5 мл стерильной дистиллированной воды, раствор слегка нагревают до растворения препарата. Концентрация пиразинамида в полученном растворе составляет 20000 мкг/мл. Рабочее разведение пиразинамида добавляют в среду для определения чувствительности к пиразинамиду перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Виомицин сульфат 30 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к виомицину используют порошковидную форму химически чистого вещества виомицина сульфата. Содержание активного начала препарата — 700 мг в 1 г. Растворяют 21 мг препарата в 5 мл стерильной дистиллированной воды (21 мг виомицина сульфата соответствуют 15 мг виомицина). Концентрация виомицина в полученном растворе составляет 3000 мкг/мл. Рабочее разведение виомицина добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

ПАСК 1 мкг/мл. Для определения лекарственной чувствительности к ПАСК используют порошковидную форму химически чистого вещества натриевой соли парааминосалициловой кислоты. Содержание активного начала препарата — 1000 мг в 1 г. Растворяют 10 мг препарата в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация ПАСК в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл. К 1 мл раствора добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация ПАСК в полученном растворе составляет 100 мкг/мл. Рабочее разведение ПАСК добавляют в среду Левенштейна — Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды.

Приготовление суспензии микобактерий, ее стандартизация, инокуляция, инкубирование посевов

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 физиологического раствора, 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. Инокуляция не стандартизированной смеси дает отклонение от истинного результата. Необходимо микроскопически контролировать приготовленную суспензию в мазке по Цилю — Нильсену для оценки качества дезинтеграции колоний и исключения наличия плотной среды во взвеси. Засевают 0,2 мл суспензии на пробирку. В пробирке должно быть небольшое количество конденсационной жидкости. Если ее нет, то допустимо при соблюдении правил стерильности добавить в каждую пробирку несколько капель физиологического раствора.

После посева пробирки помещают в термостат при 37° С в наклонном положении, так, чтобы поверхность среды располагалась горизонтально, для того, чтобы равномерно распределить суспензию микобактерий по поверхности среды. Через 2–3 сут инкубации пробирки закрывают резиновыми пробками и переводят в вертикальное положение.

Учет и интерпретация результатов

Пробирки с посевами инкубируют в течение 3–4 недель, еженедельно просматривая, отмечают время появления видимого роста, обильность роста в контрольных и опытных пробирках, контаминацию пробирок и т. д. Учет результатов определения лекарственной чувствительности проводят после 3 недель инкубирования. Поскольку сроки выделения возбудителя на яичных питательных средах составляют не менее 1–1,5 мес., результат определения лекарственной чувствительности МБТ указанным методом обычно получают не ранее чем через 2–2,5 мес. после посева.

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

Штамм микобактерий считается чувствительным к препарату в случае присутствия в популяции менее 1% резистентных микобактерий, то есть роста 20 и менее колоний на среде с препаратом при обильном росте в контроле. Штамм микобактерий считается устойчивым к препарату в случае присутствия в популяции более 1% резистентных микобактерий, то есть роста более 20 колоний на среде с препаратом при обильном росте в контроле. В случае скудного роста в контроле исследование необходимо повторить.

Контроль качества питательной среды

Качество каждой серии приготовленной питательной среды с ПТП необходимо проверять. В качестве контрольного штамма используется лабораторный невирулентный чувствительный ко всем ПТП штамм *M. tuberculosis* «Академия». Контрольный штамм засеивается так же, как испытуемые. Если среда с ПТП приготовлена правильно, то контрольный штамм МБТ не должен расти на средах, содержащих ПТП, при обильном росте в контроле. Появление роста контрольного штамма на среде, содержащей ПТП, свидетельствует о том, что при приготовлении среды допущена ошибка, либо суспензия микобактерий приготовлена неправильно. Если результат контроля свидетельствует о неудовлетворительном качестве серии среды, необходимо провести повторное определение лекарственной чувствительности всех штаммов МБТ с использованием новой серии среды.

Документация

Регистрация исследований на лекарственную чувствительность микобактерий в лаборатории ведется в лабораторном журнале (см. Приложение 1). В бланке направления на исследование обязательно указывается адрес больного, пол, возраст и сведения о предшествующей противотуберкулезной терапии. Результат исследования оформляется на бланке (см. Приложение 2).

Анализ результатов определения лекарственной чувствительности МБТ

В конце года лаборатории представляют отчет о количестве выполненных за год исследований на лекарственную чувствительность МБТ. В лаборатории проводится анализ результатов определения чувствительности штаммов МБТ к ПТП. В отчете анализируется первичная и приобретенная лекарственная резистентность МБТ, а также степень лекарственной резистентности микобактерий.

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

В соответствии с рекомендациями ВОЗ, под *первичной резистентностью* понимают резистентность МБТ, выделенных от пациента, активный туберкулез у которого развился после инфицирования лекарственно-устойчивым штаммом микобактерий. Первичной считается резистентность МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом, ранее не получавших лечения или получавших лечение не более одного месяца.

Под *приобретенной резистентностью* понимают резистентность МБТ, которая развивается во время лечения как следствие отбора резистентных мутантов микобактерий. Приобретенной считается резистентность МБТ, выделенных от больных туберкулезом, получавших лечение более одного месяца.

Под *полirezистентностью* понимают резистентность микобактерий более чем к одному ПТП.

Под *множественной лекарственной резистентностью* понимают резистентность микобактерий к изониазиду и рифампицину с или без резистентности к другим ПТП.

Контроль качества определения лекарственной чувствительности МБТ

Унификация методов определения лекарственной чувствительности МБТ предусматривает проведение внутреннего контроля качества исследований, проводимых в лаборатории, для оценки достоверности и воспроизводимости результатов, а также внешней оценки качества, позволяющей сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях.

