

I. Зальні положення

1. Ця Інструкція визначає детальний зміст та методику виконання мікробіологічних досліджень в лабораторіях, що здійснюють мікробіологічну діагностику туберкульозу, спрямованої на підвищення ефективності лікувально-діагностичного процесу, зменшення невиправданих витрат.

2. Інструкція обов'язкова для виконання та поширюється на заклади охорони здоров'я державної та комунальної форм власності, які забезпечують забір, транспортування матеріалу та проведення мікробіологічних досліджень з метою діагностики туберкульозу.

3. В Інструкції терміни вживаються у таких значеннях:

мікроскопічне дослідження мазка мокротиння для виявлення КСБ проводиться з метою виявлення найбільш небезпечних, в епідеміологічному сенсі пацієнтів, хворих на туберкульоз легенів. Переваги мікроскопії, що полягають в швидкості отримання результату, відносній простоті, доступності дослідження і економічній ефективності, роблять її незамінною для виявлення більшості пацієнтів, хворих на туберкульоз легенів;

пряма мікроскопія - метод дослідження з необробленого діагностичного матеріалу або його осаду, якщо матеріал рідкий;

мікроскопія мазка з осаду - матеріал, що підготовлений для культурального дослідження після розрідження, деконтамінації, концентрації і ресуспендування;

кислотійкі організми, у тому числі *M. tuberculosis* – організми, що зберігають забарвлення карболовим фуксином після знебарвлення розчином сірчаної кислоти або солянокислого спирту; метод NALC-NaOH є методом

деконтамінації, оскільки застосовується при посівах на щільні і в рідкі живильні середовища, у тому числі в автоматизовані системи детекції мікобактерій. При правильному використанні цей метод дозволяє отримати більше позитивних результатів культурального дослідження, ніж будь-який інший метод;

флуоресцентна мікроскопія – оптичне дослідження об'єктів, забарвлених спеціальними барвниками (флуорохромами), що світяться під дією ультрафіолетових променів

молекулярно-генетичний метод це виявлення відмінностей в генетичній структурі чутливих і стійких штамів шляхом визначення нуклеотидних послідовностей генів, мутації, що призводять до виникнення резистентності *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів;

тест медикаментозної чутливості це визначення спектру чутливості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів;

посів - метод виділення культури мікобактерій туберкульозу з біологічного матеріалу на щільних та рідких поживних середовищах;

внутрішній контроль якості бактеріологічних досліджень - ефективний і систематичний моніторинг та забезпечення відповідності усіх лабораторних процесів затвердженим стандартним операційним процедурам (далі - СОП) та встановленим стандартам.

II. ДІАГНОСТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

1. Для отримання результатів при дослідженні діагностичного матеріалу необхідно дотримуватися наступних умов:

збір матеріалу необхідно робити до початку хіміотерапії, оскільки навіть декілька днів застосування медикаментозної терапії може бути достатні для того, щоб убити значну кількість мікобактерій або понизити їх життєздатність і спотворити результати дослідження;

матеріал для дослідження повинен збиратися рано вранці;

при дослідженні мокротиння необхідно зібрати 2 проби ранкового мокротиння впродовж 2 послідовних днів.;

зібраний матеріал необхідно якнайшвидше доставити в лабораторію; у разі неможливості негайної доставки матеріал зберігається в холодильнику при 2–8 °С не більше 72 годин;

при перевезенні матеріалу необхідно особливо ретельно стежити за збереженням флаконів і правильністю їх маркіровки.

За відсутності можливості доставки зразків мокротиння для дослідження бактеріоскопії необхідно приготувати і доставити в лабораторію зафіксовані мазки.

Контейнер з порцією мокротиння достатнього об'єму (не менше 3,0–5,0 мл), що містить ущільнені або гнійні грудочки без слини, ретельно

закривають кришкою, що загвинчується, потім контейнер маркують і поміщають у спеціальний бікс для транспортування в лабораторію.

2. Вимоги до контейнера.

Для збору діагностичного матеріалу повинні використовуватись спеціальні контейнери, які:

прозорі, виготовлені з ударостійкого і прозорого матеріалу, що не допускає протікання рідини та дозволяє оцінити кількість і якість зібраної проби, не відкриваючи кришки; легко піддається маркуванню і надійно зберігає його протягом періоду зберігання, транспортування та проведення дослідження;

мають кришки що загвинчуються з ущільненням (не використовувати флакони, що мають кришки щільно закупорюючи його: при відкритті таких кришок в контейнері виникає розріджений простір, який призводить до утворення аерозолу, створюючи потенційну небезпеку внутрішньолабораторного зараження);

мають об'єм 30,0–50,0 мл;

мають широкий отвір для збору мокротиння (не менше 30,0 мм у діаметрі), щоб пацієнт міг легко відокремлювати мокротиння всередину контейнера, не піддаючи забрудненню його зовнішню поверхню.

