

Эсеналиева А.А.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА АБСОЛЮТНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS*

Esenalieva A.A.

IMPROVEMENT OF METHOD ABSOLUTE CONCENTRATION FOR SURVEILLANCE OF TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE

УДК: 616.022.5-078:576.852.21:543.39

*В данной работе представлены результаты изучения лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* методом Абсолютных концентраций за 2002-2006 гг. Использование усовершенствованного метода абсолютных концентраций путем увеличения сроков интерпретации результатов теста лекарственной чувствительности позволяет повысить эффективность выявления мультирезистентных штаммов микобактерий туберкулеза.*

Ключевые слова: туберкулез, метод Абсолютных концентраций, лекарственная устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда, среда Левенштейна-Йенсена.

This article has presented of results of surveillance of tuberculosis drug resistance since 2002 until 2006. Use of improved method absolute concentration by increasing of interpretation's time of drug sensibility testing results allow to increase the efficiency of detection drug resistant strains.

Key words: tuberculosis, method absolute concentration, drug susceptibility testing to first-line drug, medium Lowenstein-Jensen.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных методов диагностики туберкулеза является бактериоскопический и бактериологический методы. Результаты бактериологических исследований позволяют поставить окончательный диагноз туберкулеза, увеличить число бактериологически подтвержденных случаев легочного туберкулеза на 20-40%, а также определить чувствительность к противотуберкулезным препаратам.

В связи с всеобщей обеспокоенностью увеличивающейся заболеваемостью резистентными формами туберкулеза в республике, необходимо повышение эффективности диагностики резистентного туберкулеза в том числе бактериологическими методами.

Целью данной работы явился поиск путей усовершенствования метода абсолютных концентраций для определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалами исследования служили ежегодные отчеты по проведению бактериологических исследо-

ваний и отчеты по изучению тестов лекарственной устойчивости (ТЛУ) МБТ за 2002–2006 годы.

Бактериологические исследования по выявлению *M.tuberculosis* в проводились в 5-ти лабораториях республики. Определение лекарственной чувствительности МБТ проводилось только в Республиканской референс-лаборатории (РРЛ) Национального центра фтизиатрии (НЦФ).

При первичном выделении микобактерий туберкулеза применялся метод с использованием гидроокиси натрия (модифицированный метод Петрова) на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й).

Все выделенные культуры микобактерий туберкулеза были исследованы на лекарственную чувствительность методом абсолютных концентраций к ПТП первого ряда: изониазид (H), рифампицин (R), стрептомицин (S) и этамбутол (E).

Статистическая обработка полученных данных проводилась на IBM PC – совместимом компьютере с помощью пакета электронных таблиц Excel, версией Microsoft Excel 2003 под управлением операционной системы Windows 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включены данные больных ранее не получавших и получавших в прошлом противотуберкулезное лечение.

Интерпретация результатов лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций до 2003 года проводилась согласно Приказу № 558 от 8 июня 1978 года Министерства здравоохранения СССР на 21-й день после засева, при скудном росте МБТ в контрольной пробирке, результат анализа выдавали на 28 день.

Результат выдавался как чувствительная культура МБТ, если в пробирке со средой содержащей препарат нет роста или выросло менее, чем 20 колоний при обильном росте микобактерий туберкулеза в контрольной пробирке без добавления лекарства. Только при наличии более 20 колоний культура расценивалась как устойчивая.

В сентябре 2003 РРЛ НЦФ успешно прошла первое «пробное» профессиональное тестирование и

сертифицирована Супранациональной референс-лабораторией (СРЛ) г. Борстел, Германия под руководством доктора Сабины Руш Гердес.

Во время прохождения профессионального тестирования были получены 10 культур из СРЛ, которым был проведен ТЛУ к четырем препаратам первого ряда (HRSE) с использованием метода абсолютных концентраций и интерпретация результатов на 21 день. Совпадение результатов ТЛУ между данными результатов РРЛ и данными результатов СРЛ г. Борстел составило 92,5 % (из 40 проб - 3 несовпадения).

