

ПРИКАЗ МИНЗДРАВА РФ ОТ 21.03.2003 N 109
"О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ"

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ N 109

21 марта 2003 г.

О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации осложнилась в начале девяностых годов. Численность впервые выявленных больных туберкулезом по сравнению с 1990 г. увеличилась к 2003 г. более чем в 2 раза, в 1,5 раза возросла смертность по причине туберкулеза, выросла заболеваемость туберкулезом среди детского населения. Особенно тяжелая ситуация сложилась в пенитенциарных учреждениях.

В структуре клинических форм туберкулеза стало больше пациентов, страдающих распространенными, запущенными и осложненными формами, а также больных, выделяющих лекарственно устойчивые микобактерии туберкулеза, снизилась эффективность лечения больных туберкулезом.

Основные мероприятия по реализации стратегии противотуберкулезной помощи населению Российской Федерации определены подпрограммой "Неотложные меры борьбы с туберкулезом в России" федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002-2006 годы)", утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации N 790 от 13 ноября 2001 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2001 г., N 49, ст. 4620).

Наметившаяся в 2001 году стабилизация эпидемических показателей по туберкулезу показывает эффективность проводимых противотуберкулезных мероприятий и необходимость дальнейшего развития системы оказания противотуберкулезной помощи населению Российской Федерации.

Во исполнение Федерального закона от 18 июня 2001 г. N 77-ФЗ "О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации", (Собрание законодательства Российской Федерации, 2001, N 26, ст. 2581), Постановления Правительства Российской Федерации от 13 ноября 2001 г. N 790 "О реализации Федерального закона "О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации" и в целях эффективной реализации подпрограммы "Неотложные меры борьбы с туберкулезом в России" федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002-2006 годы)", а также совершенствования стратегии и тактики организации противотуберкулезных мероприятий

ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить:

- 1.1. Инструкцию по централизованному контролю за диспансерным наблюдением больных туберкулезом (Приложение N 1).
- 1.2. Инструкцию по применению клинической классификации туберкулеза (Приложение N 2).
- 1.3. Инструкцию по применению МКБ-10 для статистического учета туберкулеза (Приложение N 3).
- 1.4. Инструкцию по применению туберкулиновых проб (Приложение N 4).
- 1.5. Инструкцию по вакцинации и ревакцинации против туберкулеза вакциной БЦЖ и БЦЖ-М (Приложение N 5).
- 1.6. Инструкцию по химиотерапии больных туберкулезом (Приложение N 6).
- 1.7. Инструкцию по организации диспансерного наблюдения и учету контингентов противотуберкулезных учреждений (Приложение N 7).
- 1.8. Положение об организации деятельности дневного стационара в противотуберкулезных учреждениях (Приложение N 8).
- 1.9. Инструкцию по организации деятельности бактериологических лабораторий противотуберкулезных учреждений (Приложение N 9).
- 1.10. Инструкцию по унифицированным методам микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений (Приложение N 10).
- 1.11. Инструкцию по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза (Приложение N 11).
- 1.12. Рекомендации по противоэпидемическим мероприятиям в очагах туберкулеза (Приложение N 12).
- 1.13. Положение об организации деятельности консультативно-диагностических и реабилитационных центров для детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции (Приложение N 13).

Министр
Ю.Л.ШЕВЧЕНКО

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОРГАНИЗАЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ

I. ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Микробиологические исследования являются неотъемлемой частью при постановке диагноза туберкулеза, контроле динамики бактериовыделения, выборе рациональных схем лечения и коррекции химиотерапевтической тактики, оценке эффективности и результатов лечения, прогнозировании течения процесса.

Целями микробиологического исследования являются:

- выявление этиологического агента заболевания;
- верификация специфической этиологии заболевания и идентификация возбудителя;
- определение степени активности специфического процесса;
- динамическое наблюдение за эффективностью лечения;
- динамическое наблюдение за лекарственной чувствительностью микобактериальной популяции;
- подтверждение абациллирования больного по окончании курса химиотерапии;
- эпидемиологический надзор за распространением лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при оценке эффективности национальной программы борьбы с туберкулезом;
- обследование лиц из групп повышенного риска, имеющих туберкулезную симптоматику;
- динамическое микробиологическое наблюдение за диспансерными группами.

В связи со значительным ростом объема микробиологических исследований, выполняемых в целях лабораторной диагностики туберкулеза, повышением их медицинской и социальной значимости перед органами управления здравоохранением встают следующие первоочередные задачи:

- сформировать многоуровневую структуру бактериологических лабораторий;
- внедрить принцип этапности диагностики туберкулеза, регламентировав функции лабораторных подразделений противотуберкулезных учреждений и общей лечебной сети (ОЛС) по выявлению больных туберкулезом;
- внедрить унифицированные методы микробиологических исследований, используемые при диагностике и лечении туберкулеза, в лабораториях лечебно-профилактических учреждений, в том числе ведомственных;
- ввести единые отчетно-учетные формы и систему ежегодных отчетов;
- обеспечить регулярное осуществление контроля качества (внутрилабораторного и внешнего) микробиологических исследований, выполняемых при диагностике и лечении туберкулеза.

II. ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭТАПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

С целью повышения эффективности лабораторной диагностики, унификации применяемых методов и обеспечения качества микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза на территории Российской Федерации вводится единая система проведения лабораторных исследований, включающая три этапа:

1) Первичное исследование диагностического материала в учреждениях ОЛС и в противотуберкулезных учреждениях. Целью данного этапа является определение наличия/отсутствия кислотоустойчивых микобактерий в мокроте или другом диагностическом материале методом прямой микроскопии среди лиц с подозрением на туберкулез по клиническим и/или рентгенологическим симптомам. На данном этапе выявляется наиболее эпидемически опасная категория пациентов.

По решению местных органов управления здравоохранением, принимаемому с учетом географических особенностей, плотности населения, транспортных возможностей и других социально-экономических факторов, микроскопические исследования могут проводиться централизованно на базе лабораторий центральных районных больниц. При этом необходимо предусмотреть организацию регулярной и своевременной доставки диагностического материала из прикрепленных учреждений, а также обеспечить адекватную организацию мест сбора диагностического материала с соблюдением необходимых санитарно-эпидемических норм. Централизация исследований способствует лучшему управлению контролем качества выполнения исследований.

2) Диагностика микобактерий туберкулезного комплекса культуральными методами в противотуберкулезных учреждениях. На этом этапе осуществляется верификация положительных или сомнительных результатов первичного лабораторного исследования, а также диагностика случаев туберкулеза с отрицательными результатами первичного исследования диагностического материала методами микроскопии. Этот этап обеспечивают бактериологические лаборатории противотуберкулезных учреждений.

3) Определение лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам и идентификация выделенного возбудителя в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений (II-IV уровень) - сложные и затратные исследования, требующие соответствующего лабораторного оснащения и обученного персонала.

На бактериологические лаборатории противотуберкулезных учреждений возлагаются обязанности по оказанию организационно-методической помощи КДЛ ОЛС, обучению их персонала и внешний контроль качества выполняемых КДЛ микроскопических исследований путем повторного исследования части препаратов.

К работе с материалом, зараженным туберкулезными и нетуберкулезными микобактериями (III-IV группы), допускаются лаборатории, имеющие специальное разрешение в соответствии с федеральными санитарными правилами, нормами и гигиеническими нормативами.

