

УДК 004.9:616-002.5-078

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Л.Г. Спиридонова<sup>1</sup>, Н.А. Пашкова<sup>2</sup>, Г.Д. Маурер<sup>2</sup>,<sup>1</sup>Оренбургская государственная медицинская академия,<sup>2</sup>Областной клинический противотуберкулезный диспансер, г. Оренбург*Спиридонова Лилия Геннадьевна – e-mail: Spiridonovalilia@mail.ru*

Проведено сравнение двух бактериологических методов исследования туберкулеза: классического метода и на автоматизированной системе BACTEC MGIT 960. Было выполнено 1247 посевов патологического материала. Установлено, что автоматизированная система BACTEC MGIT 960 в сравнении с классическим методом посева на плотную питательную среду более эффективна как в отношении обнаружения микобактерий туберкулеза, так и в сроках их детекции. Однако для более достоверного подтверждения бактериовыделения по-прежнему необходимо обследование больных обоими культуральными методами. Предложено проводить бактериологическое исследование преимущественно на автоматизированных системах у больных изолированными выпотными плевритами (исследование плевральной жидкости), дифференциально-диагностических пациентов и больных, нуждающихся в определении активности туберкулезного процесса.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, бактериологическое исследование, автоматизированные системы BACTEC.

Two bacteriological methods of research classical and on system BACTEC MGIT 960 have been compared. 1247 crops of a pathological material have been executed. System BACTEC MGIT 960 for detection Mycobacterium tuberculosis and for speed of revealing was more effective. However inspection of patients is necessary for carrying out two bacteriological methods for increase in reliability of results. System BACTEC MGIT 960 is more effective at inspection of patients with a pleurisy and at patients with not clear diagnosis.

**Key words:** Mycobacterium tuberculosis, bacteriological method, automated system BACTEC.

## Введение

Несмотря на новейшие достижения в медицине, туберкулез как инфекционное заболевание был и остается одной из самых серьезных проблем во всем мире. С конца XX века эпидемиологическая ситуация по туберкулезу ухудшается в большинстве стран, в том числе и в России [1, 2].

Помимо медико-социальных причин важная роль в эпидемиологии туберкулеза отводится микробиологическим факторам, таким как изменение свойств возбудителя заболевания [3]. Одним из наиболее значимых свойств *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) является способность приспосабливаться к воздействию антибактериальных препаратов в виде селекции и адаптации лекарственно-устойчивых (ЛУ) штаммов [4]. В последние годы наблюдается рост лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза не только к основным, но и к резервным противотуберкулезным препаратам [5]. При этом изменяется структура резистентности МБТ за счет увеличения доли множественной лекарственной устойчивости и появления обширной лекарственной устойчивости, что значительно усложняет задачу лечения таких больных [6, 7, 8, 9]. В этих условиях возрастает роль бактериологических лабораторных методов быстрого обнаружения возбудителя, его идентификации и определения лекарственной чувствительности [10, 11, 12].

В последние годы ускоренную и адекватную микробиологическую диагностику туберкулеза невозможно представить без использования новых методов, одним из которых является применение автоматизированных систем с использованием жидких питательных сред – BACTEC-460, BACTEC MGIT-960 (Becton Dickinson, США), ESP II (Trek Diagnostic System), MB/BACT 240, BacT/Alert 3D (BioMerieux, Франция) [13, 14, 11].

В Оренбургской области в централизованную бактериологическую лабораторию Областного клинического противотуберкулезного диспансера (ООКПТД) автоматизированная система BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, США) впервые была поставлена в рамках проекта «Профилактика, диагностика, лечение туберкулеза и СПИДа» Государственного Фонда «Российское здравоохранение» в 2008 году.

**Целью настоящего исследования** стала сравнительная оценка первых результатов применения автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) в Оренбургской области.

## Материалы и методы

Исследование проводилось на базе централизованной бактериологической лаборатории ООКПТД. Объектом исследования стали 3942 больных с бронхолегочной патологией, обратившихся в консультативные поликлиники, а также поступивших на стационарное лечение в ООКПТД в 2009 г. Всего было выполнено 13 558 культуральных исследований патологического материала (самопроизвольно выделенной и индуцированной мокроты, промывных вод бронхов, плевральной и спинномозговой жидкости), причем 1247 проб было исследовано системой BACTEC MGIT-960.

Посев патологического материала классическим методом производился на плотные питательные среды: среду Левенштейна-Йенсена и среду «Новая» согласно приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ». Посев на жидкую питательную среду Middelbrook 7H9 – согласно международному руко-

водству по работе с системой BACTEC MGIT 960. При культуральном исследовании на автоматизированной системе проводился одновременный посев диагностического материала на жидкую среду Middelbrook 7H9 и на плотную питательную среду «Новая», что позволило выполнить обязательное при микобактериологических исследованиях требование применения не менее двух питательных сред различного состава.

