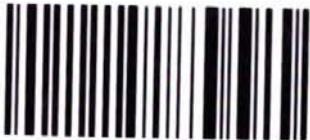


МИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИНСТИТУТ

Библиотека УО ГрГМУ



0000210979

На правах рукописи.

П. С. КУЛЬГОВЕНЯ.

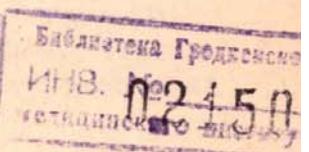
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ  
ТУБЕРКУЛЕЗЕ МЕТОДОМ ВЕРТИКАЛЬНОЙ ДИФФУЗИИ

096 — микробиология.

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертаций на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук.

Минск, 1971



Работа выполнена на кафедре микробиологии (заб. — профессор С. И. Гельберг) Гродненского государственного медицинского института (ректор — доцент Д. А. Маслаков).

Научный руководитель — заведующий кафедрой микробиологии Гродненского государственного медицинского института, доктор медицинских наук, профессор С. И. Гельберг.

Официальные оппоненты:

1. Доктор медицинских наук, профессор М. Н. Ломако.
2. Кандидат медицинских наук, доцент Л. С. Змушко.

Отзыв Белорусского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии.

Автореферат разослан «20 ..... сентября ..... 1971 г.

Защита диссертации состоится «2 ..... ноября ..... 1971 г. на заседании Ученого Совета Минского государственного медицинского института (Минск, Ленинский проспект, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Ученый секретарь Совета —

доцент

Н. И. ЛЕБЕДЕВ.

Химиотерапия является основным методом в комплексном лечении больных туберкулезом. Антибактериальные препараты и их сочетания, применяемые в настоящее время на практике, оказываются обычно высокоэффективными. Однако на пути успешного лечения нередко серьезным препятствием оказывается лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза (м. т.) как первичная, так и вторичная, получившая относительно широкое распространение.

На Всесоюзной конференции по химиотерапии инфекционных заболеваний (1969) было подчеркнуто: «Лекарственная устойчивость микроорганизмов приобретает все большее практическое значение, снижая эффективность наиболее широко применяемых химиотерапевтических средств». Преодоление этой устойчивости является, очевидно, одной из основных задач в борьбе с инфекционными заболеваниями и в частности в борьбе с туберкулезом. В указанном плане в числе важнейших направлений на упомянутой конференции рекомендованы исследования по усовершенствованию и разработке методов определения и оценки устойчивости бактерий к химиотерапевтическим средствам.

С момента внедрения антибактериальной терапии туберкулеза в широкую практику определение чувствительности м. т. к туберкулостатическим препаратам является неотъемлемым звеном в диагностике заболевания и способствует проведению рациональной и эффективной химиотерапии. Оно необходимо и для изучения некоторых эпидемиологических особенностей данного заболевания.

Для определения чувствительности м. т. к антибактериальным препаратам был предложен ряд методов: 1) абсолютных концентраций, 2) относительной устойчивости и 3) пропорций. Последний имеет больше всего сторонников (Бартманн, Люккези, Армстронг, Централго), как это было показано на XVIII Международной конференции по туберкулезу (Мюнхен, 1965), так как позволяет установить соотношение чувствительных и устойчивых особей в выделенной культуре, которая,

как правило, является гетерогенной (А. А. Клебанова, 1958; Б. Я. Стукарова, 1958; А. Кребс, 1961 и 1964; Канетти, Рист и Гроссе, 1963 и др.). Однако сложность и громоздкость метода, затрата значительного времени и большого количества среды затрудняют его широкое применение (Г. К. Ковалев, 1967; А. И. Қаграманов, 1969; Е. Н. Езерская, 1970 и др.). Метод относительной устойчивости, т. е. параллельного определения соотношений между чувствительными и устойчивыми микробактериями в исследуемом штамме и в стандартной культуре ( $H_37Rv$ ), также не лишен, в известной мере, этого недостатка и применяется редко. На практике чаще пользуются методом абсолютных концентраций, особенно это касается широкой сети лабораторий нашей страны. Он менее трудоемкий, но не лишен некоторых недостатков. Так, четко не улавливается грань между слабой устойчивостью и чувствительностью культуры к препаратам. Имеет место частичная инактивация некоторых антибактериальных препаратов при термическом свертывании питательной среды. К началу наших исследований метод абсолютных концентраций проводился в СССР по методике, рекомендованной МНИИТ (1966), однако в дальнейшем потребовалось его заметное упрощение, чтобы приблизить его к широкой практике (решение Всесоюзного симпозиума в Черновцах, 1969).

