

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА
СРЕДЕ «НОВАЯ»**

Пособие для врачей

Екатеринбург

2004

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

Утверждаю:
Председатель секции по фтизиатрии №12
Ученого совета Минздрава России

Академик РАМН
профессор М.И.Перельман

протокол № _____ от _____

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ НА
СРЕДЕ «НОВАЯ»**

Пособие для врачей

Екатеринбург

2004

АННОТАЦИЯ

Представлена методика определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам методом абсолютных концентраций на плотной среде «Новая», которая была предложена для выращивания микобактерий туберкулеза Г.Г.Мордовским. Применение данной питательной среды позволяет сократить сроки учета результатов в 2 раза.

Данное пособие предназначено для бактериологов противотуберкулезных учреждений.

Организация- исполнитель: Уральский НИИ фтизиопульмонологии

Авторы: Кравченко М.А., Вахрушева Д.В., Мордовской Г.Г.

ВВЕДЕНИЕ

Определение спектра и степени чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам имеет большое значение для тактики химиотерапии больных, контроля за эффективностью лечения, определения прогноза заболевания и является необходимым компонентом проведения эпидемиологического мониторинга лекарственной устойчивости микобактерий [3,5].

Уровень устойчивости штамма к какому-либо препарату выражается той максимальной концентрацией препарата (количество микрограммов в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается размножение микобактерий (о чем судят по числу колоний на плотных средах).

Лекарственно-устойчивые микроорганизмы способны размножаться при таком содержании препарата в среде, которое оказывает на чувствительные особи бактериостатическое или бактерицидное воздействие.

В настоящее время для определения лекарственной чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам в международной практике используют следующие методы:

— метод пропорций на среде Левенштейна-Йенсена или на среде Миддлбука 7H10,

- метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена,
- метод коэффициента резистентности,
- радиометрический метод Bactec ® 460, а также другие автоматические и полуавтоматические системы.

Для получения сопоставимых результатов в процессе мониторинга лекарственной чувствительности МБТ **в масштабах страны должен использоваться только один** из предложенных унифицированных методов.

В нашей стране получило распространение определение лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Мы предлагаем использовать для определения лекарственной устойчивости также питательную среду, предложенную Г.Г.Мордовским для культивирования микобактерий туберкулеза [2] (далее в тексте- среда «Новая»), которая рекомендована в приказе МЗ РФ №109 для культивирования микобактерий туберкулеза [3]. Использование этой среды позволяет проводить учет результатов в более короткие сроки.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЙ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА НЕТ.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

В данном методе используют чистые субстанции противотуберкулезных препаратов основного и резервного рядов, например:

- ✓ Пара-амино-салициловая кислота (ПАСК)- p-Aminosalicylic acid [65-49-6] EC N 200-613-5 (производство SIGMA, USA);
- ✓ этионамид-Ethionamide [636-33-4] EC N 208-628-9 (производство SIGMA, USA);
- ✓ стрептомицин- Dihydrostreptomycin [5490-27-7] EC N 226-823-7 (производство SIGMA, USA);
- ✓ капреомицин-Capreomycin sulfate [1405-37-4] EC N 215-776-8 (производство SIGMA, USA);
- ✓ рифампицин- Rifampicin EC N 2363120 (производство Fluka Chemie GmbH, Switzerland);
- ✓ циклосерин- D-Cycloserine [68-41-7] EC N 200-688-4 (производство SIGMA, USA);
- ✓ этамбутол- Ethambutol dihydrochloride [1070-11-7] EC N 213-970-7 (производство SIGMA, USA);
- ✓ изониазид- Isonicotinic acid hydrazide [54-85-3] EC N 200-214-6 (производство SIGMA, USA);