Бактериоскопическое исследование является первым, наиболее быстрым, простым и дешевым методом выявления кислотоустойчивых микобактерий. Однако, метод, даже при использовании самой совершенной микроскопической техники (люминисцентной), не позволяет обнаружить микобактерии при содержании их менее 5000-10000 микробных тел в 1 мл материала. Такое количество микобактерий в мокроте коррелирует с далеко зашедшими прогрессирующими формами процесса, тогда как на начальной стадии заболевания количество выделяемых большими микобактерий ниже предела обнаружения этим методом.

Микроскопическое обнаружение кислотоустойчивых микобактерий не позволяет дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (возбудители туберкулеза) от нетуберкулезных ("атипичных") и сапрофитических микобактерий.

Культуральный метод выявления микобактерий позволяет выявлять микобактерии туберкулеза при наличии в исследуемом патологическом материале нескольких десятков жизнеспособных особей возбудителя. Это особенно важно при исследовании олигобациллярного диагностического материала от впервые выявленных или уже леченных больных, выделяющих малое количество микобактерий.

В вопросах диагностики и лечения больных туберкулезом бактериологические лаборатории противотуберкулезных учреждений должны обеспечить решение следующих задач:

- подтвердить туберкулезную природу заболевания;
- определить таксономическую принадлежность возбудителя;
- определить его лекарственную чувствительность;
- внедрить систему внутрилабораторного и внешнего контроля качества лабораторных исследований;
- осуществлять персонализированный учет больных туберкулезом и мониторинг состояния микобактериальной популяции;
- осуществлять совместно с лечащими врачами интерпретацию данных микробиологических исследований.

При формировании клинического диагноза и оценке эффективности лечения больного должны учитываться результаты микроскопических и культуральных исследований, включающие микроскопическое исследование мазка осадка диагностического материала, выделение возбудителя (посев), дифференциацию выделенной культуры, определение ее лекарственной чувствительности. В качестве методов, альтернативных классическому культуральному исследованию, возможно использование автоматизированных и полуавтоматизированных систем ускоренной культуральной диагностики, основанной на использовании жидких питательных сред и различных способах индикации роста микобактерий.

С целью быстрой идентификации микобактерий туберкулезного комплекса в качестве дополнительных допускается использование методов, основанных на амплификации фрагментов генома микобактерий (полимеразная цепная реакция ПЦР), других молекулярно-генетических методов. ПЦР-анализ может быть применен для исследования мокроты, промывных вод бронхов, мочи и спинномозговой жидкости, а также культур микроорганизмов. Технология проведения ПЦР приводится в описаниях и инструкциях по применению соответствующих наборов (тест-систем). Лаборатории, использующие такие методы, должны быть устроены соответствующим образом для исключения кросс-контаминации образцов.

Алгоритм первичного лабораторного обследования описан в приложениях N 10 и N 11 к настоящему приказу. Унифицированные методики и учетно-отчетные формы используются лечебно-профилактическими учреждениями независимо от ведомственной принадлежности.

Кратность и сроки микробиологических исследований в ходе лечения и наблюдения различных групп пациентов определены в инструкциях по химиотерапии больных туберкулезом и по организации диспансерного наблюдения и учету контингентов противотуберкулезных учреждений.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО УНИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДАМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ
ТУБЕРКУЛЕЗА

III. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

Присутствие кислотоустойчивых микобактерий в клиническом материале может быть установлено при микроскопическом и/или культуральном исследовании. Однако необходимо иметь в виду, что микроскопическое исследование не позволяет дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (возбудителей туберкулеза) от нетуберкулезных ("атипичных") микобактерий - возбудителей микобактериозов.

На основании микроскопического исследования возможно сделать заключение только о наличии или отсутствии в препарате кислотоустойчивых микобактерий.

Это объясняется тем, что в природе существует большое число нетуберкулезных кислотоустойчивых микобактерий, вызывающих микобактериозы, а также кислотоустойчивых сапрофитов, не вызывающих заболевания человека. Микроскопически они неотличимы от *Mycobacterium tuberculosis*.

Несмотря на указанные недостатки, бактериоскопия остается одним из основных методов микробиологических исследований. Ее преимущество заключается в быстроте получения результата и относительной простоте исследования. Метод позволяет в короткие сроки (от одного часа) обнаружить наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом и микобактериозами, выделяющих большие количества микобактерий, и остается актуальным микробиологическим методом при выявлении больных туберкулезом и микобактериозами на первичных этапах обследования больных, а также при динамическом наблюдении за состоянием микобактериальной популяции в процессе лечения. Кроме того, микроскопическое подтверждение тинкториальных свойств культуры остается обязательным исследованием при ее диагностике.

3.2.5. Фиксация мазков

Приготовленные вышеуказанным способом мазки помещают на 15-30 минут на лотки (подносы), выстланные фильтровальной бумагой, и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу или при отсутствии такового - на столе, в специально отведенном месте.

Ни в коем случае не допускается фиксация сырых мазков над пламенем горелки!

При окраске по Ziehl-Neelsen стекла с высохшими мазками пинцетом или специальными щипцами берут за конец, на который нанесена маркировка, и трижды медленно проводят через верхнюю треть пламени спиртовки или газовой горелки до исчезновения признаков запотевания стекла. Общая продолжительность пребывания мазка в пламени не должна превышать 3-5 секунд. Затем стекла помещают на специальную подставку ("рельсы") для окрашивания.

При окраске мазков флюорохромными красителями рекомендуется фиксация в сухожаровом шкафу при 85 град. С в течение 45 минут. Однако при отсутствии такой возможности допускается фиксация над пламенем горелки.

В плане охраны труда оптимальным является метод, предложенный А. Hain. Этот метод фиксации мазков используется как при окраске по Ziehl-Neelsen, так и люминесцентными красителями. Согласно этому методу, предметные стекла с мазками раскладывают на жестяные или эмалированные подносы и помещают в сушильный шкаф, где сначала высушивают при 37 град. С. Затем температуру повышают до 105 град. С и, спустя 10 минут, шкаф выключают. При таком методе достигается надежное прикрепление материала к стеклу и гибель микобактерий, как находящихся, в материале мазка, так и случайно попавших на поднос. Фиксирующая температура не должна превышать 105 град. С, чтобы не изменить тинкториальные свойства микобактерий.

Высушенные и фиксированные мазки должны сразу же окрашиваться. Нефиксированные мазки ни в коем случае не должны оставаться открытыми на ночь, так как это увеличивает опасность распространения.

Фильтровальная бумага, которой был выстлан лоток (поднос), по окончании фиксации каждой серии мазков подлежит обязательному сжиганию или автоклавированию, а лоток обжигается спиртом. Лотки ежедневно выстилаются чистой бумагой.

- своевременности и точности передачи результатов в учреждение, направившее материал для исследования.

Успех применения контроля качества обеспечивается:

- регулярным его применением в лабораторном подразделении;
- правильно обученными, заинтересованными и ответственными работниками;
- рациональным применением регламентированных методов;
- анализом допущенных ошибок и немедленным их исправлением.

Одной из форм обеспечения качества бактериоскопических исследований является использование в ряду клинических мазков двух дополнительных не окрашенных контрольных мазков, один из которых заведомо является положительным, а второй - отрицательным мазком. Просмотр мазков начинают с контрольных, затем просматривают клинические мазки.

Необходимо еженедельно и ежемесячно обобщать и анализировать полученные данные для определения процента положительных результатов и, по возможности, определять причины любых резких отклонений от средних показателей. При получении в процессе микроскопии подряд нескольких положительных результатов необходимо внимательно проанализировать причины этого.