Существенным недостатком, как видно из изложенного, всех упомянутых способов является недостаточная доступность их для повсеместного применения, особенно в маломощных лабораториях, ввиду сложности и громоздкости. Назрела задача изыскания более простого, доступного и вместе с тем достоверного способа определения лекарственной устойчивости м. т. В этом смысле наше внимание привлек метод вертикальной диффузии по Тинне-Шмиделю, углубленное испытание и разработка которого были рекомендованы на XVIII Международной конференции по туберкулезу. В СССР он мало изучен. Данный способ используется также для определения биологически активной концентрации ГИНК в крови больных туберкулезом, т. е. для выявления степени инактивации их, что имеет важное значение при химиотерапии, так как препараты ГИНК занимают ведущее место в лечении туберкулеза.

В задачу наших исследований входило:

1) Упростить и улучшить метод вертикальной диффузии для определения чувствительности м. т. к антибактериальным препаратам первого ряда и изучить достоверность данной модификации, выявить преимущества ее путем сравнения с апро-

бированными методами абсолютных концентраций и пропорций.

2) Изучить пригодность метода вертикальной диффузии в разработанной модификации для определения чувствительности м. т. разных типов и в особенности атипичных микобактерий, а также для установления характера двойной устойчивости м. т.

3) Дать оценку методу вертикальной диффузии по определению концентрации биологически активной фракции тубазида в крови больных туберкулезом и в органах животных при экспериментальной химиотерапии туберкулеза. Одновременно разработать более упрощенную и безопасную модификацию данного способа, предназначенную для широкой практики.

Наши наблюдения над способом вертикальной диффузии для определения чувствительности м. т. к антибактериальным препаратам первого ряда сводились прежде всего к внесению некоторых корректировок — усовершенствований и упрощений в методику, предложенную Тинне-Шмидель. Наиболее существенными явились следующие изменения: 1) применена яично-молочно-солевая среда Гельберга, которая по эффективности не уступает среде Левенштейна-Иенсена, но имеет ряд преимуществ на практике; 2) обеспечено получение упрощенным способом косой яичной питательной среды одинаковой толщины со стандартным размером посевной поверхности; 3) изучена и установлена оптимальная величина посевной дозы культуры м. т., подлежащей испытанию, и рекомендован точный способ нанесения и распределения взвеси на поверхность среды и режим выращивания; 4) уточнена шкала учета результатов испытания и сроков чтения последних применительно к измененным условиям постановки опыта.

Определение лекарственной чувствительности м. т. к препаратам первого ряда методом вертикальной диффузии нами проводилось следующим образом. В стандартные бактериологические пробирки (150мм x 15 мм) наливали по 7 мл питательной среды Гельберга и свертывали при температуре 90°C 50–60 мин. Пробирки при этом укладывались в наклонном положении так, чтобы скошенная поверхность была одинаковой длины (110 мм), тем самым обеспечивалась равномерная толщина слоя питательной среды. Взвесь из свежевыделенной культуры м. т. готовили в физиологическом растворе поваренной соли по оптическому стандарту 10 ед. мутности. Сразу же после изготовления ее засевали по одной стандартной петле (3 мм в диаметре, в среднем 250–300 тыс. микробных особей на 4 пробирки; при этом втирали ее равномерно по всей поверхности среды. К трем из этих пробирок пипеткой, осторож-

Тесты для установления степени лекарственной чувствительности культур микобактерий туберкулеза при разных методах определения.

Степень лекарственной чувствительности культуры микобактерий туберкулеза	Метод вертикальной диффузии		Метод абсолютных концентраций	Метод пропорций
	зона задержки роста в мм	ориентировочное содержание химиопрепарата в мкг или ед.	рост на среде, содержащей химиопрепарат в мкг/мл или ед/мл	процентное содержание колоний на среде с химиопрепаратором к числу их в контрольном посеве
1	2	3	4	5

I. Тубазид

Чувствительная	> 65 56—65	<0,25 0,025 до 0,05	нет роста	<10% при 0,1 мкг/мл <1% при 0,2 мкг/мл
Относительно чувствительная	36—55	>0,05 до 0,2	—	—
Слабо устойчивая	16—35	>0,2 до 0,8	1	10% и выше при 0,1 мкг/мл
Устойчивая	8—15	>0,8 до 10	1,5	1% и выше при 0,2 мкг/мл
Высоко устойчивая	0—7	>10	15 и 25	Рост при 1 мкг/мл

II. Стреотомицин

Чувствительная	> 25	<5	на 5 мкг/мл и выше нет роста	<50% при 2 ед/мл <1% при 4 ед/мл
Слабо устойчивая	18—25	>5 до 10	5, 10	50% при 2 ед/мл
Устойчивая	11—17	>10 до 50	5, 10, 50	1% и выше при 4 ед/мл
Высоко устойчивая	0—10	>50	5, 10, 50, 100 и выше	Рост при 10 ед/мл