- ✓ канамицин-Kanamycin [25389-94-0] EC N 246-933-9 (производство SIGMA, USA);
- ✓ желтки куриных яиц;
- ✓ калий фосфорнокислый одноосновной (ТУ 6-09-5324-87);
- ✓ натрий лимоннокислый (ГОСТ 22280-76);
- ✓ магний сернокислый (ГОСТ 4523-77);
- ✓ натрий пировинограднокислый (ТУ 6-09-08-990-83);
- ✓ глицерин (ГОСТ 6259-75);
- ✓ малахитовый зеленый (ТУ 6-09-1551-72).
- ✓ Весы лабораторные (например, весы для химических реактивов с точностью до 0,01г, ГОСТ 24104-80, рекомендованные к применению приказом МЗ РФ №109);
- ✓ аппарат для свертывания питательных сред (например, АСПС-«Торгмаш», рег.№ 29/07020401/3573-02);
- ✓ термостат на 37°С (например, термостат суховоздушный ТВ-80-«ПК-К», рег.№ 98/219-151).

**ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
МЕТОДОМ АБСОЛЮТНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НА СРЕДЕ
«НОВАЯ»**

Общие сведения

Метод абсолютных концентраций в большинстве случаев применяют для непрямого определения лекарственной устойчивости. Непрямым методом называется метод определения лекарственной устойчивости после выделения культуры микобактерий. Результаты определения лекарственной устойчивости указанным методом на среде Левенштейна-Йенсена обычно получают не ранее, чем через 2 - 2,5 месяца после посева материала. Использование питательной среды «Новая» позволяет значительно сократить эти сроки [4].

Для метода абсолютных концентраций появление более 20 КОЕ микобактерий на питательной среде, содержащей лекарственный препарат в критической концентрации, свидетельствует о том, что данный штамм микобактерий обладает лекарственной устойчивостью. При этом необходимо иметь ввиду, что объем засеваемой суспензии клеток стандартизован и соответствует $1 \cdot 10^7$ микробных тел [3].

В отечественной фтизиатрической практике при определении лекарственной устойчивости не ограничиваются определением только критических кон-

центраций [3]. Это связано с тем, что расширенное определение уровня лекарственной устойчивости возбудителя позволяет клиницисту варьировать дозировки препаратов и лекарственные режимы, добиваясь более эффективного воздействия препаратов за счет допустимого повышения дозы и использования синергидных и аддитивных свойств различных комбинаций лекарственных препаратов.

**Концентрации препаратов, используемые при определении
лекарственной устойчивости микобактерий методом абсолютных
концентраций на среде «Новая»**

Препарат	Концентрации в мкг/мл	
Препараты I ряда		
Стрептомицин	10	25
Изониазид	1	10
Рифампицин	40	80
Этамбутол	2	5
Препараты II ряда*		
Канамицин	30	50
Протионамид (этионамид)	30	50
Циклосерин	30	50
Капреомицин	30	50
Офлоксацин	2	10

*Критические концентрации препаратов II ряда носят ориентировочный характер и будут окончательно установлены после официального их опубликования.

**Приготовление питательной среды и разведение противотуберкулезных
препаратов**

В рецепт питательной среды «Новая» входят следующие компоненты (в весовых %):

Калий фосфорнокислый одноосновной	0,05
Натрий лимоннокислый	0,05
Магний сернокислый	0,05
Гликокол	0,2
Глицерин	3,6
Малахитовая зелень	0,036
Желтки	50,0
Дистиллированная вода	до 100,0

Способ получения концентрированной питательной среды заключается в смешивании сухих навесок ингредиентов солей (кроме бактерицидного красителя) с желточной массой, стерилизации ингредиентов 70° этиловым спиртом, растворении бактерицидного красителя в глицерине и соединении всех компонентов среды.

Для получения 1 литра концентрированной питательной среды необходимо:

- 1) **Сделать навески:** однозамещенного фосфорно-кислого калия – 1 г, лимоннокислого натрия – 1 г, сернокислой магнезии – 1 г, гликокола – 4 г.
- 2) **Простерилизовать навески** путем смачивания их 7 мл 70° этилового спирта. Затем поместить их в термостат при температуре

37°C и высушить при периодическом помешивании в течение 45 минут.