При анализе данных результатов обнаруженные несовпадения в трех пробах - это отсутствие роста культур проводилась на 21-й день роста и интерпретированы как чувствительные, но рост культур этих проб был получен на 28-й день, что совпадало с результатами СРЛ.

После «пробного» профессионального тестирования РРЛ перешла на интерпретацию результатов по «совмещенному методу». Это посев на ТЛУ проводится по методу абсолютных концентраций и интерпретация результатов по методу пропорций: на 21-й день, на 28-й день определяется устойчивость на основе наблюдаемого роста колоний на среде Л-Й с лекарством и анализ результатов на 42-й день позволяет получить окончательные результаты по лекарствам, к которым штамм МБТ чувствителен.

Решение оставить просмотр роста культур на 21-й день основано на том, что у мультирезистентных штаммов ко всем 4 противотуберкулезным препаратам (HRSE) отмечается, как правило, обильный рост микобактерий туберкулеза уже на 14-й и 21-й дни. В связи с этим нет смысла ждать до 28-го дня просмотра, и результат выдается как можно быстрее клиницисту для проведения адекватной химиотерапии.

РРЛ 30 ноября 2004 года успешно прошла второй этап профессионального тестирования со 100% совпадением результатов при определении лекарственной чувствительности МБТ к 4 препаратам первого ряда методом абсолютных концентраций, применяя новую методику интерпретации результатов ТЛУ.

Были присланы 20 культур из СРЛ г. Борстел, которые были посеяны на нативную питательную Л-Й, где по согласованию с СРЛ содержание изониазида составило – 0,1 мг/мл, рифампицина – 40,0 мг/мл, стрептомицина – 5,0 мг/кг и этамбутола – 0,2 мг/мл.

Интерпретация результатов ТЛУ проводилось на 21 день (Приказ № 588), на 28 день и на 42 день для выдачи окончательных результатов ТЛУ. Результаты и сопоставление с результатами СРЛ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты профессионального тестирования ТЛУ к препаратам первого ряда (данные за 2004)

№	№ культуры	Результаты РРЛ				Результаты СРЛ			
		S	H	R	E	S	H	R	E
1	9331-03	Уст	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
2	9332-03	Чув	Уст	Уст	Чув	1	1	1	1
3	9337-03	Уст	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
4	9338-03	Чув	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
5	9339-03	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
6	9340-03	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
7	9341-03	Уст	Уст	Уст	Чув	1	1	1	1
8	9342-03	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
9	9343-03	Уст	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
10	9347-03	Уст	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
11	9348-03	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
12	9349-03	Чув	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
13	9350-03	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
14	9352-03	Уст	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
15	9353-03	Чув	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
16	9354-03	Уст	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
17	9355-03	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
18	9356-03	Чув	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
19	9358-03	Уст	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
20	9359-03	Чув	Чув	Уст	Уст	1	1	1	1

Уст = устойчивые; Чув = чувствительные
1 = правильно; 0 = неправильно

В 2005 году РРЛ прошла профессионального тестирования с 97,5% совпадением результатов при определении лекарственной чувствительности к препаратам первого ряда методом абсолютных концентраций. Из 80 проб (20 культур, к 4 препаратам), пересейанных на питательную среду Л-Й было определено лишь 2 несовпадения результатов: 1 проба ложно-чувствительная к этамбутолу и 1 проба ложно-устойчивая к рифампицину. Интерпретация результатов также проводилась на 21 день, на 28 день и на 42 день (табл. 2).