III. ПАСК

Чувствительная	> 60	<0,1	на 5 мкг/мл нет роста	<10% при 0,25 мкг/мл <1% при 0,5 мкг/мл
Относительно чувствительная	51—60 41—50	0,1 до 0,5 >0,5 до 1,0	—	—
Слабо устойчивая	21—40	>1,0 до 5,0	5	10% и выше при 0,25 мкг/мл
Устойчивая	11—20	>5 до 10	10	1% и выше при 0,5 мкг/мл
Высоко устойчивая	0—10	>10 до 25	25	Рост при 1 мкг/мл

но, не смачивая засеянной поверхности, прибавляли по 0,5 мл следующих препаратов: в первую — раствор тубазида 20 мкг/мл; во вторую — дигидрострептомицин — 1000 ед/мл. и в третью — ПАСК — 100 мкг/мл; четвертая (контрольная) — не содержала химиопрепарата.

Пробирки инкубировались при 37° в строго вертикальном положении. В процессе диффузии антибактериальных препаратов концентрация их в питательной среде неодинакова; она падает по мере удаления вверх от раствора химиопрепарата. В зависимости от степени чувствительности испытуемого штамма к препарату на поверхности среды обнаруживается зона задержки роста различных размеров (от 0 до полного отсутствия роста по всей поверхности). Спустя 28 дней после инкубирования длина этой зоны измеряется от верхнего уровня раствора химиопрепарата до линии роста м. т. сплошным газоном и по ее размерам устанавливается степень лекарственной чувствительности испытуемого штамма. На основании экспериментальных данных Шмидель предложил шкалу для учета результатов определения лекарственной чувствительности м. т. в зависимости от размеров зоны задержки роста. Мы ее видоизменили и уточнили применительно к нашей методике посева и среде Гельберга, использованной нами (табл. № 1, колонки 1, 2, 3).

Предстояла далее обстоятельная апробация способа для практики. С этой целью в первой серии исследований нами составлен метод вертикальной диффузии (в описанной модификации МНИИТ, 1966). Сравнительное изучение обоих указанных методов было проведено непрямым способом, т. е. путем исследования 310 свежевыделенных культур м. т., и прямым способом — при испытании 105 проб бактериоскопически положительного патологического материала, полученного от больных туберкулезом.

Для выделения указанных культур было использовано 1535 проб различного патологического материала (мокроты при разных формах легочного туберкулеза — 920, промывных вод бронхов — 375, прочего материала — моча, спинномозговая жидкость — 240), который обрабатывали раствором серной кислоты, высевали на среду Гельберга и по мере выделения культур систематически испытывали. При этом следует подчеркнуть, что эти штаммы обладали различной степенью чувствительности к антибактериальным препаратам первого ряда и их сочетаниям: почти половина из них — 154 (49,7%) была устойчивой в разной степени к тубазиду, стрептомицину

и ПАСК, чаще всего к одному из этих препаратов (93), реже к двум (48) и небольшая часть (13) — к трем препаратам.

Сравнение полученных результатов проводилось следующим образом: сопоставлялись объективные показатели, выявленные при каждом способе, и установленная по ним степень чувствительности культуры, которая обозначалась как чувствительная, относительно чувствительная, слабо устойчивая, устойчивая или высоко устойчивая к данному препарату (табл. № 1, колонки 1, 2, 3, 4).

Суммируя результаты проведенных исследований (табл. № 2), мы подсчитали количество совпадений, неполных совпадений и расхождений полученных результатов при обоих сравниваемых способах. При этом расхождением результатов считали те случаи, когда культура по одному способу определялась как чувствительная, а по другому — устойчивая в той или иной степени. Неполным совпадением результатов считали, когда выявлялась неодинаковая степень устойчивости, например, по одному способу культура оказывалась устойчивой, а по другому — высоко устойчивой и т. д.

Таблица № 2

Сравнительные результаты параллельного определения лекарственной чувствительности м. т. способами вертикальной диффузии и абсолютных концентраций.

Антибактериальные препараты	Количество исследованных культур	Совпадение результатов	Неполное совпадение результатов	Расхождение результатов
Стрептомицин		297 (95,8%)	2 (0,65%)	11 (3,55%)
Тубазид	310	179 (90,0%)	23 (7,4%)	8 (2,6%)
ПАСК		301 (97,15%)	7 (2,2%)	2 (0,65%)

Из таблицы 2 видно, что при параллельном определении степени чувствительности 310 штаммов м. т. к стрептомицину, тубазиду и ПАСК двумя названными способами получены полностью совпадающие результаты соответственно у 95,8%; 90% и 97,15% испытанных культур. Различия в результатах к тубазиду (см. табл. № 2) при статистической обработке по методу ХИ-квадрат расцениваются как существенные ( $p < 0,01$ ).

