

В. П. Мельник, Л. В. Стаднік, В. В. Загородній, К. П. Половко, М. М. Карнаухова
ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЖИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
СЕРЕДОВИЩ ЛЕВЕНШТЕЙНА-ЕНСЕНА ФІРМ-ВИРОБНИКІВ
"HIMEDIA" ТА "BIOMERIEUX"

*Медичний інститут Української асоціації народної медицини
Київська міська клінічна туберкульозна лікарня № 1*

Незважаючи на науково-технічний прогрес і досягнення фтизіатричної науки, у багатьох країнах світу, як і в Україні, має місце епідемія туберкульозу. Лише за 2006 рік, вперше за останнє десятиріччя, захворюваність на туберкульоз зменшилась і становила 83,2 на 100 тис. населення.

Можна виділити 3 фактори, що можуть вплинути на поліпшення ситуації з туберкульозом: 1) покращання умов життя; 2) поліпшення лікувального процесу; 3) поліпшення виявлення хворих, у тому числі шляхом вдосконалення лабораторної діагностики.

Лікувальний процес залежить від часу та повноти результатів, які видає баклабораторія.

Найпопулярніший метод виявлення збудника туберкульозу — отримання культури МБТ на щільних живильних середовищах, причому швидкість росту збудника в значній мірі залежить від якості середовища культивування.

При цьому культуральне дослідження діагностичного матеріалу займає не менше 3—8 тижнів. Саме у ці терміни з'являється зростання культури МБТ на щільному живильному середовищі, а негативним результатом вважається відсутність росту протягом 12 тижнів після надходження зразка в лабораторію [2].

Особливо важливою проблемою у фтизіатричній клініці вважається виявлення стійкості МБТ до протитуберкульозних препаратів. Відомо, що найбільша епідемічна небезпека і якнайгірший прогноз для конкретного хворого пов'язані з множинною лікарською стійкістю (МЛС), яка визначається як резистентність, щонайменше, до ізоніазиду та рифампіцину [3]. Більш того, за даними різних авторів приблизно 90 % рифампіцинорезистентних ізолятів виявляються одночасно стійкими і до ізоніазиду [4, 5].

А стійкість ізолятів до рифампіцину стає своєрідним маркером мультирезистентності збудника туберкульозу.

З вищесказаного витікає, що найбільш актуальним завданням фтизіатрії на даному етапі є своєчасна діагностика стійкого до ліків туберкульозу.

Метою даної роботи було вивчення ростових властивостей середовищ Левенштейна-Енсена з і без антибіотиків, що випускаються двома виробниками — *bioMerieux* і *Himedia*.

Матеріали та методи

В якості зразків використовували 266 проб, відібраних у людей з ознаками захворювання на туберкульоз легенів. Передпосівна обробка отриманих проб проводилася методом NALC-OH-N-ацетил L-цистеїном з гідроксидом натрію. Розчин 1: 110 гр. NaOH розчиняли у 1000 мл дистильованої води. Розчин 2: 32,5 гр. Na-цитрату розчиняли

в 1000 мл дистильованої води. Розчини 1 і 2 автоклаували 20 хв. при 121°C. Розчин 3: до 50 мл розчину 1 додавали 50 мл розчину 2 і 0,5 гр N-ацетил L-цистеїну. Розчин 3 готували перед використанням. Фосфатний буфер pH 6.8: 11,6 гр $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9,26 гр KH_2PO_4 . Обробку матеріалу проводили за наступною схемою: 1) 10 мл проби змішували з 10 мл розчину 3. 2) суміш струшували протягом 20 хв. при кімнатній температурі. 3) додавали фосфатний буфер до об'єму 50 мл. 4) центрифугували 20 хв. при 3500 об./хв. 5) виливали надосадкову рідину. 6) до осаду додавали 1 мл фосфатного буферу, струшували та проводили висів.

