

Б. А. Понур, Ю. Н. Шиков, Я. Ю. Мачерет, Л. В. Веселовский, Ж. Э. Вялых ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ СПОСОБА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ВКГ

*Главный Военный клинический госпиталь МО Украины
Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского АМН Украины*

В настоящее время традиционные микробиологические методы выявления микобактерий туберкулеза (МБТ) не удовлетворяют требования клиницистов. Быстрый метод бактериоскопии обладает низкой чувствительностью, более чувствителен культуральный метод исследования (посев клинического материала на плотные яичные среды), но исследование занимает 1–2 месяца. Методы быстрого обнаружения МБТ имеют целый ряд недостатков, а именно: как правило высокую себестоимость, необходимость дополнительного посева на плотную питательную среду, иногда сложность идентификации и интерпретации результатов [2].

Следовательно, задача быстрой микробиологической диагностики туберкулеза далека от окончательного решения.

Украинскими учеными разработана и внедрена в практику микробиологическая методика быстрого выявления МБТ [1, 3]. Методика основывается на применении среды ВКГ, которая включает стимулятор для ускорения роста МБТ и питательную среду.

Целью нашей работы было сравнительное исследование клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж) на наличие МБТ при посеве на среду ВКГ, Левенштейна-Йенсена, Финна II; бактериоскопии и постановки полимеразной цепной реакции для детекции ДНК МБТ, изучение информативности экспресс-диагностики с помощью среды ВКГ.

Работа выполнена на базе Главного клинического военного госпиталя МО Украины. Было произведено 167 посевов биологического материала от 118 больных с диагностированным туберкулезом легких и с подозрением на туберкулез (159 посевов мокроты, 2 — плевральной жидкости, 6 — промывных вод бронхов) на среду ВКГ и параллельно на среду Левенштейна-Йенсена и Финна II.

Бактериоскопия, посевы клинического материала на среды ВКГ, Левенштейна-Йенсена, Финна II производились согласно общепринятым методикам [5, 3].

В 37 образцах клинического материала из 167 методом бактериоскопии были обнаружены кислотоупорные палочки (КУП).

В 62 (37,1 %) случаях из 167 был получен рост флоры на среде ВКГ. Результаты бактериоскопического и культурального методов исследования биологического материала представлены в таблице 1.

Как следует из данных таблицы, в 16 (9,6 %) случаях, параллельно с бактериальным ростом на среде ВКГ, рост типичных МБТ был получен на среде Левенштейна — Йенсена (Финна II). В 14 (8,4 %) случаях наличие КУП в посевном материале было подтверждено методом бактериоскопии, а в 17 (10,2 %) — наличие МБТ подтверждалось как бактериоскопическим методом, так и культуральным (на средах Левенштейна — Йенсена, Финна II). В целом в

47 (28,1 %) случаях наличие роста флоры на ВКГ сопровождалось параллельно наличием роста МБТ на плотной яичной среде, либо наличием КУП в посевном материале, либо и тем и другим способом в исследуемых образцах выявляли МБТ. В 15 (9,0 %) случаях рост на среде ВКГ не сопровождался параллельно ростом МБТ на среде Левенштейна-Йенсена, наличием КУП в биоматериале.

Следует отметить, что в 9 из 15 случаев, где был получен рост флоры на среде ВКГ из материала, где бактериоскопическим методом не были выявлены КУП и на среде Левенштейна — Йенсена рост МБТ отсутствовал, на момент исследования у данных больных определялись участки деструкции в легких и другие рентгенологические признаки туберкулеза легких. У этих 9 больных бактериовыделение прекратилось лишь незадолго до нашего исследования, что было подтверждено бактериоскопически и бактериологически (посевом на среды Левенштейна — Йенсена, Финна II).

В 88 случаях из 167 не был получен рост на среде ВКГ и на плотных яичных средах. Результаты бактериоскопии на наличие КУП были отрицательными.

Из 167 исследований в 91 случае материал был взят от больных с диагностированным туберкулезом легких, а в 76 — от больных с неспецифическими заболеваниями легких (НЗЛ). Рост на питательной среде ВКГ при посеве клинического материала от больных туберкулезом был получен в 56 (33,5 %) случаев, от больных с неспецифическими заболеваниями легких — в 6 (3,6 %) случаях (табл. 2).

Рост на ВКГ отсутствовал при посеве клинического материала от больных туберкулезом легких в 35 (21,0 %) случаях, от больных НЗЛ — в 70 (41,9 %).