Аналогичные результаты применения прямого определения чувствительности м. т., т. е. при испытании прямым способом 105 проб патологического материала: полное совпадение — в

89,5% — к тубазиду, в 94,2% — к стрептомицину и в 95,2% — к ПАСК.

Как видно, анализ материалов обеих серий опытов (непрямым и прямым способом) выявил незначительный процент расхождений, но в части случаев отмечено неполное совпадение результатов. Таких неполных совпадений весьма немного в материалах испытания к стрептомицину (0,65% и 1%) и ПАСК (2,2% и 2,9%), но при сопоставлении результатов исследования чувствительности к тубазиду процент их был несколько выше: 7,4% культур и 8,2% у м. т. в пробах патологического материала. Одновременно установлено, что степень устойчивости, выявляемая методом вертикальной диффузии в этих случаях неполного совпадения результатов, обычно была более выраженной, чем по показателям способа абсолютных концентраций.

Учитывая последние данные, наши дальнейшие исследования велись в двух направлениях.

В специально проведенном опыте с использованием 385 вновь выделенных культур м. т., обладавших разнообразным характером и степенью чувствительности к химиопрепаратам первого ряда и их сочетаниям, удалось показать, что при внесении небольшого корректива в методику способа вертикальной диффузии, а именно повышении концентрации раствора тубазида при определении до 30 мкг/мл вместо 20 мкг/мл, получаются несколько более умеренные показатели резистентности испытуемых культур (около 9%). Таким путем можно, следовательно, добиться при параллельном исследовании культур м. т. еще большего процента полного совпадения результатов испытания обоими сравниваемыми способами.

Прежде чем внести указанные изменения в методику способа вертикальной диффузии, мы решили установить какой же из сравниваемых способов является более достоверным. С этой целью оба они сопоставлены с методом пропорций, получившим наиболее широкое признание среди исследователей.

В новый обширный опыт сравнительного определения чувствительности культур м. т. параллельно тремя способами (вертикальной диффузии, абсолютных концентраций и пропорций) было включено 325 свежевыделенных культур м. т., более половины (168) из которых составили устойчивые в той или иной степени к препаратам первого ряда, чаще всего к одному из них (92), несколько реже к двум (61) и 15 — к трем препаратам. Культуры исследовались методами вертикальной диффузии и абсолютных концентраций по указанным выше методикам, что касается способа пропорций, то строго придер-

живались методики, рекомендованной Канетти, Рист и Гроссе, 1963. Показатели и оценки степени чувствительности культуры при этом способе представлены в табл. № 1 (колонки 1 и 5). Сводные результаты данной серии опытов представлены в табл. 3.

Из таблицы № 3 видно, что, несмотря на различные критерии, которые положены в основу определения чувствительности м. т. при каждом из трех использованных методов, полученные результаты исследования оказались довольно близкими: полное совпадение чувствительности к стрептомицину выявлено в 91,4% культур, к тубазиду — в 87% и к ПАСК — в 97,5%.

При этом выявлено, что метод вертикальной диффузии по результатам особенно близок к общепризнанному наиболее достоверному методу пропорций; это подтверждено и статистически ( $p=0,1$ ). Таким образом, изучаемый способ вертикальной диффузии обладает и в данном отношении известным преимуществом перед способом абсолютных концентраций. В самом деле, полное совпадение результатов при определении чувствительности м. т. методом вертикальной диффузии и способом пропорций получено в очень высоком проценте случаев: в 97,2% — к стрептомицину, в 94,6% — к тубазиду и в 97,5% — к ПАСК. Между тем при сопоставлении метода абсолютных концентраций и способа пропорций совпадение результатов обнаружено несколько реже: к стрептомицину — в 91,4%, к тубазиду — 89,2% и только к ПАСК — 98,2%.

Хотя частота совпадения результатов ниже, чем полученная при сопоставлении метода вертикальной диффузии со способом пропорций (см. табл. 3), однако и здесь процент совпадения довольно высок. Учитывая эти данные, можно считать, что настойчиво проводимые в последнее время мероприятия по унификации микробиологического исследования при туберкулезе (в частности определения чувствительности м. т. к антибактериальным препаратам) не будут нарушены при внедрении в практику метода вертикальной диффузии в нашей модификации. Гарантией этому является почти полное совпадение его с данными метода пропорций и сравнительно высокий процент совпадения результатов со способом абсолютных концентраций.

Наши данные по указанному вопросу согласуются с результатами довольно ограниченного числа работ других авторов (Кох, 1964; Калих, Герлофф, Кребс и Шмидель, 1964; Э. Р. Финн, 1966; А. В. Белоусов, 1968 и В. Р. Харье и Х. О. Йигус, 1968).