Використання таких контейнерів дає можливість оцінити якість і об'єм зібраного матеріалу, а при приготуванні мазків з нативного мокротиння – проводити відбір гнійних грудочок для приготування мазка безпосередньо з контейнера, запобігаючи етапу виливання мокротиння в чашку Петрі, надзвичайно небезпечного через утворення аерозолу. У цьому випадку ефективність прямої мікроскопії може не поступатися ефективності мікроскопії з осаду.

3. Лабораторія, що проводить мікробіологічні дослідження з метою виділення *M. tuberculosis*, повинна бути готова отримати різноманітний біологічний матеріал на дослідження, а саме:

мокротиння;

виділення верхніх дихальних шляхів, після подразнюючої інгаляції;

промивні води бронхів;

бронхоальвеолярні змиви;

бронхоальвеолярний лаваж;

матеріал, отриманий при бронхоскопії;

транстрахеальний та внутрішньолегеневий біоптати;

промивні води шлунка;

сеча;

пунктати з закритих порожнин (спинномозкова рідина, ексудати і трансудати з плевральної і черевної порожнин, гній, гнійно-некротичні маси, виділення ран, виділення відкритих порожнин тощо).

Якщо хворий не може відкашляти мокротиння, необхідно використовувати інші методи (відхаркувальні препарати, застосування подразнювальних аерозольних інгаляцій, промивання трахеї, бронхів тощо).

Індуковане мокротиння проводиться у разі неможливості самостійного збору мокротиння пацієнтом. Для аерозольних інгаляцій користуються портативними або стаціонарними аерозольними інгаляторами.

Індуковане мокротиння нагадує на вигляд і за консистенцією слину, щоб уникнути вибраковування матеріалу направленні і на флаконі з матеріалом має бути обов'язкова маркіровка, що вказує на те, що матеріал отриманий після аерозольної інгаляції.

При дослідженні промивних вод шлунку, щоб уникнути змішування мокротиння, що було проковтнуто з їжею необхідно брати натщесерце. Остання прийом їжі має бути не менше чим за 12 годин до узяття промивних вод шлунку.

Перед збором матеріалу пацієнтові дають випити 100–150 мл стерильної дистильованої води. Отриманий матеріал нейтралізують додаванням 100 мг натрію бікарбонату, негайно доставляють в лабораторію і піддають обробці, щоб виключити ушкоджуючу дію на мікобактерії шлункових ферментів, що містяться в матеріалі.

Сеча (середня частина ранкової порції або вся ранкова порція) збирається в стерильний посуд після ретельного туалету зовнішніх статевих органів. Аналіз сечі на мікобактерії здійснюється трикратно. В лабораторії сечу центрифугують при 3000 g, використовуючи метод накопичення осаду.

Бактеріологічного дослідження добової сечі не проводити.

Асептично зібрані рідини (ліквор, перикардіальна, синовіальна, асцитична рідина, кров, кістковий мозок) повинні збиратися лікарем в асептичних умовах в стерильний контейнер з використанням відповідних методик. До рідин, що мають схильність до згортання, додають стерильні гепарин (0,2 мг на 1,0 мл) або оксалат калію (0,01–0,02 мл 10,0 % нейтрального оксалату на 1,0 мл матеріалу). Матеріал має бути доставлений у лабораторію негайно.

Асептично зібрані тканини поміщаються в стерильні контейнери без додавання будь-яких консервантів. У разі тривалого транспортування тканини необхідно помістити в стерильний ізотонічний розчин, обкласти сухим льодом або охолодити при температурі 4–8 °С. Матеріал має бути доставлений у лабораторію негайно.

Матеріал відразу після збору слід відправляти в лабораторію (протягом декількох годин). У разі віддаленості лабораторії від місця взяття матеріалу його відправка в лабораторію може здійснюватися два рази на тиждень. У цьому випадку контейнери із зібраним матеріалом повинні зберігатися в холодильнику при температурі 4–8 °С не більше 72 годин. При необхідності зберігання понад 72 години, до діагностичного матеріалу додають консервант, у цьому випадку термін зберігання збільшується до 5 діб.

Для інших матеріалів, якщо їх транспортування передбачається при високій температурі навколишнього середовища або їх доставка в лабораторію більше, ніж через 24–72 години після збору (взяття), рекомендується використовувати наступні хімічні консерванти:

10,0 % розчину тризаміщеного фосфату натрію;

1,0 % розчину цетилпіридин хлориду у 2,0 % хлориді натрію. *M. tuberculosis* залишається життєздатними до 1 тижня;

двократний об'єм 2,0–3,0 % розчину борної кислоти.

Перелічені розчини рекомендується застосовувати для збереження зразків мокротиння. При їх застосуванні матеріал може зберігатися при кімнатній температурі. Однак консерванти токсичні для мікобактерій і їх застосування може знижувати висіваємість мікобактерій. Для зниження токсичності консервантів проби рекомендується зберігати в холодильнику при температурі від (+4 до +8) °С.