За обеспечение качества исследований несут ответственность все сотрудники лаборатории.

3.9. Организация и управление работой лаборатории.
Общие правила безопасности при организации исследований

В связи с высокой трансмиссивностью микобактерий туберкулеза и, как следствие, с высоким риском заболевания среди сотрудников микробиологических подразделений устройство лаборатории, расположение и организация рабочих мест должны предот-

вращать как развитие внутрибольничной туберкулезной инфекции, так и контаминацию рабочих мест, а также обеспечивать необходимые меры биологической безопасности при работе персонала с возбудителем туберкулеза, исключения физических и химических рисков при работе в лаборатории.

Необходимые мероприятия должны включать (см. Раздел 3 настоящей Инструкции):

- а) административные меры, предотвращающие распространение инфекционных аэрозолей из загрязненных зон в неинфицированные помещения лаборатории и лечебного учреждения в целом;
- б) инженерные (проектные и технические) мероприятия, направленные на снижение концентрации инфекционных аэрозолей в воздухе (принудительная вентиляция, использование специализированных устройств обеззараживания воздуха);
- в) меры персональной защиты персонала (защитные маски, респираторы, одежда, перчатки).

Во время работы двери в лабораторию должны быть закрыты. Расположение рабочих зон, оборудования и реагентов должно быть постоянным и логичным - в соответствии с последовательностью выполнения работы и соблюдением эпидемиологической цепочки. Рабочие помещения должны содержаться в чистоте и обеззараживаться бактерицидными лампами (не менее 40 минут перед началом работы и в конце рабочего дня). Столы должны протираться раствором соответствующего дезинфицирующего средства (например, 5% раствором хлорамина) <*> два раза в день - перед началом работы и после ее окончания. Эффективность ультрафиолетовых облучателей зависит от влажности и степени загрязненности воздуха и рабочих поверхностей, что необходимо учитывать при проведении санитарных гигиенических мероприятий в лаборатории.

<*> Дезинфицирующие средства, используемые в лабораториях в противотуберкулезных целях, содержат фенолы, гипохлориты, спирт, формальдегиды, йодофоры и глутаральдегиды. Тип дезинфицирующего вещества зависит от материала, подлежащего дезинфекции. Не следует пользоваться ароматизированными "антисептиками". Неверно распространенное мнение о том, что дезинфицирующие средства, эффективные против различных видов микроорганизмов, столь же эффективны и против микобактерий. Целый ряд распространенных дезинфектантов обладают незначительной или не обладают вовсе микобактерицидной активностью, а средства на основе четвертичного аммония неэффективны в рекомендуемых концентрациях. Перекиси водорода в низких концентрациях (менее 3%) также мало эффективны в отношении микобактерий туберкулеза).

Помещения лаборатории должны быть удобными в расположении, не иметь порогов и функционально пригодными для предназначенных работ.

У каждого рабочего места должны быть вывешены методические инструкции по проведению выполняемых на этом месте рабочих процедур. Все манипуляции на каждом рабочем месте должны выполняться в строгом соответствии с инструкцией. Любые изменения вносятся в эти документы только по указанию заведующего лабораторией и должны быть завизированы его подписью с указанием даты изменения методики.

Все документы должны храниться в течение 2 лет.

В работе должны использоваться методы лабораторных исследований, которые регламентированы в нормативных документах и зарегистрированы в реестре Минздрава РФ.

Лабораторное оборудование

Оборудование должно полностью удовлетворять стандартным требованиям и спецификациям.

Технические паспорта всего оборудования и инструкции по применению оборудования и уходу за ним необходимо хранить в специальной папке.

Для обеспечения точности и правильности работы оборудование должно регулярно проверяться специалистом соответствующего профиля.

Для регистрации профилактических осмотров всего оборудования следует иметь отдельный журнал.

В случае возникновения неисправности в работе того или иного прибора работа на нем немедленно прекращается. И прибор консервируется до прихода специалиста по ремонту и эксплуатации данного прибора.

IV. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ КОМПЛЕКСА M. TUBERCULOSIS

Поступивший в лабораторию материал перед обработкой и посевом должен быть зарегистрирован в лабораторном регистрационном журнале. Каждой пробе материала необходимо присвоить порядковый регистрационный лабораторный номер, который должен использоваться при всех последующих лабораторных исследованиях.

4.1. Принципы предпосевной обработки диагностического материала

4.2. Материалы, не нуждающиеся в деконтаминации

4.3. Техника посева и инкубации, оценка и учет результатов

Достоверная клиническая интерпретация результатов микробиологического обследования достигается при обязательном соблюдении следующего правила:

Микроскопическое и культуральное исследования должны производиться параллельно только из одной и той же пробы диагностического материала.

4.3.1. Процедура посева

Рабочее место микробиолога организуется таким образом, чтобы исключить операторские ошибки.

Перед процедурой посева необходимо подготовить пробирки с питательными средами, пронумеровать их, согласно нумерации анализов, и последовательно расположить в вертикальном штативе. Аналогичным образом подготовить и пронумеровать предметные стекла для приготовления мазков.

Перед началом забора посевного материала пипеткой убедиться в том, что номер пробирки с посевным материалом соответствует номерам пробирок с питательной средой и номеру предметного стекла для приготовления мазка.

Проверяют соответствие расположения пробирок с готовым осадком и предметных стекол в порядке их регистрационных номеров:

- набрать стерильной мерной или пастеровской пипеткой 1,0-1,2 мл полученного после обработки и нейтрализации осадка, оставив приблизительно 0,2 мл для последующего приготовления мазка для микроскопии;
- соблюдая условия стерильности, внести равные объемы набранного материала (примерно по 0,5-0,6 мл) в 2 пробирки с разными плотными питательными средами;
- пробирки с питательной средой при посеве должны находиться в наклонном положении (под углом 40-45 град.);
- посевной материал нанести на верхнюю треть косяка питательной среды;
- засеянные пробирки закрыть ватно-марлевыми пробками и поместить в наклонном положении в штатив таким образом, чтобы посевной материал равномерно распределился по всей поверхности косяка питательной среды; можно использовать дренированные (с продетым льняным или хлопчатобумажным шнуром) силиконовые пробки соответствующего диаметра;
- остаток осадка забрать той же пипеткой и нанести на подготовленное и пронумерованное предметное стекло 1-2 капли осадка для получения мазка;
- использованную пипетку опустить в емкость с дезинфицирующим раствором;
- по завершении посева всех проб засеянные пробирки переместить в горизонтальные штативы - "диваны" и поместить в термостат при температуре 37 град. С; при этом поверхность косяка питательной среды должна находиться в горизонтальной плоскости, а наклон штатива должен исключить смачивание пробки материалом засева. Подготовленные мазки оставляют сушиться на воздухе.

4.3.2. Инкубация

Инкубация микобактерий туберкулеза имеет свои особенности. Они заключаются в том, что микобактерии размножаются чрезвычайно медленно - время деления микробной клетки составляет 18-24 часа. Это требует длительного срока инкубации для получения видимого роста колоний. Длительный срок инкубации диктует необходимость соблюдения ряда правил для сохранения жизнеспособности клеток и ростовых свойств питательной среды. Кроме того, микобактерии туберкулеза требовательны к составу питательных сред, составу газовой среды и чувствительны к различным токсическим агентам, которые могут поступать в пробирку или вместе с воздухом или из некачественной среды, сопровождать процедуры получения осадка. Оптимальная температура инкубации - 37 град. С. При снижении температуры скорость размножения микобактерий туберкулеза быстро снижается.