Таблица № 3

Сводные сравнительные данные определения лекарственной устойчивости культур микобактерий туберкулеза тремя методами

Антибактериаль- ные препараты	Количе- ство ис- следован- ных куль- тур	Результат	3-х способов	Сопоставление данных		
				метода вертикальной диффузии со способом пропорций	с методом або- лютных концен- траций	метода абсолют- ных концентра- ций со способом пропорций
Стрепто- мицин Тубазид ПАСК	325	Совпадение	297 (91,4%)	316 (97,2%)	303 (93,2%)	297 (91,4%)
			283 (87,0%)	308 (94,6%)	286 (88,0%)	290 (89,2%)
			317 (97,5%)	317 (97,5%)	319 (98,2%)	319 (98,2%)
Стрепто- мицин Тубазид ПАСК	325	Неполное Совпадение	7 ( 2,2%)	4 ( 1,2%)	3 ( 0,9%)	10 ( 3,0%)
			12 ( 3,8%)	12 ( 3,8%)	27 ( 8,2%)	26 ( 8,0%)
			7 ( 2,2%)	7 ( 2,2%)	3 ( 0,9%)	3 ( 0,9%)
Стрепто- мицин Тубазид ПАСК	325	Расхождение	21 ( 6,4%)	5 ( 1,6%)	19 ( 5,9%)	18 ( 5,6%)
			30 ( 9,2%)	5 ( 1,6%)	12 ( 3,8%)	9 ( 2,8%)
			3 ( 0,9%)	1 ( 0,3%)	3 ( 0,9%)	3 ( 0,9%)

 $p = 0,01$  $p = 0,1$  $p < 0,01$  $p < 0,01$

Дальнейшими исследованиями была испытана пригодность метода вертикальной диффузии для определения характера резистентности культур м. т. одновременно к двум туберкулостатическим препаратам (истинная, ложная, двойная устойчивость). С этой целью изучено 30 культур м. т. с двойной устойчивостью параллельно двумя способами: абсолютных концентраций и вертикальной диффузии. Методика постановки опытов была специально разработана нами. Результаты этого определения обоими методами совпали во всех случаях и оказались полностью идентичными: 20 культур состояли из м. т. с истинной, 8 — с ложной устойчивостью и 2 — с двойной. Таким образом, для расшифровки характера двойной устойчивости целесообразно применить простую и доступную методику, основанную на принципе способа вертикальной диффузии, вместо сложного трудоемкого определения по инструкции МНИИТ (1966) методом абсолютных концентраций.

Заслуживает внимания вопрос о возможности использования метода вертикальной диффузии для определения чувствительности атипичных микобактерий к туберкулостатическим препаратам первого ряда, так как они растут быстрее, чем типичные м. т., а некоторые штаммы даже выделены в группу быстрорастущих. По мнению некоторых исследователей (Шмидель, 1958 и 1966; Калих, Герлофф, Кребс и Шмидель, 1964) метод вертикальной диффузии менее пригоден при определении их чувствительности, ввиду несоответствия между быстрой диффузии препарата в среду и скоростью роста микробов.

Для решения данного вопроса была определена чувствительность 33 штаммов атипичных микобактерий параллельно методами вертикальной диффузии и абсолютных концентраций. В подавляющем числе случаев получено полное совпадение результатов. Границы зоны задержки роста атипичных микобактерий при методе вертикальной диффузии были весьма четкими, если штамм оказывался чувствительным к данному препарату.

Далее оказалось, что метод вертикальной диффузии вполне пригоден также и для определения лекарственной устойчивости культур м. т. бычьего и птичьего типов, отличающихся по культуральным свойствам и прежде всего по быстроте роста от м. т. человеческого типа, которыми мы оперировали в предшествующих исследованиях.

Проведенные исследования выявили положительные стороны метода вертикальной диффузии для определения чув-

ствительности м. т. к антибактериальным препаратам. Все они проведены на яично-молочно-солевой среде Гельберга, хотя ВОЗ рекомендует среду Левенштейна-Иенсена. Поэтому нами была специально изучена сравнительная эффективность сред Гельберга и Левенштейна-Иенсена для целей выделения культур м. т. из бактериоскопически отрицательного патологического материала. Каждую из 745 испытанных проб исследуемого материала сеяли на 2 пробирки со средой Гельберга и одновременно на 2 пробирки — Левенштейна-Иенсена. Положительные результаты были получены в 93 случаях, только на среде Гельберга — в 11 случаях, только на среде Левенштейна-Иенсена — в 10 случаях, одновременно на двух средах — в 72 случаях. Из 72 положительных результатов, полученных параллельно на двух средах, одинаковый по степени интенсивности рост выявлен в 63 случаях, в 5 — более обильный на среде Гельберга и в 4 — на среде Левенштейна-Иенсена.