- 3) **Приготовить 1 литр желточной массы** путем обеззараживания 70° спиртом 50 штук яиц, отделения белка от желтка и гомогенизации последнего.
- 4) **Приготовить желточно-солевую смесь.** К 1 литру желточной массы (по п.3) добавить стерильные навески (по п.2) и перемешать.
- 5) **Приготовить раствор бактерицидного красителя.** На 1 л желточной массы взять 700 мг малахитовой зелени и растереть в 70 мл глицерина (это соответствует 1% раствору малахитового зеленого в глицерине).
- 6) **Получение концентрированной питательной смеси.** Производят соединение 1 л желточно-солевой смеси с 70 мл 1% раствора малахитового зеленого в глицерине (по п.5) и тщательно гомогенизируют.
- 7) **Выдерживание смеси.** Полученную концентрированную питательную смесь выдерживают в течение суток при температуре 20°C.
- 8) **Разлив концентрированной питательной среды.** Разливают среду во флаконы емкостью 250 мл, которые герметично упаковывают.

- 9) **Хранение.** Укупоренные флаконы с концентрированной питательной средой хранят при комнатной температуре или холодильнике при 3-5°C.

При централизованном приготовлении концентрированной питательной среды ее можно транспортировать любым видом транспорта при температуре $\pm 30^{\circ}\text{C}$.

- 10) **Приготовление сколов плотной питательной среды.** К концентрированной питательной среде добавляют равный объем стерильной дистиллированной воды, гомогенизируют, разливают по 5 мл в пробирки. Для образования скола питательной среды пробирки укладывают в наклонном положении в свертыватель, предварительно нагретый до 90°C. Среду коагулируют 20 минут при температуре 82 - 83°C.

- 11) **Хранение пробирок с питательной средой.** Пробирки с питательной средой могут храниться в холодильнике при температуре 5°C в течение 2 – 3 месяцев. При длительном хранении необходимо пробирки герметично укупорить и поместить в полиэтиленовые пакеты, чтобы предотвратить высыхание среды.

При определении лекарственной чувствительности в питательную среду «Новая» непосредственно перед свертыванием добавляют рабочие разведения субстанций различных противотуберкулезных препаратов. Для этого необходимо использовать **химически чистые субстанции**

противотуберкулезных препаратов.

Для приготовления из химически чистой порошковидной формы препарата рабочих растворов, содержащих необходимые для исследования концентрации активной субстанции, расчеты производят с учетом процента активности препарата.

Активность препарата может варьировать от одной его серии к другой . Сведения об активности приводятся на этикетках или упаковках лекарственных препаратов и могут быть получены от компании-изготовителя.

***Приготовление питательной среды «Новая» с
противотуберкулезными препаратами***

Стрептомицин

Для определения лекарственной чувствительности к стрептомицину используют стрептомицина сульфат.

По данным производителя активность стрептомицина сульфата составляет 750 мг в 1 г чистой субстанции.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (А), содержащий в 1 мл раствора 1 мг активной субстанции, следует:

— (А) приготовить навеску 20 мг стрептомицина сульфата с точностью до 0,2 мг, что будет соответствовать 15 мг активного начала, и растворить в 15 мл стерильной дистиллированной воды — $1 \text{ мг/мл} = 1000 \text{ мкг/мл}$;

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок

по 5 мл) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1 - 10 мкг/мл, № 2 - 25 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

— в № 1 — 198 мл среды + 2 мл раствора (А) = 10 мкг/мл;

— в № 2 — 195 мл среды + 5 мл раствора (А) = 25 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора (А), а затем - расчетное количество питательной среды.

Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы № 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины косяков (примерно 8 - 10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

И з о н и а з и д

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 990 мг активного начала = 99%.

Приготовить навеску 20 мг изониазида.

— (А) в 20 мл стерильной дистиллированной воды растворить 20 мг изониазида — 1 мг/мл = 1000 мкг/мл;

— (Б) к 9 мл стерильной дистиллированной воды добавить 1 мл раствора (А) — 100 мкг/мл.