Кроме бактериологического, параллельно из одной и той же пробы диагностического материала проводилось микроскопическое исследование на кислотоустойчивые микобактерии люминесцентным методом с окраской аураминном и родамином по Бою.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью критерия достоверности  $p$  для относительных величин [15].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением программы STATISTICA-8.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Сравнение распределения частот значений признака производилось методом непараметрической статистики с помощью критерия  $\chi^2$ .

## Результаты исследования

Была проведена сравнительная характеристика роста микобактерий туберкулеза на двух средах. На жидкой среде Middelbrook 7H9 положительный результат был получен в 31,4% случаев. Рост МБТ на плотной питательной среде «Новая» был выявлен в 24,3% ( $p=0,0008$ ).

Скорость выявления возбудителя на среде Middelbrook 7H9 колебалась в пределах 5–42 суток, составляя в среднем 13,4 суток. В то же время продолжительность культивирования того же самого материала на плотной яичной среде «Новая» с момента посева до появления видимого роста колебалась в пределах 18–90 дней (в среднем 32,3 суток).

Был проведен анализ скорости роста возбудителя на различных питательных средах в зависимости от массивности бактериовыделения. На жидкой питательной среде средняя скорость роста возбудителя из диагностического материала, в котором при люминесцентной микроскопии обнаруживались КУМ, составила 9,8 суток (пределы колебаний 5–34 суток). Средняя скорость роста из олигобациллярного материала составила 17,8 суток (пределы колебаний 5–42 дня). Средняя скорость роста МБТ на плотной питательной среде из диагностического материала, в котором при люминесцентной микроскопии обнаруживались КУМ, составила 29,4 суток (пределы колебаний 18–74 дня), из олигобациллярного материала этот показатель составил 36,2 суток (пределы колебаний 18–90 суток).

Для выявления эффективности бактериологического исследования системы BACTEC проводилось сравнение высеваемости *Mycobacterium tuberculosis* двумя методами из различных видов диагностического материала, поступившего на исследование (таблица 1).

Как видно из таблицы, высеваемость МБТ системой BACTEC MGIT 960 была значительно выше, чем при исследовании классическим методом. Наибольшая достоверность различий была выявлена при посеве мокроты и плевральной жидкости, при посеве индуцированной мокроты высеваемость была сопоставимой, в других группах отмечалось недостаточное количество исследований. В спинномозговой жидкости более высокая высеваемость *M. tuberculosis* классическим методом была недостоверной.

**ТАБЛИЦА 1.**
**Сравнение высеваемости МБТ из различных видов диагностического материала**

Характер патологического материала	Система ВАСТЕС			Классический метод			Достоверность различия p
	n	Положит. результат		n	Положит. результат		
		Абс.	%		Абс.	%	
Мокрота	1109	390	35	10414	2191	21	0,0001
Промывные воды	26	6	23	1205	145	12	0,06
Индукцированная мокрота	90	11	12	352	33	9,4	0,08
Ликвор	28	4	14,3	57	14	24,6	0,06
Плевральная жидкость	61	20	32,7	216	33	15,3	0,05

**ТАБЛИЦА 2.**
**Сравнительный анализ бактериовыделения в различных группах диспансерного учета двумя бактериологическими методами**

Группа Д учета	Система ВАСТЕС			Классический метод			Достоверность различия p
	n	Положит. результат		n	Положит. результат		
		Абс.	%		Абс.	%	
Впервые выявленные (в/в)	27	17	62,9	564	198	35,0	0,005
I группа (без в/в)	10	6	60,0	950	270	28,4	0,05
II группа	3	2	66,7	325	148	45,5	0,07
III группа	6	0	0	465	4	0,86	-
0 группа	105	5	4,8	768	3	0,39	0,04

Также был проведен сравнительный анализ бактериовыделения в различных группах диспансерного (Д) учета контингентов противотуберкулезного диспансера. Согласно приказу № 109 МЗ РФ I группа диспансерного учета включает больных с активным туберкулезом (впервые выявленных, больных с рецидивом, а также прервавших лечение); ко II группе Д учета относятся больные активным туберкулезом с хроническим течением; III группа – излеченные больные, 0 группа – дифференциально-диагностические больные и нуждающиеся в определении активности туберкулезного процесса. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Представленные данные показывают, что установленный рост МБТ при использовании системы ВАСТЕС MGIT 960 был выше во всех группах, однако преобладал в 0 группе Д учета и у впервые выявленных больных.

Для уточнения подтверждаемости бактериовыделения был проведен сравнительный анализ роста возбудителя на двух питательных средах. Из полученных 432 положительных результатов в 13% случаев рост микобактерий туберкулеза определялся только на жидкой питательной среде Middelbrook 7Н9, в 20% рост МБТ был выявлен только на плотной питательной среде «Новая», в 67% случаев бактериовыделение подтверждалось обоими методами.

#### Обсуждение результатов

Высееваемость МБТ автоматизированной системой ВАСТЕС MGIT 960 оказалась на 22,6% выше, чем классическим методом. Скорость выявления *M. tuberculosis* на жидкой питательной среде Middelbrook 7Н9 была в 2,4 раза меньше, чем на плотной питательной среде ( $p=0,03$ ). Как известно, жидкая питательная среда создает наиболее комфортные условия роста и не требует изменения адаптивных свойств микро-

бактерий, что обеспечивает и увеличение высееваемости, и сокращение сроков обнаружения возбудителя.