В следующем опыте было проведено параллельное испытание сред Гельберга и Левенштейна-Иенсена для определения лекарственной чувствительности культур м. т. к туберкулостатическим препаратам первого ряда методом вертикальной диффузии (100 культур). Зоны задержки роста на обеих средах совпали при определении чувствительности к тубазиду у 80 культур, к стрептомицину — у 65, а к ПАСК — у 88. При выявлении неодинаковых зон задержки роста у некоторых культур эти отличия оказывались настолько небольшими, что, как правило, не отразились на результатах определения степени чувствительности м. т.

Проведенные исследования показали, что среда Гельберга с успехом может применяться при методе вертикальной диффузии. Она практически не уступает среде Левенштейна-Иенсена и для целей выделения культуры м. т. из патологического материала.

\* \* \*

Другое направление в изучении метода вертикальной диффузии, как было указано, сводилось к изучению и модификации его для целей определения биологически активного тубазида в крови больных при химиотерапии туберкулеза.

Пользуясь методикой, предложенной Шмидель, Гроссе и Канетти, несколько модифицированной нами (пользование средой Гельберга, приготовление ее со стандартной поверхностью, техника посева и дозировка, учет результатов), мы прежде всего сопоставили его со способом серийных разведений (по инструкции МНИИТ, 1966). Параллельно обоими способами определена концентрация тубазида у 102 больных. Совпа-

дение результатов выявлено в 96,1% исследованных случаев и при статистической обработке эти различия расцениваются как несущественные, случайные ( $p=0,9$ ). Таким образом, простой, экономичный и доступный метод вертикальной диффузии дает вполне достоверные результаты, мало отличающиеся от получаемых при помощи сложного, трудоемкого и небезопасного способа серийных разведений.

Затем на обширном клиническом материале — 1726 больных легочным туберкулезом было показано, что по группам инактиваторов: сильных — 42,4%, средних — 27,1% и слабых — 30,5% — наши данные полностью совпали с материалами других авторов, полученными у аналогичных больных с помощью разных методов исследования (Шмидель, 1960; Иваински и Кауфманн, 1960; В. Д. Гольдштейн, Р. А. Иоффе и Е. С. Пономарева, 1970 и др.).

Следует подчеркнуть, что испытуемые сыворотки крови больных могут сохраняться в рефрижераторе (+3—5°) свыше 3-х месяцев; по нашим данным, тубазид в них не разрушается. Это важно для практической работы в небольших лабораториях.

Проведенное в нашем институте сравнительное испытание двух способов определения типа инактивации ГИНК: микробиологического — по указанной методике вертикальной диффузии в крови и химического — в моче дало аналогичные результаты (И. С. Гельберг, С. Л. Романюк, Н. С. Кенда и И. А. Русак, 1967).

В специальных опытах на белых мышах было установлено также, что метод вертикальной диффузии пригоден для определения концентрации и динамики содержания тубазида в органах этих экспериментальных животных. Таким образом он может оказаться полезным и при изучении вопросов химиотерапии туберкулеза в эксперименте (дозировка, схемы применения антибактериальных препаратов и т. д.).

При определении концентрации тубазида в крови методом вертикальной диффузии мы пользовались, как и большинство других авторов, чувствительной к данному химиопрепарату и высоковирулентной культурой  $H_{37}Rv$  определенного срока выращивания (12—15 дней). Поставив перед собой задачу еще более упростить методику указанного способа и полностью обезопасить его применение, нами были испытаны взамен  $H_{37}Rv$  маловирулентная культура «Академия», БЦЖ-888 и глютаматная сухая вакцина БЦЖ. Следует отметить, что при использовании последней заметно упрощается постановка опыта, так как нет необходимости систематически выращивать культуру микобактерий.

Предварительно были опытным путем составлены кривые, отражающие зависимость размеров зоны задержки роста названных культур м. т. и вакцины БЦЖ от количественного содержания (концентрации) химиопрепарата в среде при стандартных условиях пользования методом вертикальной диффузии.

Что касается самой методики постановки определения концентрации тубазида с помощью новых культур («Академия» и БЦЖ-888), то она ничем не отличалась от методики при использовании штамма Н<sub>37</sub>Рв.

**Методика наша следующая:** взвесь из чувствительной к ГИНК культуры микобактерий Н<sub>37</sub>Рв («Академия» или БЦЖ-888) определенного срока выращивания (10—20 дней) готовили строго по оптическому стандарту 10 ед. мутности и засевали по одной стандартной петле (3 мм в диаметре) на пробирки со средой Гельберга. Кровь брали у больных через 5 часов после приема тест-дозы тубазида (5 мг на 1 кг веса, в среднем 0,3). На дно пробирки, засеянной одной из указанных культур, наливали по 0,5 мл испытуемой сыворотки. Величина зоны задержки роста определялась спустя 12—15—18 дней (в зависимости от штамма м. т., так как они отличаются скоростью роста) нахождения пробирок в термостате в строго вертикальном положении. Пользуясь составленной нами опытным путем кривой (конкретно для каждой культуры: Н<sub>37</sub>Рв, «Академия», БЦЖ-888), отражающей соотношение между размером зоны задержки роста и концентрацией химиопрепарата (периодически уточнявшейся), мы устанавливали количество тубазида в исследуемой сыворотке, а следовательно степень инактивации его в организме (сильная—0—0,39 мкг/мл; средняя—0,4—0,79 мкг/мл и слабая—0,8 мкг/мл и выше).