Виділення культур проводили на середовищах двох виробників: *Himedia* і *bioMerieux*. Середовище *Himedia* готували з її сухої основи з додаванням яєць в асептичних умовах: 37,24 гр порошку розчиняли в 600 мл дистильованої води (отримували сольовий розчин). Додавали 12 мл гліцерину, кип'ятили до повного розчинення часток. Стерилізували автоклавуванням протягом 15 хв. при 121 °C. Окремо асептично готували 1000 мл цільної емульсії яєчних жовтків: яйця 10—12 (в залежності від величини свіжих дієтичних яєць)мили проточною теплою водою щіткою з милом, занурювали на 30 хвилин у 70 % спирт, обробляли 1—2 хвилини 5 % йодною настоянкою, потім над полум'ям пальника розбивали стерильним піпеткою колбу з битим склом, добре струшували після кожного яйця. До отриманої однорідної яєчної маси додавали 10 мл стерильного 2 % розчину малахітової зелені та 300 мл сольового розчину.

Розливали в стерильні пробірки по 5 мл та залишали у похилому положенні для формування скошу. Потім прогрівали в згортувачі при 85 °C протягом 45 хв.

Середовище *bioMerieux* поступало в формі готовим для використання.

Результати зчитували кожні 3—4 дні.

Чутливість до антибіотиків першого ряду перевіряли, використовуючи набори компаній *Himedia* і *bioMerieux* (табл. 1), згідно наказу № 45 МОЗ України від 06.02.02. На середовищах *bioMerieux* чутливість перевіряли в двох повтореннях, згідно європейському стандарту.

Час і температура культивування відповідала всім вимогам [1, 2].

Результати та їх обговорення

На першому етапі роботи нами досліджувались ростові характеристики середовищ Левенштейна-Енсена. З 266 висіяних зразків на середовищі *bioMerieux* виросло 179 штамів і 102 культури на *Himedia*. Таким чином, відсоток висіаємості склав 66,54 % і 38,34 % на середовищах *bioMerieux* і *Himedia* відповідно. Зарости на середовищі фірми *Himedia* склали 2 %, на середовищі *bioMerieux* — не спостерігалися.

Важливою характеристикою для успішного лікування пацієнтів є часові параметри виявлення збудника і встановлення його чутливості до антибіотиків. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення швид-

Таблиця 1

Склад наборів для вивчення чутливості до антибіотиків *M. tuberculosis* двох виробників *Himedia* і *bioMerieux*

Антибіотики	Виробник		
	bioMerieux		Himedia
	Концентрація, мкг/мл	Концентрація, мкг/мл	
ізоніазид	0,2	1	
етамбутол	2	3	
стрептоміцину сульфат	4	10	
ПАСК	0,5	1	
рифампіцин	20	40	
Пробірка з рН 7,1 без антибіотика	+		+
піразинамід	200		200
Пробірка з рН 5,5 без антибіотика	+		+

Таблиця 2

Швидкість росту штамів на середовищах без антибіотиків

Дні інкубації	Кількість штамів (bioMerieux)	Кількість штамів (Himedia)
15–20	61 (60 %)	1 (1 %)
21–25	30 (29 %)	15 (15 %)
26–35	11 (11 %)	59 (58 %)
36–42	—	22 (22 %)
> 42	—	5 (4 %)
Всього культур:	102 (100 %)	102 (100 %)

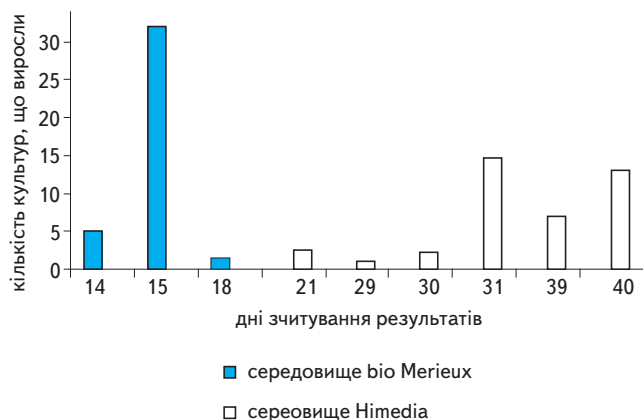


Рис. Швидкість росту штамів на середовищах з антибіотиками

кості росту на середовищах, що порівнювались. Подальші дослідження проводилися між 102 штамми, які вирости тільки на двох середовищах. Як впливає з табл. 2, на середовищі *bioMerieux* протягом 25 днів виросло 89 % всіх культур. За той же період на середовищі *Himedia* зростання було встановлене тільки для 16 % штамів. Основна ж кількість збудників туберкульозу на середовищі *Himedia* виросла в проміжку 26–42 днів.