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл · 40)

на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1 - 1 мкг/мл, № 2 - 10 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

— в № 1 — 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) = 1 мкг/мл;

— в № 2 — 198 мл среды + 2 мл раствора (А) = 10 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора (Б) или (А), а затем расчетное количество питательной среды.

Перемешивание, разливание и коагулирование производят, как и в предыдущем случае.

Р и ф а м п и ц и н

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции — 970 мг активного начала = 97%.

Взвесить 30 мг порошковидной формы чистой субстанции рифампицина.

Рифампицин нерастворим в дистиллированной в воде, поэтому можно предложить нижеприведенную последовательность приготовления растворов:

Приготовление питательной среды:

На 200 мл питательной среды на 40 культур (5мл · 40):

Приготовить навеску 30 мг и перенести ее в стерильную пробирку №1.

— (1) 30 мг рифампицина + 2,0 мл этанола — 14550 мкг/мл;

Подогреть до $T^{\circ} 35 — 40 C$ на водяной бане. Затем, используя стерильные пробирки:

— (А) 2,0 мл раствора (1) + 5,2 H₂O — 4000 мкг/мл;

— (Б) 2,5 мл раствора (А) + 2,5 мл H₂O — 2000 мкг/мл;

Маркируют стерильные колбы: №1 «40 мкг/мл», №2 «80 мкг/мл»:

— в №1 4 мл (Б) + 196 мл среды — 40 мкг/мл

— в №2 4 мл (А) + 196 мл среды — 80 мкг/мл

Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35 - 40°C. Затем добавить стерильной дистиллированной воды.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество растворов (А) или (Б), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды.

Содержимое колб №1 и №2 тщательно перемешать круговыми движениями. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы № 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины косяков (примерно 8-10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Этамбутол

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции — 740 мг активного начала. Для определения лекарственной устойчивости используют этамбутол дигидрохлорид.

— (А) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить ее в 14,8 мл стерильной дистиллированной воды — 1 мг/мл = 1 000 мкг/мл;

— (Б) к 8 мл стерильной дистиллированной воды добавить 2 мл раствора

(А) — 200 мкг/мл;

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5мл · 40) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1 - 2 мкг/мл, № 2 - 5 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

— в № 1 — 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) = 2 мкг/мл;

— в № 2 — 195 мл среды + 5 мл раствора (Б) = 5 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора (Б), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды.

Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы №1. Пробирки поместить аппарат для свертывания и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

К а н а м и ц и н

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции канамицина моносульфата может содержаться от 750 до 823 мг активного начала.

Для расчета возьмем величину активности, равную 750 мкг в 1 мг.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (А), содержащий в 1 мл раствора 2000 мкг активной субстанции, следует:

— (А) приготовить навеску 30 мг порошковидной формы канамицина моносульфата = 22,5 мг активного начала и растворить в 11,3 мл стерильной дистиллированной воды — 2 мг/мл = 2 000 кг/мл.

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1 - 30 мкг/мл, № 2 - 50 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

— в № 1 — 197 мл среды + 3 мл раствора (А) = 30 мкг/мл;

— в № 2 — 195 мл среды + 5 мл раствора (А) = 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора (А), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды.

Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы № 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания, добиваясь равномерной величины косяков (примерно 8 - 10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Протионамид (этионамид)

Оба препарата плохо растворяются в воде.

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции — 990 мг активного

начала.

Препарат не растворим в дистиллированной воде.

— (А) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества, и растворить в 3 мл ректифицированного этилового спирта 96° или диметилсульфоксида. Добавить к раствору 6,9 мл стерильной дистиллированной воды—2 000 мкг/мл;

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл · 40) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1— 30 мкг/мл, № 2— 50 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в № 1 — 197 мл среды + 3 мл раствора (А) — 30 мкг/мл;
- в № 2 — 195 мл среды + 5 мл раствора (А) — 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора (А), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды.

Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы №1. Пробирки поместить аппарат для свертывания и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Капреомицин

Содержание активного начала в препарате — 840 мг в 1 г.

Растворы с капреомицином отличаются нестабильностью, поэтому их готовят непосредственно перед приготовлением сред. Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл · 40) можно воспользоваться следующей схемой:

Приготовить навеску 20 мг вещества

— (А) 20 мг См + 8,4 мл H₂O — 2 000 мкг/мл;

Колбы (№1 «30 мкг/мл», №2 «50 мкг/мл»):

— в №1 3 мл (1) + 197 мл среды — 30 мкг/мл

— в №2 5 мл (1) + 195 мл среды — 50 мкг/мл

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора (А), а затем расчетное количество питательной среды.

Перемешивание, разливание и коагулирование производят, как и в предыдущем случае.

Циклосерин

В 1 г препарата содержится 980 мг активного начала.

Растворы с циклосерином отличаются нестабильностью, поэтому их готовят непосредственно перед приготовлением сред.

— (А) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества, и растворить в 9,9 мл стерильной дистиллированной воды — 2 мг/мл = 2 000 мкг/мл;

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5мл · 40) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1— 30 мкг/мл, № 2— 50 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в № 1 — 197 мл среды + 3 мл раствора (А) — 30 мкг/мл;
- в № 2 — 195 мл среды + 5 мл раствора (А) — 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора (А), а затем расчетное количество питательной среды.

Перемешивание, разливание и коагулирование производят, как и в предыдущем случае.

ПАСК

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции — 877,2 мг активного начала.

Для примера расчета возьмем среднюю величину активности, равную -880 мг в 1 мг.

Чтобы получить исходный рабочий раствор (А), содержащий в 1 мл раствора 1,0 мг активной субстанции, следует:

— (А) взвесить на электронных или аналитических весах 20 мг порошковой формы ПАСК = 17,6 мг активного начала и растворить в 17,6 мл стерильной дистиллированной воды — 1 мг/мл = 1 000 мкг/мл;

— (Б) к 18 мл стерильной дистиллированной воды добавить 2 мл раствора (А)— 100 мкг/мл.

Приготовление питательной среды:

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (40 пробирок по 5 мл) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (№ 1 — 1 мкг/мл, № 2 — 5 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

— в № 1 — 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) — 1 мкг/мл;

— в № 2 — 190 мл среды + 10 мл раствора (Б) — 5 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора (Б), а затем последовательно добавить в каждую из них расчетное количество питательной среды.

Тщательно перемешать содержимое круговыми движениями колбы. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы №1. Пробирки поместить в аппарат для свертывания и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Контроль культур и среды

Культуральные свойства микобактерий туберкулеза на среде «Новая»:

на питательной среде «Новая» колонии микобактерий туберкулеза отличаются пышностью роста, имеют вид, в основном, влажных или иногда- сухих и шероховатых выпуклых округлых образований с желтоватым оттенком, приобретающих при разрастании вид розетки.

Они хорошо видны на зеленоватом фоне среды, но при длительном

выращивании краситель среды обесцвечивается, и среда приобретает кремовый цвет.

Непосредственно перед постановкой опыта по определению лекарственной устойчивости необходимо убедиться в том, что отобранные для исследования культуры микобактерий не загрязнены посторонней микрофлорой. Для этого необходимо:

— провести визуальную (макроскопическую) оценку каждой отобранной культуры, обращая внимание на массивность и характер роста, однородность колоний, отсутствие загрязнения, цвет питательной среды;

— провести микроскопию окрашенного по Цилю-Нильсену мазка из отобранной культуры с целью определения чистоты культуры и степени ее кислотоустойчивости.

Проверенные и отобранные для постановки опыта культуры микобактерий расставить в штативе в порядке номеров.