При первичном посеве микроскопически отрицательного материала средняя продолжительность роста микобактерий туберкулеза на плотных питательных средах может составить 20-46 дней. Рост отдельных штаммов появляется через 60 и даже 90 дней. Это обуславливает необходимость при отсутствии роста микобактерий для выдачи отрицательного результата выдерживать посевы в термостате до 12 недель.

В процессе инкубации посевов необходимо соблюдать следующее:

- по истечении первых 2-3 суток инкубации ватно-марлевые или дренированные силиконовые пробки заменяют герметичными резиновыми или силиконовыми;
- после этого засеянные пробирки переводят в вертикальное положение;
- инкубацию проводят в течение 12 недель при обязательном еженедельном просмотре;
- во время еженедельных просмотров регистрируют следующие параметры для каждой питательной среды:
 - "появление роста" - срок появления роста, начиная со дня посева;
 - "интенсивность роста" - суммарное число колониеобразующих единиц (КОЕ) на всех пробирках, засеянных данным материалом, если материал засеивается на пробирки с одинаковыми средами (этот показатель имеет большое диагностическое и прогностическое значение, особенно если посевы производятся в динамике наблюдения за больным в процессе химиотерапии). Если инокулируются разные питательные среды, результат отмечается для каждой из них;
 - "загрязнение посева" неспецифической гноеродной микрофлорой или грибами;
 - "отсутствие роста".

Все указанные параметры регистрируются в протоколе каждого анализа.

4.4. Питательные среды

Для посева диагностического материала используют разнообразные питательные среды, среди которых можно выделить 3 основные группы:

- **плотные питательные среды на яичной основе;**

- плотные или полужидкие питательные среды на агаровой основе;
- жидкие синтетические и полусинтетические питательные среды.

Каждая из этих сред имеет положительные и отрицательные особенности.

В связи с этим для повышения результативности культурального метода рекомендуется применять посев диагностического материала одновременно на 2-3 питательные среды разного состава.

В России культуральные исследования диагностического материала традиционно осуществляются на плотных яичных средах. Существует большое количество плотных питательных сред, и разные лаборатории используют различные среды: Левенштейна-Йенсена, Петраньяни, Гельберга, Финна, Мордовского (среда "Новая"), Аникина (А-6 и А-9), Попеску и др.

В результате многочисленных сравнительных испытаний установлено, что для культуральной диагностики туберкулеза следует использовать как минимум две разные по составу питательные среды. Наиболее широкое распространение получил набор из 2 яичных сред - Левенштейна-Йенсена и Финна-II.

4.4.1. Среда Левенштейна-Йенсена

Среда Левенштейна-Йенсена применяется во всем мире в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности. Эта среда рекомендуется для использования всеми микробиологическими лабораториями противотуберкулезной службы Российской Федерации для получения сравнимых результатов. Это плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерий туберкулеза получают на 15-25-й день после посева микроскопически положительного материала. В состав этой питательной среды входит глицерин, который способствует росту *M. tuberculosis*. Для культивирования *M. bovis* среду Левенштейна-Йенсена обогащают 0,5% пируватом натрия, исключив из солевого раствора глицерин. С этой целью в состав солевого раствора вместо глицерина добавляют 8,0 г пирувата натрия. Применение этой модификации среды рекомендуется в тех территориях, где возможно распространение *M. bovis*.

Реактивы:

Калий однозамещенный фосфорнокислый KH_2PO_4	- ТУ-6-09-5324-87.
Магний лимоннокислый $\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \times 14\text{H}_2\text{O}$	- ТУ-6-09-1770-77.
Магний сернокислый $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	- ГОСТ 4523-77.
L- аспарагин $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	- импортный реактив.
Глицерин $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	- ГОСТ 6259-75.
Малахитовый зеленый $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_4\text{N}_2$	- ТУ-6-09-1557-77.
Вода дистиллированная	- ГОСТ 6709-77.

Состав среды:

Раствор минеральных солей	
Калий однозамещенный фосфорнокислый	2,40 г
Магний сернокислый	0,24 г
Магний лимоннокислый	0,60 г
L- аспарагин	3,60 г
Глицерин	12,0 мл
Вода дистиллированная	600 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Затем стерилизуют в автоклаве 30 минут при 1 атм. (121 град. С). Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

Раствор малахитового зеленого:

Малахитовый зеленый	2 г
Стерильная дистиллированная вода	100 мл

Растворить в стерильной дистиллированной воде малахитовый зеленый, поместив раствор в термостат на 1-2 часа. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению и при появлении осадка или изменении окраски его следует заменить свежим раствором. Стерилизовать при 1 атм. 30 мин.

Яичная масса:

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, затем оставляют на 30 мин. в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70 град. этиловый спирт на 30 мин. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20-25 яиц в зависимости от их величины). Тщательно взбивают стерильным венчиком или в стерильном миксере.

Приготовление среды.

В большую стерильную емкость, соблюдая правила стерильности, помещают следующие растворы:

Раствор минеральных солей	600 мл
Гомогенизированная яичная масса	1000 мл

Тщательно перемешивают и фильтруют через 4-хслойный стерильный марлевый фильтр.

Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и в течение не более 15 минут разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не сформировался осадок.

Свертывание среды.

Для свертывания среды используются специальные аппараты-свертыватели типа "АСИС" (новое название АСПС). Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования косяка среды. Штативы

устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 85 град. С в течение 45 минут. Приготовление питательной среды проводится в условиях соблюдения стерильности, так как свертывание является не стерилизующей, а лишь коагулирующей процедурой.

Качество приготовленной яичной среды зависит от соблюдения температурного и временного режимов коагуляции. Обесцвечивание среды, наличие пузырьков или углублений на ее поверхности свидетельствует о нарушении режима свертывания. Повторное свертывание также ухудшает качество среды. Среда с нарушенным режимом свертывания подлежат удалению.

Проверка на стерильность.

После свертывания каждая вновь приготовленная партия среды подвергается контролю на стерильность. Для этого она помещается в термостат и выдерживается в нем 2-3 суток при 37 град. С.

Хранение.

Приготовленная партия среды должна иметь дату изготовления и сохраняться в холодильнике при 4 град. С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели.

4.4.2. Среда Финн-II

Среда Финн-II рекомендована в нашей стране как вторая стандартная среда для выделения микобактерий. Она отличается от среды Левенштейна-Йенсена тем, что вместо L-аспарагина в ней используется глутамат натрия и подбор солей рассчитан таким образом, что конечная кислотность среды (рН = 6,3-6,8) имеет более низкое значение и большую стабильность по сравнению со средой Левенштейна-Йенсена. Эти свойства обуславливают более высокую эффективность среды при засеве материала, обработанного щелочными детергентами.

Рост микобактерий появляется на этой среде на несколько дней раньше, чем на среде Левенштейна-Йенсена, а выделение культур на 6-8% выше.

Реактивы:

Магний сернокислый $MgSO_4 \times 7H_2O$	- ГОСТ 4523-77.
Натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_3 \times 5,5H_2O$	- ГОСТ 22280-86.
Квасцы железоммонийные $Fe(NH_4) \times (SO_4)_2 \times 12 H_2O$	- ГОСТ 4205-77.
Калий однозамещенный фосфорнокислый KH_2PO_4	- ТУ-6-09-5324-87.
Аммоний лимоннокислый однозамещенный $C_8H_{11}O_7N$	- ГОСТ 7234-79.
Натрий глутаминовокислый однозамещенный $C_5H_8NNaO_4 \times H_2O$	- ТУ 6-09-337-70.
Глицерин $C_3H_8O_3$	- ГОСТ 6259-75.
Малахитовый зеленый $C_52H_{54}O_{12}N_4$	- ТУ-6-09-1557-77.
Вода дистиллированная	- ГОСТ 6709-77.