Программа контроля качества определения лекарственной устойчивости МБТ должна включать:

1. Внутрилабораторный контроль качества, который касается всех видов исследований в каждой лаборатории (организации работы лаборатории, оборудования, сбора, транспортировки и обработки проб, качества реагентов и питательных сред, качества выполнения культуральных исследований и представления результатов) и проводится постоянно с целью оценки достоверности и воспроизводимости исследований.

2. Внешнюю оценку качества (обозначается термином «профессиональное тестирование»), которая выполняется по закодированным образцам два раза в год и позволяет оценивать точность работы лаборатории. Центральная или референс-лаборатория готовит материал для контрольного задания и направляет его в лаборатории, проводящие определение лекарственной чувствительности. Каждой лаборатории присваивается персональный код. Лаборатории, получившие контрольные образцы, проводят необходимые исследования и сообщают результаты в центральную или референс-лабораторию, которая проводит оценку результатов. Центральная лаборатория рассылает во все лаборатории отчет о проведении тестирования, что позволяет лабораториям сравнивать свои результаты с результатами работы других специалистов. Совпадение результатов между лабораториями должно составлять не менее 90%.

Согласно рекомендациям ВОЗ, внутренний и внешний контроль качества включает оценку правильности определения лекарственной чувствительности МБТ к четырем основным ПТП: изониазиду, стрептомицину, рифампицину и этамбутолу.

ПРИЧИНЫ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МБТ

- Неисправность весов или использование весов неподходящего класса точности;
- неправильный учет содержания активного начала в химической субстанции ПТП в случае несоответствия истинной активности препарата номенклатурной;
- использование ПТП и компонентов среды низкого качества, с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;
- неправильное приготовление разведений препаратов;
- произвольное уменьшение объема среды в пробирке, что приводит к нарушению соотношения между количеством клеток микобактерий и количеством ПТП. По данным В.А. Аникина (1999), засев чувствительных штаммов на пробирки с 5 и 2,5 мл среды Левенштейна — Йенсена дает статистически достоверное ($p < 0,001$) различие результатов исследования. На пробирках с 2,5 мл среды был выявлен рост МБТ, что в рутинных условиях дало бы в клинику заведомо искаженные сведения о наличии несуществующей резистентности МБТ;

Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

– несоблюдение времени и температуры свертывания питательной среды. Признаками, свидетельствующими об избыточной тепловой обработке, являются обесцвечивание готовой питательной среды или появление в ней пузырьков воздуха. Такие среды использовать нельзя. Повышение температуры или увеличение времени экспозиции приводит также к тепловой деградации препаратов, прежде всего стрептомицина и канамицина, что существенно завышает уровень лекарственной резистентности МБТ;

– нарушение условий и срока хранения готовой среды с ПТП;

– засев нестандартизированной суспензии микобактерий;

– отсутствие микроскопического контроля приготовленной для засева суспензии микобактерий в мазке по Цилю — Нильсену для оценки качества дезинтеграции колоний и исключения наличия плотной среды во взвеси. Несоблюдение этого условия всегда завышает уровень лекарственной резистентности МБТ;

– несоблюдение времени и температуры инкубирования посевов;

– отсутствие контроля качества сред с использованием музейного штамма или учет результатов определения лекарственной чувствительности МБТ в случае неудовлетворительных результатов контроля с использованием лабораторного штамма;

– учет результатов определения лекарственной чувствительности МБТ в случае скудного роста в контроле;

– неправильная интерпретация результатов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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 на лекарственную чувствительность МБТ.

ФОРМА ЛАБОРАТОРНОГО ЖУРНАЛА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ (пример заполнения)

Дата проведения исследования		23.05.2002	
Порядковый номер исследования		25	
Ф.И.О. пациента, возраст, пол		Иванов Сергей Петрович, 1953 г.р., м	
Сведения о полученном лечении		более 1 мес.	
Отделение стационара, направившее материал на исследование, или адрес пациента (для амбулаторных больных)		1-е терапевтическое отделение	
Порядковый номер штамма по журналу регистрации бактериологических исследований, материал, из которого выделен штамм, дата посева		№ 1674 от 19.03 из мокроты	
Результат бактериоскопии		КУБ+	
Результат определения лекарственной чувствительности МБТ	контроль	++++	
	среды с ПТП	изониазид, 1 мкг/мл	—
		стрептомицин, 10 мкг/мл	+++
		рифампицин, 40 мкг/мл	—
		этамбутол, 2 мкг/мл	
Дата выдачи результата исследования.		15.06	
Подпись			
Примечания			

БЛАНК ДЛЯ ВЫДАЧИ ОТВЕТА О РЕЗУЛЬТАТАХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

(пример заполнения)

Наименование учреждения, проводившего исследование

Лаборатория, в которой проводилось исследование

Анализ № 125

Результат определения лекарственной чувствительности микобактерий

Ф.И.О. больного Иванов Сергей Петрович

Отделение, направившее материал на исследование, или адрес больного 1-е терапевтическое отделение

Материал штамм № 1674 от 19.03.2002 г. из мокроты

Дата исследования 19.04.2002 г.

Чувствительность к основным ПТП

Препарат (концентрация), мкг/мл	Выделенный штамм микобактерий	
	чувстви- телен	устойчив
Изониазид	1	–
Стрептомицин	–	10
Рифампицин	40	–
Этамбутол	2	–

Чувствительность к ПТП второго ряда

Препарат (концентрация), мкг/мл	Выделенный штамм микобактерий	
	чувстви- телен	устойчив
Этионамид	30	–
Канамицин	30	–
Циклосерин	30	–
Капреомицин	–	50
ПАСК	–	1
Амикацин	8	–
Микобутин	4	–
Офлоксацин	10	–

« » _____ 200 г. Врач-бактериолог _____