Приготовление бактериальной суспензии

Выросшую на плотной питательной среде культуру (обязательно несколько колоний) снимают платиновой лопаточкой и помещают в стерильную фарфоровую ступку или толстостенную стеклянную пробирку. В случае наличия роста на 2 пробирках с разными питательными средами (Левенштейна-Йенсена, «Новая») для приготовления суспензии культуру снимают с обеих пробирок. Тщательно

растирают пестиком или стеклянной палочкой, постепенно добавляя по каплям стерильный физиологический раствор. Полученную суспензию отбирают пастеровской пипеткой и переносят в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности. Для осаждения клеточных конгломератов и стеклянных или фарфоровых частиц густую исходную суспензию клеток отстаивают в течение 15 минут и переносят в новую пробирку. После этого суспензию культуры стандартизируют по оптическому стандарту мутности № 5 (500 млн. микробных тел в 1 мл).

Затем разводят в 10 раз стерильным физиологическим раствором. Для этого следует заранее приготовить ряд пробирок по числу исследуемых культур микобактерий и подписать на них номера исследуемых культур. В каждую пробирку налить по 9 мл стерильного физиологического раствора. После приготовления суспензий всех взятых в опыт культур микобактерий в каждую из приготовленных пробирок внести стерильной пипеткой по 1 мл суспензии микобактерий, соответствующей стандарту № 5. Получают суспензии с содержанием клеток, соответствующим $5 \cdot 10^7$ микробных тел. Посев на среды с лекарственными препаратами производить из этих суспензий.

Контроль среды

Каждую серию приготовленной питательной среды «Новая» с препаратами необходимо проверить, засевая на нее лабораторный штамм микобактерий

туберкулеза H₃₇Rv или клинический штамм, чувствительный ко всем испытуемым противотуберкулезным препаратам.

Если среда с препаратами приготовлена правильно, то контрольный лабораторный штамм H₃₇Rv на ней не растет. Появление роста контрольного штамма в пробирках с препаратами указывает на то, что при приготовлении среды допущена ошибка или на то, что неправильно приготовлена бактериальная суспензия.

При подготовке процедуры исследования необходимо предварительно:

- занести номера отобранных культур в рабочий журнал;
- расставить в штативы наборы питательных сред с препаратами для каждой культуры, контрольную пробирку (со средой без препаратов) и пробирку со средой, содержащей салицилат натрия — 1000 мкг/мл;
- на каждой пробирке со средой написать номер культуры, название препарата и его концентрацию.

Пример:

Надпись на пробирке				
№ культуры по журналу регистрации	203	203	203	203
Пояснения	Контроль	Натрия салицилат	Стрептомицин 10 мкг/мл	Стрептомицин 25 мкг/мл

Процедура посева

— полученную бактериальную суспензию набрать в мерную пипетку объемом 1,0 или 2,0 мл;

— внести по 0,2 мл суспензии в верхнюю 1/3 косяка во все пробирки с питательной средой, приготовленной для определения устойчивости культуры данного номера, тщательно сверяя номер культуры засеваемой суспензии с номерами, написанными на пробирках. Во избежание ошибок все пробирки, подготовленные для засева одной культуры, следует расставлять в одном ряду штатива;

— каждую засеянную суспензией пробирку закрыть ватно-марлевой или дренированной силиконовой пробкой и поставить в вертикальный штатив с тем, чтобы суспензия равномерно распределялась по поверхности косяка среды к дну пробирки;

— использованную для засева пипетку опустить в емкость с дезинфицирующим раствором;

— по завершении засева всех суспензий засеянные пробирки переместить в горизонтальные штативы - "диваны" и поместить в термостат при температуре 37°C; при этом поверхность косяка питательной среды должна находиться в горизонтальной плоскости, а наклон штатива должен исключить смачивание пробки материалом засева;

- по истечении 2-3 суток инкубации ватно-марлевые пробки заменить резиновыми или недренированными силиконовыми;

- после этого засеянные пробирки перевести в вертикальное положение;
- инкубирование проводить в течение 2- 4 недель при обязательном еженедельном просмотре.