Состав среды:

Раствор минеральных солей	
Магний сернокислый	0,50 г
Натрий лимоннокислый	0,10 г
Квасцы железоммонийные	0,05 г
Калий однозамещенный фосфорнокислый	20,0 г
Аммоний лимоннокислый однозамещенный	5,00 г
Натрий глутаминовокислый однозамещенный	10,0 г
Глицерин	20 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Кислотность не корректируют. Стерилизуют в автоклаве 30 минут при 1 атм. (121 град. С). Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

Раствор малахитового зеленого:

Малахитовый зеленый	2,00 г
Стерильная дистиллированная вода	100 мл

Растворить в стерильной дистиллированной воде малахитовый зеленый, поместив раствор в термостат на 1-2 часа. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению и при появлении осадка или при изменении окраски его следует заменить свежим раствором. Стерилизовать при 1 атм. (121 град. С) 30 мин.

Яичная масса.

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, затем оставляют на 30 мин. в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70% этиловый спирт на 30 мин. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20-25 яиц в зависимости от их величины). Тщательно взбивают стерильным венчиком или в стерильном миксере.

Приготовление среды.

В большую стерильную емкость, соблюдая правила стерильности, помещают следующие растворы:

Раствор минеральных солей	600 мл
Гомогенизированная яичная масса	1000 мл

Тщательно перемешивают и фильтруют через 4-х слойный стерильный марлевый фильтр.

Добавляют 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и в течение не более 15 минут разливают в пробирки приблизительно по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не сформировался осадок.

Свертывание среды.

Для свертывания среды используются специальные аппараты-свертыватели типа "АСИС" (**новое название АСПС**). Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования косяка среды. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 85 град. С в течение 45 минут. Так как приготовление питательной среды проводится в условиях соблюдения стерильности, свертывание является не стерилизующей, а лишь коагулирующей процедурой.

Качество приготовленной яичной среды зависит от соблюдения температурного и временного режимов коагуляции. Обесцвечивание среды, наличие пузырьков или углублений на поверхности среды свидетельствует о нарушении режима свертывания. Повторное свертывание также ухудшает качество среды. Среда с нарушенным режимом свертывания подлежат удалению.

Проверка на стерильность.

После свертывания каждая вновь приготовленная партия среды подвергается контролю на стерильность. Для этого она помещается в термостат и выдерживается в нем 2-3 суток при 37 град. С.

Хранение.

Приготовленная партия среды должна иметь дату изготовления и сохраняться в холодильнике при 4 град. С с тщательно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недель.

4.4.3. Среда Школьниковой

В повседневной работе микробиологической лаборатории наряду с плотными питательными средами используются и жидкие, например, для нейтрализации pH посевного материала, при изучении лекарственной чувствительности микобактерий и т.д. Наиболее широко распространенной и хорошо зарекомендовавшей себя в России жидкой питательной средой является среда Школьниковой.

Реактивы:

Калий однозамещенный фосфорнокислый KH_2PO_4	- ТУ 6-09-5324-87.
Натрий двузамещенный фосфорнокислый Na_2HPO_4	- ГОСТ 4172-76.
Магний сернокислый $MgSO_4 \times 7H_2O$	- ГОСТ 4523-77.
Натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_3 \times 5,5H_2O$	- ГОСТ 22280-86.
Лимоннокислое аммиачное железо $FeNH_4C_6H_5O_7$	- ТУ 6-09-1114-76.
L-аспарагин $C_4H_8N_2O_3 \times H_2O$	- импортный.
Глицерин $C_3H_8O_3$	- ГОСТ 6259-75.
Вода дистиллированная	- ГОСТ 6709-77.

Состав среды:

Калий однозамещенный фосфорнокислый	1,50 г
Натрий двузамещенный фосфорнокислый	2,50 г
Магний сернокислый	0,50 г
Натрий лимоннокислый	1,50 г
Лимоннокислое аммиачное железо	0,05 г
L-аспарагин	1,00 г
Глицерин	30 мл
Вода дистиллированная	до 1000 мл

Вышеперечисленные ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Среду фильтруют через бумажный фильтр и разливают в колбы. Кислотность среды не корректируют, так как она содержит буферную смесь солей с pH среды 7,0-7,2.

Стерилизуют в автоклаве 30 минут при 1 атмосфере (121 град. С). Срок хранения среды составляет 2-3 месяца при комнатной температуре.

4.5. Оценка и учет результатов посева диагностического материала

4.5.1. Оценка результатов посева

При оценке результатов культурального исследования диагностического материала необходимо соблюдать следующие правила.

1) Посевы, выполненные в течение одного дня, помещать в отдельные ящики или штативы с указанием даты посева и размещать их в термостате в порядке номеров регистрации в хронологическом порядке, не нарушая его при еженедельных просмотрах.

2) Наблюдение за посевами и просмотр засеянных пробирок проводить еженедельно.

3) При оценке результатов регистрировать следующие параметры:

- появление роста - срок появления, начиная со дня посева;
- интенсивность роста - число колоний;
- загрязнение посева посторонней микрофлорой или грибами;
- отсутствие роста.

Соблюдение этих правил позволяет, во-первых, своевременно выявлять макроскопически видимый рост микобактерий или загрязняющей микрофлоры, а, во-вторых, на основании регистрации сроков появления роста и его особенностей осуществлять первичную идентификацию микобактерий. При этом необходимо иметь в виду:

- появление роста кислотоустойчивых микобактерий в течение 7-10 дней культивирования на плотных питательных средах может свидетельствовать либо о выделении быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий, к которым комплекс *M. tuberculosis* не относится, либо о массивном обсеменении материала *M. tuberculosis*; перед выдачей ответа такие культуры должны подвергнуться первичной идентификации;

- появление роста кислотоустойчивых микобактерий после 3-4 недель культивирования свидетельствует о выделении *M. tuberculosis*, а также других медленно растущих микобактерий, которые могут относиться к потенциально патогенным нетуберкулезным микобактериям или к безвредным кислотоустойчивым сапрофитам;

- прежде, чем дать отрицательный ответ после 12 недель культивирования, необходимо убедиться в отсутствии роста очень медленно растущих микобактерий, в числе которых могут быть и *M. tuberculosis*.

При оценке результатов необходимо помнить, что используемые для посева питательные среды представляют собой обогащенный субстрат, который легко утилизируется другими микроорганизмами. Это обуславливает высокий риск загрязнения посевов различными бактериями и грибами, колонии которых визуальнo трудно отличить от микобактерий.

Во время еженедельных просмотров посевов при подозрении на загрязнение посева гноеродной или гнилостной микрофлорой необходимо, прежде всего, удалить и уничтожить (автоклавирование, сжигание) те посевы, в которых отмечается загрязнение всей поверхности питательной среды или изменение самой питательной среды (разжижение или обесцвечивание).

В ряде случаев некоторые загрязняющие посевы микроорганизмы обладают способностью разлагать составные ингредиенты среды с образованием кислоты; это приводит к снижению pH среды, высвобождению малахитового зеленого от его связей с компонентами яичной основы и изменению цвета среды на темно-зеленый. На такой среде микобактерии не растут, и такие посевы подлежат удалению.