Таблица 2

Результаты профессионального тестирования ТЛУ к препаратам первого ряда (данные за 2005)

№	№ культуры	Результаты РРЛ				Результаты СРЛ			
		S	H	R	E	S	H	R	E
1	8027/04	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
2	8028/04	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
3	8030/04	Уст	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
4	8031/04	Уст	Уст	Уст	Чув	1	1	1	1
5	8032/04	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
6	8033/04	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
7	8034/04	Уст	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
8	8035/04	Уст	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
9	8037/04	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
10	8039/04	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
11	8040/04	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1

12	8041/04	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
13	8043/04	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
14	8044/04	Чув	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
15	8046/04	Чув	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
16	8047/04	Чув	Уст	Уст	Чув	0	1	0	1
17	8048/04	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
18	8049/04	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
19	8050/04	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
20	8056/04	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1

Уст = устойчивые; Чув = чувствительные
1 = правильно; 0 = неправильно

В 2007 году РРЛ прошла профессионального тестирования также с **97,5 %** совпадением результатов. Из 80 проб (20 культур, к 4 препаратам) было определено лишь 2 несовпадения результатов: 1 проба ложно-чувствительная к изониазиду и 1 проба ложно-устойчивая к стрептомицину. Интерпретация результатов также проводилась на 21 день, на 28 день и на 42 день (табл. 3).

Таблица 3

Результаты профессионального тестирования ПЛУ к препаратам первого ряда (данный за 2007)

№	№ культуры	Результаты РРЛ				Результаты СРЛ			
		S	H	R	E	S	H	R	E
1	3-1	Уст	Уст	Чув	Чув	0	1	1	1
2	3-2	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
3	3-3	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
4	3-4	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
5	3-5	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
6	3-6	Чув	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
7	3-7	Чув	Уст	Уст	Чув	1	1	1	1
8	3-8	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
9	3-9	Уст	Уст	Чув	Уст	1	1	1	1
10	3-10	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
11	3-11	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
12	3-12	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
13	3-13	Уст	Чув	Чув	Уст	1	0	1	1
14	3-14	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1

15	3-15	Уст	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
16	3-16	Чув	Чув	Чув	Чув	1	1	1	1
17	3-17	Чув	Чув	Уст	Чув	1	1	1	1
18	3-18	Уст	Уст	Чув	Чув	1	1	1	1
19	3-19	Чув	Чув	Чув	Уст	1	1	1	1
20	3-20	Уст	Уст	Уст	Уст	1	1	1	1
21	3-21	Чув	Чув	Чув	Уст	1	1	1	1

Уст = устойчивые; Чув = чувствительные
1 = правильно; 0 = неправильно

В 2006 году был проведен количественный анализ интерпретации результатов ТЛУ в зависимости от сроков просмотра. Например: 11 апреля 2006 года была посеяна партия из 48 культур на 4 пробирки с препаратами H, R, S, E.

На 21-й день просмотра у 25 культур наблюдается рост колоний микобактерий туберкулеза, т.е. резистентность на какие либо препараты. На 28-й день просмотра еще наблюдается рост колоний на каких либо препаратах и на 42-й день еще 13 культур дали рост колоний. Окончательный результат культуры выдавался с суммацией всех выросших колоний микобактерий на пробирках с препаратами на протяжении с 21 дня по 42 день (табл.4).

Таблица 4

Интерпретации результатов ТЛУ в зависимости от сроков просмотра.

№	Дата посева	№ культуры:	21 день:	28 день:	42 день:	Окончательный результат:
1	11.04.06	723	HS	-	E	HSE
2	-/-	724	HSRE	-	-	HRSE
3	-/-	725	S	-	-	S
4	-/-	726	чув	HS	-	HS
5...	-/-	728	чув	-	-	чув

Рассмотрим 19 партий ТЛУ МБТ, посеянных методом абсолютных концентраций с интерпретацией результатов ТЛУ в разные сроки (табл. 5).

Таблица 5

Результаты интерпретации результатов ТЛУ в зависимости от сроков чтения.