**Сухая же глютаматная вакцина БЦЖ** применена следующим образом: в ампулу, содержащую 1 мг сухой глютаматной вакцины БЦЖ, добавляли 0,2 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали и две стандартные петли равномерной взвеси засевали на одну пробирку со средой Гельберга. Учет результатов проводился через 15—20 дней. При этом взвесь м. т. оказывалась высоко гомогенной и стандартной, что является важным условием достоверности исследования и не всегда достигалось при пользовании культурами.

Результаты сравнительного параллельного определения тубазида в крови при использовании культуры Н<sub>37</sub>Рв и штаммов «Академия», БЦЖ-888 и сухой глютаматной вакцины БЦЖ у больших групп больных представлены в табл. 4.

Таблица № 4

Сравнительное определение концентрации тубазида методом вертикальной диффузии при использовании разных культур м. т. и сухой вакцины БЦЖ

Используемый штамм	К-во исследований	Степень инактивации			Совпадение результатов
		сильная	средняя	слабая	
H <sub>37</sub> Рв «Академия»	267	118(44%) 115(43%)	26(10%) 27(10,1%)	123(46%) 125(46,9%)	262(98,1%) p=0,98
H <sub>37</sub> Рв БЦЖ-888	209	83(40%) 77(36,8%)	35(17%) 34(16,2%)	91(43%) 98(47%)	203(97,1%) p=0,8
H <sub>37</sub> Рв Сухая вакцина БЦЖ	223	80(36%) 85(38,1%)	26(11,5%) 25(11,2%)	117(52,5%) 113(50,7%)	218(97,8%) p=0,9

Из таблицы 4 видно, что с успехом можно использовать штаммы: «Академия», БЦЖ-888 и сухую глютаматную вакцину БЦЖ, совпадение результатов получено соответственно в 98,1%; 97,1% и 97,8% случаев. Предложенную модификацию с использованием сухой глютаматной вакцины БЦЖ следует считать наиболее подходящей и заслуживающей внедрения в практику.

\* \* \*

В заключение следует отметить, что метод вертикальной диффузии (в нашей модификации) применен в условиях практической лаборатории Гродненского облтубдиспансера и гортубдиспансера (Й. К. Заневский и С. Б. Позняк) для определения лекарственной чувствительности м. т. к препаратам первого ряда. Параллельно определена лекарственная устойчивость 106 штаммов м. т. методом вертикальной диффузии и способом абсолютных концентраций (по методике Всесоюзного симпозиума в Черновцах, 1969). Совпадение результатов получено к стрептомицину в 93,4%, к тубазиду в 92,4% и к ПАСК в 94,3%. Полученные данные близки к результатам, представленным нами. Таким образом, вновь подтверждено, что метод вертикальной диффузии вполне достоверен, он сведен по результатам со способом абсолютных концентраций и в новой упрощенной модификации.

В итоге проведенных исследований мы считаем возможным рекомендовать метод вертикальной диффузии в наших модификациях для целей определения лекарственной чувствительности м. т. к препаратам первого ряда, а также выявления уровня биологически активного тубазида в сыворотке крови больных туберкулезом и в органах животных при экспериментальной химиотерапии этого заболевания.

## ВЫВОДЫ

1) Метод вертикальной диффузии в нашей модификации по результатам параллельного испытания 521 объекта (культуры м. т., патологический материал от больных туберкулезом) оказался весьма сходным со способом абсолютных концентраций, примененным по методике МНИИТ (1966) и более упрощенной—Всесоюзного симпозиума (1969).

2) Сопоставление указанного способа вертикальной диффузии с методами абсолютных концентраций и пропорций (на 325 культурах м. т.) обнаружило наиболее значительное совпадение результатов (94,6% к тубазиду и 97,2%—97,5% к стрептомицину, ПАСК) с полученными при методе пропорций, который признан высокодостоверным, так как полнее отражает соотношение чувствительных и устойчивых особей в свежевыделенной гетерогенной культуре м. т.

3) Метод вертикальной диффузии оказался вполне пригодным для определения лекарственной резистентности культур м. т. бычьего и птичьего типов, а также атипичных микобактерий, включая быстрорастущие на яичных питательных средах.

4) Способ вертикальной диффузии позволяет расшифровать характер устойчивости культур м. т. к двум антибактериальным препаратам, причем по достоверности результатов он не отличается от полученных при помощи более сложного и громоздкого метода абсолютных концентраций, рекомендованного МНИИТ (1966).