Посевы с частичным загрязнением желательно выдержать до окончания срока инкубации или до развития хотя бы нескольких колоний микобактерий, так как позднее появление загрязнения не исключает роста *M. tuberculosis*. В таких случаях необходимо сделать мазок культуры, окрасить его по Ziehl-Neelsen и при наличии кислотоустойчивых микобактерий попытаться обработать выросшую культуру 3-4% раствором серной кислоты, а после отмывания ее изотоническим раствором хлорида натрия вновь засеять осадок на питательные среды.

Во всех случаях получения роста во избежание неверного результата и загрязнения необходимо контролировать чистоту выросшей культуры с помощью микроскопии мазка по Ziehl-Neelsen.

4.5.2. Характеристика колоний *M. tuberculosis*

Обычно культуры микобактерий туберкулеза от впервые выявленных больных растут на плотных питательных средах в виде R-колоний (от английского слова rough - грубый, шершавый) различной величины и вида, имеют желтоватый (не желтый!) или слегка кремовый оттенок (цвет слоновой кости), шероховатую поверхность, напоминающую манную крупу или цветную капусту. Колонии, как правило, сухие, морщинистые, но в случае диссоциации могут встречаться и влажные, слегка пигментированные колонии, розовато-желтый пигмент которых резко отличается от оранжевого или желтого пигмента сапрофитных или некоторых нетуберкулезных микобактерий. Последние обычно растут в S-форме (от английского слова smooth - гладкий). Следует отметить, что на среде Финна колонии часто выглядят более влажными, чем на среде Левенштейна-Йенсена.

После курса химиотерапии от больных туберкулезом могут выделяться гладкие колонии с влажным ростом (S-формы).

При культуральном исследовании ответ о выделении кислотоустойчивых микобактерий дается только после микроскопии окрашенного по Ziehl-Neelsen мазка из выросших колоний.

При приготовлении мазков для микроскопического исследования колонии микобактерий туберкулеза проявляют свои физико-химические особенности: они не эмульгируются в изотоническом растворе, а образуют зернистую крошковидную суспензию. Это обусловлено наличием в составе их клеточной стенки большого количества гидрофобных жирo-восковых субстанций.

При микроскопическом исследовании мазков из выросших колоний, окрашенных по Ziehl-Neelsen, обнаруживаются яркие малиново-красные палочковидные бактерии, лежащие одиночно или группами, образующие скопления или переплетения в виде "войлока" или "кос". Микобактерии туберкулеза выглядят как тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1-10 (чаще 1-4) мкм, шириной 0,2-0,6 мкм, гомогенные или зернистые с незначительно закругленными концами. Часто в препарате, особенно в длительно растущих культурах, видны скопления темно окрашенных зерен. В молодых культурах, особенно выделенных от больных, длительно леченных противотуберкулезными препаратами, микобактерии отличаются большим полиморфизмом, вплоть до появления коротких, почти кокковидных форм.

Если морфология колоний или микобактерий вызывает сомнения в их принадлежности к роду *Mycobacterium* или культуры выделены из материала, который может содержать кислотоустойчивые сапрофиты (моча, гной из ушей и др.), мазки дополнительно обесцвечивают 3% солянокислым спиртом 40-45 минут. Следует учитывать, что молодые культуры микобактерий туберкулеза могут сравнительно легко обесцвечиваться спиртом, так как они обладают слабой кислотоустойчивостью. В таких случаях культуры следует выдержать в термостате еще 5-10 дней и вновь повторить микроскопическое исследование, чтобы убедиться в их тинкториальных свойствах.

Нетуберкулезные и авирулентные сапрофитные микобактерии могут варьировать по форме колоний и морфологии клеток. Некоторые из них грубее, толще, иногда менее интенсивно окрашены и редко образуют жгутообразные скопления. Однако некоторые виды нетуберкулезных микобактерий (фотохромогенные) могут расти в виде характерной для микобактерий туберкулеза R-форме. Многие нетуберкулезные и сапрофитные микобактерии имеют кислотоустойчивые зерна, весьма сходные по морфологии с таковыми у вирулентных микобактерий туберкулеза.

4.5.3. Учет результатов посева диагностического материала

При выделении культуры кислотоустойчивых микобактерий, отвечающих вышеперечисленным характеристикам, а именно:

- появление роста колоний на плотных питательных средах не ранее 3-4 недель инкубации;
 - наличие колоний характерной морфологии и окраски;
 - микроскопическое подтверждение кислотоустойчивости выделенного микроорганизма при окраске по Ziehl-Neelsen;
- следует произвести количественную оценку интенсивности роста.

Интенсивность роста обозначают по 3-х балльной системе:

- (1+) - 1-20 КОЕ - "скудное" бактериовыделение;
- (2+) - 21-100 КОЕ - "умеренное" бактериовыделение;
- (3+) - > 100 КОЕ - "обильное" бактериовыделение.

Регистрируют число КОЕ, выросших на каждой из пробирок с разными питательными средами.

Величина КОЕ (число колониеобразующих единиц) высчитывается как среднее по результатам подсчета числа колоний, выросших на всех пробирках.

Все характеристики выросших на плотных питательных средах микобактерий заносятся в лабораторный журнал учета результатов культуральных исследований, в бланки ответов, а также в компьютерную базу данных полицейского учета.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Определение спектра и степени устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам имеет важное значение для тактики химиотерапии больных, контроля за эффективностью лечения, определения прогноза заболевания и проведения эпидемиологического мониторинга лекарственной устойчивости микобактерий в пределах отдельной территории, страны и мирового сообщества. Степень лекарственной устойчивости микобактерий определяется в соответствии с установленными критериями, которые зависят как от противотуберкулезной активности лекарственного препарата, так и от его концентрации в очаге поражения, величины максимальной терапевтической дозы, фармакокинетики препарата и многих других факторов.

В настоящее время для определения лекарственной устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам в международной практике используются 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 R 460.

Выбор того или иного метода определяется традиционно сложившимися методическими подходами, используемыми в данной стране. Однако необходимо иметь в виду, что обязательным условием эффективного мониторинга, обеспечения эпидемиологического надзора за лекарственной устойчивостью микобактерий и распространением лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя, а также сопоставления результатов исследований и эффективности лечения 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.

При всех методах определения лекарственной устойчивости необходимым звеном в деятельности лаборатории является обеспечение контроля качества исследований.

6.1. Виды лекарственной устойчивости

Чувствительность микобактерий к противотуберкулезным препаратам определяется неспособностью штамма расти на среде, содержащей препарат, при стандартных условиях постановки опыта. Чувствительными к данному препарату считаются те штаммы микобактерий, на которые этот препарат в критической концентрации оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие в соответствии с принятым критерием устойчивости.

Устойчивость (резистентность) определяется как снижение чувствительности до такой степени, что данный штамм микобактерий способен размножаться при воздействии на него препарата в критической или более высокой концентрации.

Наряду с понятиями "чувствительность" и "устойчивость" к противотуберкулезным препаратам в настоящее время используются также термины, определяющие различные аспекты лекарственной устойчивости. Так, в случае наличия лекарственной устойчивости к двум или более лекарственным препаратам данный штамм микобактерий определяется как полирезистентный.

Особое место среди полирезистентных занимают микобактерии, у которых обнаруживается лекарственная устойчивость к двум основным противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину) - штаммы, обладающие лекарственной устойчивостью одновременно к изониазиду и рифампицину, независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам, обозначаются как штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (или штаммы с МЛУ).