№	Дата	Всего	21 день	%	28 день	%	42 день	%
1	11.04.06	48	25	52,08%	10	20,83%	13	27,08%
2	20.04.06	49	33	67,35%	4	8,16%	12	24,49%
3	25.05.06	56	33	58,93%	9	16,07%	14	25,00%
4	27.06.06	51	41	80,39%	3	5,88%	7	13,73%
5	10.08.06	47	29	61,70%	7	14,89%	11	23,40%
6	14.08.06	33	25	75,76%	3	9,09%	5	15,15%
7	17.08.06	48	20	41,67%	23	47,92%	5	10,42%
8	12.09.06	48	31	64,58%	8	16,67%	9	18,75%
9	15.09.06	39	21	53,85%	5	12,82%	13	33,33%
10	30.09.06	48	25	52,08%	7	14,58%	16	33,33%
11	17.10.2006	55	41	74,55%	8	14,55%	6	10,91%
12	18.10.2006	55	22	40,00%	10	18,18%	23	41,82%
13	20.10.2006	52	33	63,46%	11	21,15%	8	15,38%
14	28.10.2006	49	30	61,22%	12	24,49%	7	14,29%
15	03.11.2006	48	30	62,50%	13	27,08%	5	10,42%

16	10.11.2006	46	28	60,87%	14	30,43%	4	8,70%
17	22.11.2006	46	35	76,09%	9	19,57%	2	4,35%
18	28.11.2006	40	32	80,00%	8	20,00%	0	0,00%
19	07.12.2006	52	39	75,00%	13	25,00%	0	0,00%
	Всего:	910	573	62,97%	177	19,45%	160	17,58%
всего на 28 и 42 дни:							337	37,03%

Анализ показал, что из 910 культур посеянных на среду Л-Й с добавлением 4 противотуберкулезных препаратов только 573 культур дали окончательный рост колоний на 21-й день после посева. Это составило 62,7 % , на 28 день – 177 (19,4%) проб дали рост культур и на 48 день еще 160 (17,6%) проб дали рост колоний

Таким образом, согласно Приказа № 588, ранее до 37 % проб с резистентностью к соответствующим препаратам просто уничтожалось на 21-й день после просмотра путем автоклавирования. Это приводило к тому, что истинная лекарственная устойчивость в отчетных данных искусственно снижалась и что важно, больные не получали адекватное лечение согласно устойчивости к ПТП.

К каким именно препаратам больше наблюдался рост колоний видно из таблицы 6. На первом месте оказался изониазид (один из основных противотуберкулезных препаратов) - он составляет 32,0% от всех проб выросших на 28-ой и 42-ой дни. На втором месте этамбутол – 31,2 %, стрептомицин составил 18,4 % и рифампицин – 12,8 %.

Таблица 6.

Результаты роста колоний МБТ в зависимости от сроков просмотра ТЛУ

№	Количество проб	Рост колоний на 28 и 42 дни									
		H	%	R	%	S	%	E	%	чув	%
1	23	5	21,7	1	4,3	2	8,7	7	30,4	1	4,3
2	16	4	25,0	0	0,0	2	12,5	6	37,5	0	0,0
3	23	2	8,7	3	13,0	5	21,7	6	26,1	0	0,0
4	10	4	40,0	0	0,0	3	30,0	0	0,0	0	0,0
5	18	3	16,7	1	5,6	0	0,0	8	44,4	0	0,0
6	8	0	0,0	0	0,0	1	12,5	4	50,0	0	0,0
7	28	1	3,6	1	3,6	2	7,1	1	3,6	0	0,0
8	17	6	35,3	0	0,0	3	17,6	3	17,6	0	0,0
9	18	4	22,2	4	22,2	5	27,8	2	11,1	1	5,6
10	23	3	13,0	2	8,7	3	13,0	6	26,1	2	8,7
11	14	7	50,0	4	28,6	2	14,3	3	21,4	0	0,0
12	33	21	63,6	4	12,1	9	27,3	10	30,3	4	12,1
13	19	8	42,1	4	21,1	4	21,1	8	42,1	1	5,3
14	19	7	36,8	5	26,3	3	15,8	9	47,4	1	5,3
15	18	9	50,0	5	27,8	5	27,8	7	38,9	1	5,6
16	18	6	33,3	5	27,8	5	27,8	8	44,4	1	5,6
17	11	6	54,5	2	18,2	3	27,3	5	45,5	0	0,0
18	8	6	75,0	0	0,0	3	37,5	7	87,5	1	12,5
19	13	6	46,2	2	15,4	2	15,4	5	38,5	0	0,0
Всего:	337	108	32,0	43	12,8	62	18,4	105	31,2	13	3,9

Абсолютное число и процентное соотношение мультирезистентных культур (МЛУ) среди никогда ранее не лечившихся приведены в табл. 7 за 2002 и 2003 годы, когда интерпретация результатов проводилась только на 21-й день (при условии обильного роста колоний на контрольной пробирке).