Таким образом, в 56 (61,5 %) случаях был получен рост флоры на ВКГ из 91 случая, где на момент исследования имели место рентгенологические признаки деструктивного туберкулеза легких, но только в 47 (51,6 %) из них было выявлено бактериовыделение микроскопически и посевом на среды Левенштейна-Йенсена, Финна II. То есть можно сказать, что среда ВКГ оказалась более чувствительной по сравнению с традиционными методами выявления МБТ.

Выявлена определенная зависимость между степенью резистентности выделенных МБТ и наличием роста на среде ВКГ. По результатам наших исследований в 11 случаях посевы клинических образцов не дали роста на ВКГ, но был получен во всех этих случаях обильный рост МБТ на средах Левенштейна — Йенсена и Финна II через 2–4 недели. Результаты повторных посевов были аналогичными. Показатели чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в 10 случаях из этих 11) выявили устойчивость МБТ к 5–6 химиопрепаратам.

Из 33 клинических образцов был получен рост на среде ВКГ и параллельно из этого же биоматериала на плотной яичной среде были выделены МБТ, которые в 16 случаях были чувствительны ко всем противотуберкулезным препаратам, а в 15 — устойчивы к 1–4 препаратам.

Таблиця 1

Результаты бактериоскопического и культурального метода исследования биологического материала

№ п/п	Варианты сочетаний полученных результатов бактериоскопического и бактериологического методов исследования	Количество образцов биоматериала	
		абс.	%
1	ВКГ "+"; Л — Й "+"; бактериоскопия "КУП +"	17	10,2
2	ВКГ "+"; Л — Й "+"; бактериоскопия КУП —"	16	9,6
3	ВКГ "+"; Л — Й "—"; бактериоскопия КУП +"	14	8,4
4	ВКГ "+"; Л — Й "—"; бактериоскопия "КУП —"	15 *	9,0
5	ВКГ "—"; Л — Й "+"; бактериоскопия КУП +"	1	0,6
6	ВКГ "—"; Л — Й "—"; бактериоскопия "КУП +"	6	3,6
7	ВКГ "—"; Л — Й "+"; бактериоскопия "КУП —"	10	5,9
8	ВКГ "—"; Л — Й "—"; бактериоскопия "КУП —"	88	52,7
Всего		167	100,0

Примечание: 1) ВКГ "+" или "—" — наличие или отсутствие роста флоры на среде ВКГ;
 2) Л — Й "+" или "—" — наличие либо отсутствие роста МБТ на плотных яичных средах (Левенштейна — Йенсена, Финна II);
 3) " КУП +" или "КУП —" — наличие или отсутствие кислотоупорных палочек в мазках мокроты или другого биоматериала;
 4) * — у 9 больных из этой группы за 2–3 недели до момента исследования выявлялись МБТ бактериоскопически и культурально, а также на момент исследования еще определялись рентгенологические признаки деструктивного туберкулеза легких.

Таблиця 2

Результаты посевов на питательной среде ВКГ клинических образцов, взятых от больных туберкулезом легких и неспецифическими заболеваниями легких

Результаты посевов, полученных на питательной среде ВКГ	Количество посевов клинических образцов на среде ВКГ					
	от больных туберкулезом легких		от больных неспецифическими заболеваниями легких			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Наличие роста флоры	56	33,5	6	3,6	62	37,1
Отсутствие роста	35	21,0	70	41,9	105	62,9

Только в 2 случаях была выявлена резистентность МБТ к 5 препаратам.

Рост на среде ВКГ наблюдался, как правило, на 3–7 день в виде отдельных колоний или реже в виде сплошного газона. Колонии были круглые выпуклые крупных размеров бледно-желтого, иногда желтого цвета, матовые, по консистенции маслянистые.

Мазки культур, выделенных на ВКГ, окрашивали по методу Циля-Нильсена. В 42 из 62 случаев (67,7 %) были обнаружены кокковидные формы, в 11 (17,7 %) случаях — палочковидные, в 3 (4,8 %) — колбовидные, в 2 (3,3 %) — нитевидные, в 4 (6,5 %) — смешанные (палочковидные, кокковидные и колбовидные). Все полученные культуры не были кислотоустойчивыми.

Со среды ВКГ все изоляты были пересеяны на среду Левенштейна-Йенсена (приготовленного без малахитового зеленого), на которой был получен рост на 5–15 день. После нескольких пассажей на плотной яичной среде нам не удалось получить кислотоустойчивые формы бактерий. Во всех случаях на среде Левенштейна-Йенсена мы получали аналогичные формы бактерий, которые были взяты со среды ВКГ, а именно — кокковидные, палочковидные, нитевидные.

Для верификации полученных на среде ВКГ культур применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

[4]. В работе использовали набор реагентов "Ампли-Сенс", ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ. Культуральную взвесь для ПЦР анализа готовили из полученных при пассаже на среде Левенштейна — Йенсена изолятов. Пересев со среды ВКГ на среду Левенштейна — Йенсена производили для исключения вероятности попадания в отобранную для анализа пробу фрагментов исходного клинического материала, где могут содержаться микобактериальные клетки.