Этим штаммам уделяется особое внимание, так как лечение пациентов, у которых процесс вызван такими штаммами, представляет большие трудности. Оно является длительным, дорогостоящим и требует использования препаратов резервного ряда, многие из которых дорогостоящие и могут вызывать тяжелые побочные реакции. Кроме того, некоторые штаммы с множественной лекарственной устойчивостью обладают повышенной способностью к распространению (трансмиссивностью) и вызывают тяжелые прогрессирующие формы заболевания, нередко приводящие к неблагоприятным исходам.

Наряду с перечисленными определениями различных видов спектра лекарственной устойчивости микобактерий, в международной практике принято различать первичную и приобретенную лекарственную устойчивость.

Первичная лекарственная устойчивость определяется как устойчивость, обнаруженная у микобактерий, выделенных от пациента, никогда не принимавшего противотуберкулезные препараты или получавшего такое лечение менее одного месяца. В данном случае подразумевается, что больной заразился лекарственно-устойчивым штаммом микобактерий. Первичная лекарственная устойчивость характеризует состояние микобактериальной популяции, циркулирующей в данной территории, и ее показатели важны для оценки степени напряженности эпидемической ситуации.

Приобретенная (вторичная) лекарственная устойчивость определяется как устойчивость микобактерий, выявленных у больного туберкулезом, получавшего лечение противотуберкулезными препаратами в течение месяца и более. Вторичная лекарственная устойчивость является косвенным показателем эффективности проводимой химиотерапии.

6.2. Критерии лекарственной устойчивости

Уровень устойчивости данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией препарата (количество мкг в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается размножение микобактерий (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.

Критические концентрации. Критерии лекарственной устойчивости.

Для различных препаратов установлена определенная критическая концентрация. Она имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на микобактерии туберкулеза в условиях макроорганизма.

Критерием устойчивости микобактериальной популяции называют показатель роста микобактериального пула, выраженный в абсолютных (число КОЕ) или относительных единицах (пропорция КОЕ), на питательной среде, содержащей противотуберкулезный препарат в критической концентрации, превышение которого считается наличием признака устойчивости микобактерий.

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 в виду, что объем засеваемой суспензии клеток стандартизован и соответствует 1 x 10 микробных тел.

Для разных по составу питательных сред критическая концентрация одного и того же препарата - различна. Значения критических концентраций существенно отличаются также при использовании разных методов определения лекарственной чувствительности.

Таблица 8

Критические концентрации противотуберкулезных препаратов для определения лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена

Название препарата	Концентрация в мкг/мл
Препараты основного ряда	
Стрептомицин	10
Изониазид	1
Рифампицин	40
Этамбутол	2
Препараты резервного ряда <*>	
Канамицин	30
Протионамид (этионамид)	30
Циклосерин	30
Капреомицин	30
Офлоксацин	2
ПАСК	1
Пиразинамид	200

<*> Критические концентрации препаратов II ряда носят ориентировочный характер и будут окончательно установлены после дополнительных исследований.

6.3. Метод абсолютных концентраций

В России для определения лекарственной устойчивости микобактерий традиционно используется метод абсолютных концентраций на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена.

В большинстве случаев этот метод применяется для непрямого определения лекарственной устойчивости. Непрямым методом называется метод определения лекарственной устойчивости после выделения культуры микобактерий. Он позволяет исследовать любое количество микобактерий в диагностическом материале, поскольку для определения лекарственной устойчивости используются штаммы микобактерий, предварительно выделенные на питательных средах. Так как сроки выделения возбудителя на питательных средах составляют не менее 1-1,5 месяцев, результаты определения лекарственной устойчивости указанным методом обычно получают не ранее, чем через 2-2,5 месяца после посева материала.

При определении лекарственной устойчивости микобактерий на плотных средах культура считается чувствительной к той концентрации препарата, которая содержится в среде, если число колоний микобактерий, выросших на одной пробирке с препаратом, не превышает 20, а посевная доза соответствует 1x10 микробных тел. Культура расценивается как устойчивая к данной концентрации препарата только при наличии на пробирке с этой концентрацией 20 колоний и более при обильном росте в контрольной пробирке, не содержащей лекарственного препарата.

В отечественной фтизиатрической практике при определении лекарственной устойчивости не ограничиваются определением только критических концентраций. Это связано с тем, что расширенное определение уровня лекарственной устойчивости возбудителя позволяет клиницисту варьировать дозировки препаратов и лекарственные режимы, добываясь 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 Левенштейна-Йенсена

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
ПАСК	1	5

6.3.1. Разведение противотуберкулезных препаратов и приготовление питательных сред

В питательную среду Левенштейна-Йенсена, не содержащую крахмала (крахмал адсорбирует лекарственные препараты), непосредственно перед свертыванием добавляют рабочие разведения различных противотуберкулезных препаратов.

Для приготовления питательных сред с целью определения лекарственной устойчивости микобактерий должны использоваться химически чистые субстанции противотуберкулезных препаратов.

Для приготовления из химически чистой порошковой 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 серии. Сведения об активности приводятся на этикетках или упаковках лекарственных препаратов и могут быть получены от компании-изготовителя.

6.3.2. Примеры приготовления питательных сред препаратами

Для определения лекарственной чувствительности к лекарственным препаратам в лаборатории должны иметься проверенные весы, позволяющие производить взвешивание с точностью до 0,2 мг, что обеспечит точность навески препаратов с погрешностью не более +/- 1,5%.

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 мг/мл = 1000 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 (N 1-10 мкг/мл, N 2 - 25 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 198 мл среды + 2 мл раствора (А) = 10 мкг/мл;

- в N 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 N 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания свертыватели типа "АСИС" (новое название АСПС), добиваясь равномерной величины косяков (примерно 8-10 см), и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Изониазид

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 x 40) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (N 1 - 1 мкг/мл, N 2 - 10 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:
- в N 1 - 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) = 1 мкг/мл;
- в N 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.

Рифампицин

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

Взвесить 30 мг порошковидной формы чистой субстанции рифампицина.

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

Приготовление питательной среды:

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

Приготовить навеску 30 мг и перенести ее в стерильную пробирку N 1.

(1) 30 мг RIF + 2,0 мл этанола - 14550 мкг/мл.

Подогреть до температуры 35-40 град. С на водяной бане. Затем, используя стерильные пробирки:

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

(Б) 2,5 мл раствора (А) + 2,5 мл H₂O - 2000 мкг/мл.

Маркируют стерильные колбы N 1 "40 мкг/мл", N 2 "80 мкг/мл":

- в N 1 4 мл (Б)+ 196 мл среды - 40 мкг/мл;

- в N 2 4 мл (А)+ 196 мл среды - 80 мкг/мл.

Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35-40 град. С.

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 N 1 и N 2 тщательно перемешать круговыми движениями. Содержимое каждой колбы разлить в 40 пробирок по 5 мл в каждую, начиная с колбы N 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания типа "АСИС" (**новое название АСПС**), 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 используется этамбутол дигидрохлорид.

(А) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить ее в 14,8 мл стерильной дистиллированной воды - 1 мг/мл = 1000 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 (5 мл x 40) на каждое разведение препарата необходимо:

В две стерильные промаркированные колбы (N 1 "2 мкг/мл", N 2 "5 мкг/мл") стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) = 2 мкг/мл;

- в N 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 N 1. Пробирки поместить в аппарат для свертывания свертыватели типа "АСИС" (**новое название АСПС**) и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Канамицин

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции канамицина моносульфата колеблется 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 = 2000 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 (N 1 - 30 мкг/мл, N 2 - 50 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 197 мл среды + 3 мл раствора (A) = 30 мкг/мл;

- в N 2 - 195 мл среды + 5 мл раствора (A) = 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора A, 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 N 1. Пробирки поместить в наклонном положении в аппарат для свертывания типа "АСИС" (новое название АСПС), 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 нерастворим в дистиллированной воде.