Однако при исследовании олигобациллярного материала рост микобактерий туберкулеза на среде Middelbrook 7Н9 увеличивался значительно (почти в 2 раза) по сравнению с результатами роста из материала с массивным бактериовыделением. Это, по-видимому, обусловлено особенностями детекции положительного результата, которые зависят от количества микробных тел. На плотной питательной среде «Новая» сроки роста из олигобациллярного материала увеличивались не столь выражено (на 20%), так как появление видимых колоний зависит не от количества возбудителя, а от его биологических свойств.

33% больных выделяли *Mycobacterium tuberculosis*, которые избирательно росли или только на жидких, или только на плотных питательных средах, что также обусловлено культуральными свойствами возбудителя.

При сравнении результатов бактериологических исследований в различных видах диагностического материала наибольшая эффективность автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 была достоверно выявлена при посеве мокроты и плевральной жидкости. В спинномозговой жидкости преобладание положительных результатов при классическом методе посева было недостоверно, однако системой ВАСТЕС MGIT 960 было обследовано слишком незначительное количество патологического материала, чтобы подтвердить достоверность различий в пользу одного из методов исследования.

При обследовании различных групп диспансерного учета контингентов противотуберкулезного диспансера наибольшая эффективность применения системы ВАСТЕС была выявлена в 0 группе и у впервые выявленных больных. Что, скорее всего, связано с отсутствием предшествующего лечения и, таким образом, сохранения высокой жизнеспособности микобактерий.

#### Выводы

Таким образом, автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960 в сравнении с классическим методом посева на плотную питательную среду более эффективна как в отношении обнаружения микобактерий туберкулеза, так и в сроках их детекции. Однако для более достоверного подтверждения бактериовыделения необходимо обследование больных обоими культуральными методами.

Бактериологическое исследование на автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960, по нашему мнению, оправдано преимущественно у больных изолированными выпотными плевритами (исследование плевральной жидкости), дифференциально-диагностических пациентов и больных, нуждающихся в определении активности туберкулезного процесса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Туберкулез в Российской Федерации 2006 г.: Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. Москва. 2007. С. 7.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB. 2009. 411 с.
3. Joel D. Ernst, Giralдина Trevejo-Nucez, and Niaz Banaiee. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. № 7. P. 1738-1745.

4. Маничева О.А. Проблемы лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis*: ускоренное культуральное выявление, контроль адекватности химиотерапии, вирулентность. Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Санкт-Петербург. 2009.
5. Сазыкин В.Л., Пашкова Н.А., Сазыкина И.Г. Анализ устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам. В кн.: Материалы VIII Российского съезда фтизиатров. Москва. 2007. С. 126-127.
6. Севастьянова Э.В. Совершенствование микробиологической диагностики туберкулеза в учреждениях противотуберкулезной службы и общей лечебной сети. Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Москва. 2009.
7. Спиридонова Л.Г., Сазыкин В.Л. Особенности впервые выявленного туберкулеза органов дыхания с первичной лекарственной устойчивостью. В кн.: Научные труды (К 85-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки, профессора М.М. Авербаха). Под ред. В.И. Литвинова. Москва: Изд-во МНПЦБТ, 2010. С. 242-245.
8. Barbara Eker, Johannes Ortmann, Giovanni B. Migliori et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2008. Vol.14. № 11. P. 1700-1706.
9. Fattorini L., Iona E., Cirillo D. et al. External quality control of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing: results of two rounds in endemic countries. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2008. Vol. 12. № 2. P. 214-217.
10. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Мороз А.М. Централизованная микобактериологическая лаборатория – необходимый компонент фтизиатрической службы крупных городов России. *Пробл. туб.* 2007. № 10. С.40-43.
11. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Абрамова З.П. и др. Стратегия развития микробиологической экспресс-диагностики туберкулеза в Москве с помощью автоматизированных систем Bactec MGIT 960. В кн.: Научные труды (К 85-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки, профессора М.М. Авербаха). Под ред. В.И. Литвинова. Москва: Изд-во МНПЦБТ, 2010. С. 80-86.
12. Abeer E. Immunological and Molecular Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Between two Environmentally Different Regions. *Current Research in Tuberculosis*. 2009. Vol. 1. № 1. P. 7-14.
13. Быкадорова К.Р., Гольдман О.М., Рыжков С.И., Шовкун Л.А. Метод ускоренной микробиологической диагностики туберкулеза. В кн.: Материалы VIII Российского съезда фтизиатров. Москва. 2007. С. 117-118.
14. Голышевская В.И., Севастьянова Э.В. Сравнительный анализ эффективности микробиологической диагностики туберкулеза в различных регионах России. В кн.: Материалы VIII Российского съезда фтизиатров. Москва. 2007. С. 119.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: МедиаСфера. 2003. С. 312.