Оценка результатов

Чтение результатов устойчивости проводят на 10-12 сутки. При отсутствии роста микобактерий туберкулеза в контрольных пробирках посеvy следует оставить в термостате еще на одну неделю, после чего выдать окончательный ответ. Проводить учет в более поздние сроки не рекомендуется, так как в этом случае будет завышена степень устойчивости микобактерий вследствие разрушения препаратов. При отсутствии роста в контроле исследование необходимо повторить. При выявлении единичных мелких колоний нужно сделать пересев культуры для ее размножения. Обычно этот срок равен 8-10 суткам.

Культуру считают чувствительной к данной концентрации препарата, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 мелких колоний при обильном росте в контрольной пробирке.

Культура считается устойчивой к концентрации препарата, которая содержится в данной пробирке, если в пробирке со средой выросло более 20 колоний («сливной рост») при обильном росте в контроле.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

В течение последних 3-х лет в лаборатории микробиологии УНИИФ проводили определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам основного и резервного рядов параллельно на двух средах- Левенштейна-Йенсена и «Новой» методом абсолютных концентраций.

За это время лекарственная устойчивость была определена у 3000 культур. Сроки и массивность роста, а также результаты параллельного определения лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам на питательных средах Левенштейна-Йенсена и «Новая» представлены в таблицах 1,2.

Таблица 1.

СРОКИ РОСТА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И ВЫХОД МИКРОБНОЙ МАССЫ ИЗ МАТЕРИАЛА ОТ ВНОВЬ ВЫЯВЛЕННЫХ БОЛЬНЫХ

Питательные среды	Сроки роста, сут.	Количество микробной массы, мкг
Левенштейна-Йенсена	42-49	39,4±8,3
«Новая»	28-42	53,4±9,2

Таблица 2.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ 3000 КУЛЬТУР
МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА НА РАЗНЫХ СРЕДАХ**

Питательные среды	Чувствительных		Устойчивых	
	%	Сроки роста, сут.	%	Сроки роста, сут.
Левенштейна-Йенсена	54,6	16 \pm 1	45,4	18 \pm 2
«Новая»	50,8	10 \pm 1	49,2	12 \pm 2

Данные, приведенные в таблице 1 показывают, что на среде «Новая» первичный рост появляется на 28 сутки после посева, в то время как на среде Левенштейна-Йенсена – на 42 сутки, при этом количество микробной массы на среде «Новая» в 1,4 раза больше, чем на среде Левенштейна-Йенсена, что дает возможность исследования выделенных культур в более ранние сроки.

Параллельное определение лекарственной устойчивости на средах Левенштейна-Йенсена и «Новой» 3000 выделенных от больных культур МБТ показало совпадение результатов в среднем в 93% случаев при сокращении времени лабораторного анализа в 1,5-2 раза при использовании среды «Новой». При этом результаты определения чувствительности

культур на двух средах к изониазиду и рифампицину совпали в 95% случаев, а к стрептомицину и этамбутолу - в 90% случаев.

Использование питательной среды «Новая» позволило:

- сократить сроки определения лекарственной чувствительности МБТ в 1,5-2 раза, что является очень важным для тактики химиотерапии больных туберкулезом.
- повысить эффективность использования термостатов, холодильников, аппаратов для свертывания питательных сред и другого лабораторного оборудования за счет сокращения времени его загрузки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бактериологические методы исследования при силикотуберкулезе.
/Инструктивные указания МЗ РСФСР. Свердловск, 1984.-14с.
2. Мордовской Г.Г. Питательная среда выращивания микобактерий туберкулеза./ А.с. СССР № 278039 от 22.05.70.
3. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации. / Приказ МЗ РФ от 21.03.03. №109.
4. Приготовление и использование новой питательной среды для выращивания микобактерий туберкулеза./Методические указания МЗ РСФСР. М., 1972.-9с.
5. Современные методы лабораторной диагностики туберкулеза./Методические рекомендации МЗ РФ. М., 1992.-22с.