Після первинного виділення культур МБТ наступним етапом вивчення властивостей збудника є виявлення його чутливості до антибіотиків. На даному етапі для успішного лікування пацієнта важливою є як достовірність результатів, так і швидкість їх отримання.

У зв'язку з цим 52 виділені культури пересівали на середовища з антибіотиками. З 52 штамів на середовищах *Himedia* виросло тільки 37. У інших 15 зростання не було виявлене навіть після продовження термінів інкубації до 42 днів. На середовищах *bioMerieux* показник росту склав 100 %. Виходячи з отриманих даних, подальші порівняння проводили тільки по 37 штамам, що дали ріст на контрольних пробірках двох виробників.

На середовищах *bioMerieux* у 97 % культур ріст на контролі було виявлено вже на 15 добу культивування. І ще 1 результат було зчитано на 18 добу (рис.). Якщо ж розглядати 52 культури, то загальна картина залишається незмінною — 94 % штамів виросли на 15 добу культивування.

На тест-системах фірми *Himedia* основна маса культур (86 %) виросла після 31 дня культивування (рис.).

При зіставленні результатів резистентності на 2-х середовищах було відмічено наступне: у 12 випадках (32 %) результати співпали, у 25 випадках (68 %) результати по деяких антибіотиках відрізнялись. Найбільший відсоток розбіжностей був при тестуванні чутливості до рифампіцину, він склав 32 % від загальної кількості штамів, що тестувались. Причому, на тест-системах фірми *bioMerieux*, ці штами були чутливими до рифампіцину (21 %), а на тест-системах фірми *Himedia* — резистентними (11 %).

Важлива ланка в боротьбі з туберкульозом — це якісні, швидкі лабораторні дослідження. Саме для того, щоб володіти найбільш широкою інформацією по середовищах різних виробників, їх властивостях і можливостях, і проводили дані дослідження.

По результатам нашої роботи готове середовище Льовенштейна-Енсена від компанії *bioMerieux* показало ростові характеристики на 43 % кращі за *Himedia* при первинному висіві, та на 28 % — при визначенні чутливості до антимікобактеріальних препаратів. Тобто, на середовищі *Himedia* у 75 пацієнтів збудник не був виявлений вже на початковій стадії досліджень, а ще у 15 був втрачений під час встановлення антибіотикочутливості. Як показує практика, існує велика вірогідність того, що у даних пацієнтів не буде можливості визначити чутливість збудника до протитуберкульозних препаратів в подальшому, оскільки вони, в результаті лікування, перестануть виділяти збудник туберкульозу, що здатний дати ріст на середовищах Льовенштейна-Енсена.

Інший важливий параметр — це швидкість росту культур МБТ. І наші порівняння засвідчили ріст 60 % штамів

на середовищі *bioMerieux* проти 1 % на середовищі *Himedia* в перші 20 днів культивування, а також 97 % проти 0 % за 15 днів вивчення чутливості до антибіотиків. Можливо, основна причина отримання таких результатів полягає в тому, що в дослідженнях використовувались готові середовища *bioMerieux* (стандартизовані виробником), в той час як середовища *Himedia* готувались в лабораторії з сухої основи. Однак, на даний момент більшість лабораторій України використовує сухе середовище *Himedia*, тому було обраний саме такий вид порівняння.

Необхідно також відзначити, що набір компанії *bioMerieux* містить 6 антибіотиків в двох концентраціях проти 5 в одній концентрації у *Himedia*. Слід зауважити, що до ПАСК на середовищах *bioMerieux* відмічена чутливість 96 % штамів. Додаткові результати по ПАСК, окрім препаратів першого ряду, тільки розширює можливості лікарів при лікуванні хворих.