(A) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества, и растворить в 3 мл ректифицированного этилового спирта 96 град. или диметил-сульфоксида. Добавить к раствору 6,9 мл стерильной дистиллированной воды - 2000 мкг/мл.

Приготовление питательной среды:

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

В две стерильные промаркированные колбы (N 1 "30 мкг/мл", N 2 "50 мкг/мл") стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 197 мл среды + 3 мл раствора (A) - 30 мкг/мл;

- в N 2 - 195 мл среды + 5 мл раствора (A) - 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в обе колбы расчетное количество раствора A, 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 N 1. Пробирки поместить в аппарат для свертывания типа "АСИС" (новое название АСПС) и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Капреомицин

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

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

Для приготовления 200 мл питательной среды на 40 культур (5 мл x 40) можно воспользоваться следующей схемой:

Приготовить навеску 20 мг вещества

(A) 20 мг капреомицина + 8,4 мл H₂O - 2000 мкг/мл.

Колбы N 1 "30 мкг/мл", N 2 "50 мкг/мл":

- в N 1 - 3 мл (A) + 197 мл среды - 30 мкг/мл;

- в N 2 - 5 мл (A) + 195 мл среды - 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора A, а затем расчетное количество питательной среды.

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

Циклосерин (D-cycloserin)

В 1 г препарата 980 мг активного начала.

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

(A) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества, и растворить в 9,9 мл стерильной дистиллированной воды - 2 мг/мл = 2000 мкг/мл.

Приготовление питательной среды:

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

В две стерильные промаркированные колбы (N 1 - 30 мкг/мл, N 2 - 50 мкг/мл) стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 197 мл среды + 3 мл раствора (A) - 30 мкг/мл;

- в N 2 - 195 мл среды + 5 мл раствора (A) - 50 мкг/мл.

Желательно вначале налить в колбы расчетное количество раствора A, 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 (A), содержащий в 1 мл раствора 1,0 мг активной субстанции, следует:

(А) взвесить на электронных или аналитических весах 20 мг порошковидной формы ПАСК = 17,6 мг активного начала и растворить в 17,6 мл стерильной дистиллированной воды - 1 мг/мл = 1000 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 (N 1 "1 мкг/мл", N 2 "5 мкг/мл") стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) - 1 мкг/мл;

- в N 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 N 1. Пробирки поместить в аппарат для свертывания типа "АСИС" (новое название АСПС) и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Офлоксацин

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции - 1000 мг активного начала.

Офлоксацин не растворим в дистиллированной воде, для его растворения применяется 0,1 N раствор NaOH. Для этого:

к навеске 0,4 г NaOH добавить 100 мл стерильной дистиллированной воды = 0,1 N NaOH.

(А) приготовить навеску препарата весом 20 мг вещества и растворить ее в 20 мл 0,1 N раствора NaOH - 1 мг/мл = 1000 мкг/мл;

(Б) к 12 мл стерильной дистиллированной воды добавить 3 мл раствора (А) - 200 мкг/мл.

Приготовление питательной среды:

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

В две стерильные промаркированные колбы (N 1 "2 мкг/мл", N 2 "10 мкг/мл") стерильной пипеткой налить последовательно:

- в N 1 - 198 мл среды + 2 мл раствора (Б) = 2 мкг/мл;

- в N 2 - 190 мл среды + 10 мл раствора (Б) = 10 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 N 1. Пробирки поместить в аппарат для свертывания типа "АСИС" (новое название АСПС) и проводить процедуру свертывания питательной среды в обычном порядке.

Пиразиnamид

Пиразиnamид является препаратом, входящим во все схемы лечения, и обладает бактерицидной активностью в отношении внутриклеточно расположенных микобактерий. Особенностью препарата является его высокая противотуберкулезная активность при сниженных значениях кислотности среды (рН ~ 6,0). В то же время для культивирования микобактерий туберкулеза на плотных яичных средах оптимальным является значение кислотности, близкое к нейтральному.

Эти обстоятельства не позволяют использовать стандартные методики для определения лекарственной устойчивости к пиразиnamиду на плотных яичных питательных средах.

3.2. Постановка опытов по определению лекарственной устойчивости

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 Ziehl-Neelsen 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.

При любом методе определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам каждую серию приготовленной питательной среды с препаратами необходимо проверить, засевая на нее заведомо чувствительную культуру микобактерий туберкулеза. Для контроля можно пользоваться чувствительным штаммом H37Rv или любой другой многократно проверенной культурой микобактерий туберкулеза, чувствительной ко всем испытуемым противотуберкулезным препаратам. Контрольная культура засеивается так же, как и испытуемые.

Если среда с препаратами приготовлена правильно, то контрольная культура не должна расти при тех концентрациях препаратов, при которых не растут чувствительные к данному препарату штаммы. Появление роста контрольного штамма в пробирке с препаратом указывает на то, что при приготовлении среды с препаратами 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				
N культуры по журналу регистрации	203	203	203	203
Препарат	K	NaS	Sm	Sm
Концентрация			10	25
Пояснения	Контроль салицилат	Натрия 10 мкг/мл	Стрептомицин 25 мкг/мл	Стрептомицин

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 и Финна-II) 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 N 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 N 5. Получают суспензии с

7

содержанием клеток соответствующему 5 x 10 микробных тел. Посев на среды с лекарственными препаратами производить из этих суспензий.

Процедура исследования:

- 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 ко 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 град. С; 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 3-4 недель при обязательном еженедельном просмотре.

Оценка результатов

Результат определения лекарственной устойчивости учитывают на 21 день после посева. При скудном росте в контрольной пробирке все пробирки с препаратами оставляют еще на 1-2 недели в термостате до получения выраженного роста в контроле, после чего выдают окончательный ответ. Культуру считают чувствительной к данной концентрации препарата, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний при обильном росте в контрольной пробирке. Культура считается устойчивой к той концентрации препарата, которая содержится в данной пробирке, если в пробирке со средой выросло более 20 колоний при обильном росте в контроле.

6.4. Альтернативные методы определения лекарственной устойчивости микобактерий

Существует несколько методов определения лекарственной устойчивости микобактерий. Практически все они основаны на культивировании микобактерий на плотных (яичные или агаровые) или жидких питательных средах и осуществляются как прямой или непрямой метод определения лекарственной устойчивости (см. выше).

При прямом методе на ряд питательных сред, содержащих и не содержащих определенные концентрации лекарственных препаратов, засеивается обработанный гомогенизирующими и обеззараживающими средствами обогащенный при центрифугировании осадок диагностического материала.

При непрямом методе на ряд питательных сред, содержащих и не содержащих определенные концентрации лекарственных препаратов, засеивается суспензия чистой культуры микобактерий, выращенной на плотной яичной или агаровой среде. Аналогичным образом может исследоваться культура, выращенная на жидкой питательной среде (7H9 бульон) и соответствующим образом дозированная.

Как указывалось выше, в международной практике используются преимущественно 4 метода:

- метод пропорций на среде Левенштейна-Йенсена или на среде Миддлбрука 7H10;
- метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена;
- метод коэффициента резистентности;
- радиометрический метод Bactec R 460.