5) Выявленная высокая достоверность и практическая пригодность метода вертикальной диффузии сочетается с рядом существенных преимуществ, а именно: а) простота и доступность для применения в небольших лабораториях, б) потребность минимального количества среды и времени при выполнении, в) устранение возможной термической инактивации химиопрепаратов, г) установление дополнительной категории относительно чувствительных культур к тубазиду и ПАСК. Одновременно использование данного способа, мало отличающегося по результатам от ранее апробированных, не нарушает ме-

роприятия по унификации методов определения устойчивости м. т. при туберкулезе.

6) Яично-молочно-солевая среда Гельберга — существенный компонент видоизмененного нами способа вертикальной диффузии, наряду с достоинствами, касающимися технологии ее приготовления, по эффективности не уступала среде Левенштейна-Иенсена, рекомендованной ВОЗ.

7) Метод вертикальной диффузии Шмидель, Гроссе и Канетти, видоизмененный и апробированный нами для установления активной концентрации тубазида в сыворотке крови больных при химиотерапии туберкулеза, прост и доступен. При сравнительном испытании его (102 сыворотки) со сложным, трудоемким и небезопасным способом серийных разведений получено почти полное совпадение результатов, а на обширном материале (1726 исследований) установлено одинаковое процентное соотношение групп инактиваторов (слабых, средних и сильных) как и в данных других исследователей при разных способах определения.

8) Предложенные нами модификации упомянутого способа вертикальной диффузии предусматривают в целях безопасности замену вирулентной культуры  $H_{37}Rv$  маловирулентным штаммом «Академия» или БЦЖ, они сохраняют при этом в полной мере достоверность получаемых результатов исследования (467 параллельных испытаний). Наиболее же предпочтительным следует считать детально разработанный и проверенный вариант, основанный на применении глютаматной вакцины БЦЖ. Полная безвредность и достоверность его сочетается со значительным упрощением и доступностью для самого широкого применения.

9) Метод вертикальной диффузии пригоден и для определения концентрации и динамики содержания тубазида в органах экспериментальных животных, что может оказаться ценным при решении некоторых вопросов экспериментальной химиотерапии.

**Список опубликованных работ по теме  
диссертации:**

1. О применении метода вертикальной диффузии для определения лекарственной устойчивости туберкулезных микобактерий. Материалы конференции студенческих научных обществ медицинских и фармацевтических институтов РСФСР, посвященной вопросам диагностики, лечения и профилактики туберкулеза.  
Москва, 1966, 49—51.
2. Метод вертикальной диффузии для определения чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам и концентрации тубазида в сыворотке крови больных туберкулезом. Материалы VII научной сессии Гродненского медицинского института.  
Минск, 1968, 219—220.
3. Метод вертикальной диффузии для определения лекарственной устойчивости туберкулезных микобактерий и содержания биологически активного ГИНК в сыворотке крови больных. Материалы второго съезда фтизиатров Белорусской ССР.  
Минск, 1968, 186—188.
4. Сравнительное изучение способов определения лекарственной чувствительности туберкулезных микобактерий. Здравоохранение Белоруссии, 1969, № 11, 28—31.
5. Метод вертикальной диффузии для определения концентрации препаратов ГИНК в сыворотке крови больных при терапии туберкулеза. Тезисы докладов областной научно-практической конференции фтизиатров.  
Гродно, 1969, 45—47.
6. Модификация метода вертикальной диффузии для определения биологически активного ГИНК в сыворотке крови больных.  
Там же, 42—44.
7. Микробиологические исследования в комплексе противотуберкулезных мероприятий. Там же, 31—34 (соавторы С. И. Гельберг и С. Б. Позняк).
8. Сравнительная оценка питательных сред Гельберга и Левенштейна-Иенсена для выделения микобактерий туберкулеза из бактероскопически отрицательного патологического материала.  
Здравоохранение Белоруссии, 1970, № 2, 60—61.
9. Метод вертикальной диффузии для определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Материалы республиканской межвузовской конференции молодых ученых по естественным наукам.  
Минск, 1970, 108—108.
10. Микробиологические исследования при туберкулезе методом вертикальной диффузии. Материалы VIII научной сессии Гродненского медицинского института.  
Минск, 1971, 238—240. (Соавтор С. И. Гельберг).
11. К методике определения лекарственной устойчивости туберкулезных микобактерий.  
Там же, 247—249.
12. Метод вертикальной диффузии для определения лекарственной чувствительности туберкулезных микобактерий и концентрации биологически активного тубазида в сыворотке крови больных туберкулезом (соавтор С. И. Гельберг). Журнал гигиены, микробиологии, эпидемиологии и иммунологии (Прага), 1970 (в печати).