Таким чином, після проведених порівнянь можна констатувати наступне: при використанні готових середовищ компанії *bioMerieux* отримання остаточного результату (з визначенням чутливості до антибіотиків) можна очікувати в середньому на 30–40 добу досліджень, і при цьому з великою долею вірогідності. При роботі з середовищами *Himedia* було втрачено близько 56 % аналізів, а отримання відповіді в середньому відбувається на 67 добу.

Висновки

1. Використання готових живильних середовищ компанії *bioMerieux* є більш доцільним у порівнянні з середовищами *Himedia* в силу їх кращих ростових (на 43 %) характеристик та чутливості до антимікобактеріальних препаратів (на 28 %).

2. Середовище *bioMerieux* в 2 рази прискорює ріст МБТ в порівнянні з *Himedia*.

3. При роботі з середовищем *bioMerieux* зберігається на 56 % аналізів більше, ніж із середовищем *Himedia*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Литвинова В. И., Мороз А. И. Лабораторная диагностика туберкулеза / Москва, 2001.
2. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002, м. Київ
3. Heifets., Canglosi Y. Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis: a neglected problem at the turn of the century. // Int. J. Tubercle Lung. Dis. — 1999. — Vol. 3 — P. 564–581.
4. Watterson S., Vates M., Drobniewski F. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis // I. clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36. — P. 1969–1973
5. Vuen L.K.W., Leslie D, Coloe P. Bacteriological and molecular analysis of rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Australia // I. clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 3844–3850.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЖИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СЕРЕДОВИЩ ЛЕВЕНШТЕЙНА-ЕНСЕНА ФІРМ-ВИРОБНИКІВ "HIMEDIA" ТА "BIOMERIEUX"

В. П. Мельник, Л. В. Стадник,
В. В. Загородній, К. П. Половко,
М. М. Карнаухова

Резюме

Відомо, що на інтенсивний етап лікування хворих на туберкульоз відводиться 2 місяці, тому часові параметри отримання результатів бактеріологічних досліджень є вкрай важливі для ефективного лікування хворих на туберкульоз.

З 266 проб, що були відібрані у хворих із підозрою на туберкульоз, на середовищах *bioMerieux* виявили ріст мікобактерій у 179 з них, на середовищах *Himedia* — у 102. Середній час появи колоній штамів мікобактерій складав ($20 \pm 1,3$) та ($32 \pm 2,5$) доби на середовищах *bioMerieux* і *Himedia* відповідно. З 50 культур, що порівнювались на чутливість до антимікобактеріальних препаратів, на середовищах *Himedia* не виросло 15 штамів. Середній час, визначення чутливості до антибіотиків склав ($15 \pm 1,2$) та ($33 \pm 2,7$) доби відповідно для середовищ *bioMerieux* і *Himedia*.

Отримані нами дані свідчать про більшу поживну властивість середовищ *bioMerieux*, що дозволяє отримувати остаточні результати в середньому на 15 добу зі збереженням 100 % отриманих культур.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF NUTRITIOUS PROPERTIES OF LOVENSTEIN-JENSEN MEDIA, MANUFACTURED BY HIMEDIA AND BIOMERIEUX

V. P. Melnyk, L. V. Stadnyk, V. V. Zagorodniy,
K. P. Polovko, M. M. Karnaukhova

Summary

It is well known, that the duration of the intensive phase of treatment of tuberculosis patients is 2 months. Therefore, bacteriological tests results awaiting time is extremely important for effective treatment of tuberculosis patients.

Out of 266 samples, taken from the patients, suspected with tuberculosis, 179 gave the growth of mycobacteria in *bioMerieux* medium, and 102 — in the medium manufactured by *Himedia*. Mean time of first mycobacteria colonies growth was $20 \pm 1,3$ and $32 \pm 2,5$ 20 for media, manufactured by *bioMerieux* and *Himedia*, respectively. Out of 50 cultures, that were tested for susceptibility to antibiotics, 15 gave not grow on *Himedia* medium. Mean time of susceptibility test reading was $15 \pm 1,2$ and $33 \pm 2,7$ days for media, manufactured by *bioMerieux* and *Himedia*, respectively.

Data obtained confirm better cultural properties of *bioMerieux* medium, allowing to obtain final results, in average, on the 35th day with preserving of 100 % of isolated cultures.