Таблица 7

Эффективность выявления МЛУ методом абсолютных концентраций (2002,2003 г.г.).

	2002 год				2003 год			
	Никогда ранее не лечился		Получавший лечение в прошлом		Никогда ранее не лечился		Получавший лечение в прошлом	
	N	%	N	%	N	%	N	%
H + R	2	0,4%	0	0,0%	2	0,4%	0	0,0%
H + R + E	1	0,2%	0	0,0%	1	0,2%	0	0,0%
H + R + S	28	5,3%	11	9,7%	40	7,1%	29	26,4%
H + R + E + S	39	7,4%	41	36,3%	25	4,5%	20	18,2%
Общее число случаев с множественной устойчивостью (МЛУ)	70	13,3%	52	46,0%	68	12,1%	49	44,5%

В табл. 8 за с 2004 и по 2006 годы представлены данные окончательной интерпретацией результатов ТЛУ на 42 день.

Таблица 8

Эффективность выявления МЛУ усовершенствованным методом абсолютных концентраций (2004-2006 г.г.)

	2004год				2005 год				2006 год			
	Никогда ранее не лечился		Получавший лечение		Никогда ранее не лечился		Получавший лечение		Никогда ранее не лечился		Получавший лечение	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
H + R	1	0,1%	0	0,6%	2	0,2%	1	0,7%	1	0,1%	1	0,6%
H + R + E	0	0,0%	1	0,0%	5	0,6%	0	0,0%	1	0,1%	0	0,0%
H + R + S	68	8,9%	32	19,4%	66	7,9%	32	21,1%	96	10,0%	30	19,4%
H+R+E+S	100	13,0%	57	36,8%	69	11,5%	63	41,4%	25	15,6%	57	36,8%
Общее число случаев с (МЛУ)	169	22,0%	90	56,8%	142	20,2%	96	63,2%	248	25,8%	88	56,8%

Как видно из таблиц увеличение МЛУ с 13,3% и 12,1% в 2002 и 2003 годах до 22,0% в 2004, до 20,2 % в 2005 и до 25,8 % в 2006 годах объясняется увеличением сроков интерпретации результатов с 21-го дня до 42-го дней.

Следует отметить, что полученные данные не дают полной картины распространенности лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам I-го ряда на территории республики по причине того, что исследования на ТЛЧ проводились только больным, находящимся на лечении в НИЦФ, больным г. Бишкека и Чуйской области.

Вывод

Переход на усовершенствованный метод абсолютных концентраций путем увеличения сроков интерпретации результатов ТЛУ позволяет:

1 - повысить эффективность выявления мультирезистентных микобактерий туберкулеза у больных получающих специфическое лечение, т.к. ранее около 37,0 % результатов ТЛУ не учитывались .

Литература:

1. Алишеров А.Ш. Современное состояние противотуберкулезной помощи населению Кыргызстана //Сб. Туберкулез: научные труды и материалы Международной конференции «Контроль над туберкулезом в странах Центрально-Азиатского региона», – Бишкек: 2003.
2. Национальная программа «Туберкулез» на 1996-2000 гг.
3. Национальная программа «Туберкулез-II» на 2001-2005 гг.
4. Приказ № 588 от 8 июня 1978 г. «Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе» - Москва:1978.
5. Финкель Е.А.// Бактериологическая диагностика туберкулеза – Бишкек: 1998.
6. Ханс Л. Ридер //Национальная Туберкулезная Референс-лаборатория в Системе Общественного Здравоохранения и Сети Национальных Лабораторий. Алматы: 2002.