С помощью ПЦР были изучены 50 образцов культур, полученных со среды ВКГ и далее пересеянные на среду Левенштейна — Йенсена. В 43 случаях культуры были получены из клинического материала от больных туберкулезом легких, в 7 случаях — от больных НЗЛ. Положительный результат ПЦР со специфичными для *M. tuberculosis complex* праймерами был получен в 39 случаях из 43, т.е. в 90,7 % случаев при исследовании клинического материала от больных туберкулезом. При исследовании материала от больных НЗЛ во всех случаях был получен отрицательный результат ПЦР.

Проведенные исследования позволили установить, что результаты ПЦР зависели от морфологии выделенных культур. Положительные результаты ПЦР-анализа были получены только в случае кокковидных форм, палочковидные и так называемые колбоподобные изоляты дали отрицательный результат.

Полученные результаты свидетельствуют, что кокковидные формы бактерий, выделенные из клинических образцов от больных туберкулезом легких на среде ВКГ, в большинстве случаев являются формами МБТ.

Таким образом, совокупность бактериоскопических, культуральных, молекулярно-биологических и рентгенологических исследований дают основание считать, что для экспресс-диагностики наличия МБТ в биологическом материале использование питательной среды ВКГ перспективно и требует дальнейших исследований.

Сложность идентификации выделенного возбудителя и интерпретации полученных результатов на среде ВКГ является, на наш взгляд, существенным недостатком данного метода и требует доработки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Власенко В. В.* Нова концепція біології розвитку мікобактерій туберкульозу // Медико-соціальні аспекти боротьби з туберкульозом. Досвід Київської міської державної адміністрації: Збірник матеріалів науково-практичної конференції. — Київ, 2001. — С. 22–23.
2. *Генодиагностика во фтизиатрії* / Е. Г. Бочкарев, Т. С. Денисова, Э. В. Генерозов и соавт. // Реф. ж. ВИНТИ. Медицина. Реф. сб. Вып. Туберкулез. — 2002. — № 1. — С. 1–16.
3. *Мікробіологічні методи обстеження хворих на туберкульоз* / О. А. Журило, В. В. Власенко, А. І. Барбова та ін. // Методичні рекомендації. — Київ, 2001. — 24 с.
4. *Момыналиев К. Т., Говорун В. М.* Перспективы применения методов ДНК-диагностики в лабораторной службе // Клиническая лабораторная диагностика. — 2000. — № 4. — С. 25–32.
5. *Наказ № 45 МОЗ України від 06.02.2002 про затвердження "Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції"* / складена під кер. Феценко Ю. І., Журило О. А., Клименко М. Т., Барбова А. І. та ін. // Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63–111.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ СПОСОБА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ ВКГ

*Б. А. Понур, Ю. Н. Шиков, Я. Ю. Мачерет,
Л. В. Веселовский, Ж. Э. Вялых*

Резюме

В работе исследована диагностическая ценность метода экспресс-диагностики туберкулеза с помощью питательной

среды ВКГ относительно культурального метода диагностики на средах Левенштейна — Йенсена, Финна II и метода бактериоскопии. Для идентификации полученных культур на среде ВКГ была проведена полимеразная цепная реакция. Анализ полученных результатов показал, что формы бактерий, выделенные из клинических образцов от больных туберкулезом легких на среде ВКГ, в большинстве случаев являются формами *M. tuberculosis*. Использование среды ВКГ для экспресс-диагностики наличия МБТ в биологическом материале является возможным, но сложность идентификации выделенного возбудителя и интерпретации полученных результатов на среде ВКГ является, на наш взгляд, недостатком данного метода и требует доработки.

DIAGNOSTIC VALUE OF METHOD OF M. TUBERCULOSIS DETECTING USING VKG NUTRIENT MEDIUM

*B. A. Ponur, Yu. N. Shicov, Ya. Yu. Macheret,
L. V. Veselovsky, Zh. E. Vyalyikh*

Summary

Three methods of tuberculosis diagnostics were compared in order to evaluate relative effectiveness: express-diagnostic test using VKG nutrient medium, cultural method, utilizing Levenshtein-Yensen and Finn II nutrient media, and sputum smear microscopy method. The PCR method was used to identify isolates from VKG medium. The analysis of the results demonstrated that the isolates from VKG medium were mostly *M. tuberculosis*. It is possible to use VKG medium for express-diagnostics of tuberculosis, but complicated identification of isolated microorganisms and difficult interpretation of results are the limitations this method, which require further improvement.