Діагностичний матеріал може бути заморожений, і у випадку якщо він не буде піддаватись розморожуванню і повторному заморожуванню, життєздатність мікобактерій збережеться.

4. Транспортування матеріалу.

Для безпечного транспортування дослідний матеріал повинен бути упакований в водонепроникну ємкість, що не б'ється, а також захищену від струсів, ударів і інших можливих пошкоджень.

Для транспортування матеріалу необхідно мати в лабораторії кілька спеціальних металевих або пластикових транспортувальних ящиків, що влаштовані таким чином, щоб фіксувати 20–30 контейнерів з діагностичним матеріалом у вертикальному положенні. Кришка ящиків повинна надійно закриватися, щоб виключити можливість самовільного відкривання кришки і висипання контейнерів із зразками. Для транспортування можна використовувати металеві бокси. Під час транспортування матеріал не повинен перебувати на сонці.

На зразки, в залежності від мети дослідження та контейнери заповнюється направлення відповідно до чинного законодавства.

Усю зазначену супровідну документацію розміщують окремо від матеріалу (у файлі, конверті, поліетиленовому пакеті тощо), поза транспортним контейнером (ящиком/боксом) із зразками.

Перед відправкою зібраного матеріалу медичний працівник повинен перевірити:

відповідність кількості контейнерів з мокротинням їх кількості, зазначеній у списку направленні;

- відповідність до номеру кожного контейнера номерам, вказаним у направленні.

Після перевірки даних супроводжувальної документації медпрацівник вказує дату відправлення матеріалу на дослідження та ставить свій підпис та вкладає в файл (конверт, поліетиленовий пакет) супроводжувальний лист та заповнені бланки направлень на мікроскопічне дослідження на кожен пробу матеріалу і прикріплює конверт до транспортного контейнеру (боксу, ящику) зовні.

5. Прийом матеріалу повинен проводитися в спеціально відведеному місці. Бікси/транспортувальні ящики з контейнерами повинні відкривати у витяжній шафі, або на спеціально виділеному столі з дотриманням таких вимог:
надіти одноразові рукавички, контейнер відкривати у шафі біологічної безпеки;

провести зовнішню обробку бікса відповідним дезінфектантом;
обережно відкрити бікс і перевірити цілісність контейнерів. Биті контейнери знезаражують шляхом занурення в дезінфектант, кип'ятіння або автоклавування. Матеріал з таких зразків не досліджується. У цьому випадку необхідно запросити новий зразок на аналіз;

витягти контейнери з матеріалом із бікса. Провести обробку дезінфектантом зовнішні поверхні всіх контейнерів, що знаходяться у біксі.

продезінфікувати внутрішню частину бікса. Якщо виявлено забруднення бікса, проавтоклавувати його або занурити в дезінфікуючий розчин.

перевірити відповідність номерів у супроводжувальній документації номерам, що позначені на контейнерах з матеріалом.

присвоїти матеріалу лабораторний порядковий номер. Позначити відповідним номером контейнер (на бічній стінці) і внести номер в бланк направлення.

зняти рукавички і помістити їх в контейнер для дезінфекції, а потім вимити руки з милом.

У лабораторії повинні бути розроблені документально оформлені правила вибракування матеріалу, що включають у тому числі:

відмову від прийому первинних проб без необхідної ідентифікаційної документації та маркування;

поведінку відносно проб незадовільної якості;

заходи при виявленні пошкоджених або не герметично закритих контейнерів.

Задовільна якість матеріалу передбачає наявність у матеріалі слизового або слизово-гнійного мокротиння. Об'єм зібраного матеріалу повинен бути в межах 3,0–5,0 мл, хоча при задовільній якості прийнятна і менша кількість. Необхідно відзначити якість отриманого матеріалу в журналі реєстрації досліджень і в бланку видачі результатів дослідження. У разі вибракування матеріалу необхідно запросити нову порцію на дослідження.

Дослідження зразка виконуються тільки при наявності заповненої форми направлення. Неприпустимо проведення досліджень на підставі усного запиту, без відповідного письмового направлення.

Всі отримані первинні проби повинні бути зареєстровані в формах первинної облікової документації відповідно до направлення.

В день надходження до лабораторії консервованого матеріалу його центрифугують, відмивають стерильною дистильованою водою і без додаткової деконтамінації використовують осад для приготування мазків і посіву на живильні середовища.

III. МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КИСЛОТОСТІЙКИХ БАКТЕРІЙ

1. Метод мікроскопії є найбільш швидким, простим і менш витратним методом виявлення КСБ в нативному матеріалі (найчастіше в мокротинні) без попередньої його обробки і гомогенізації.

Мікроскопічне дослідження мазків мокротиння, забарвлених за методом Ціля-Нільсена, дозволяє виявити КСБ при умові, що їх кількість буде складати 10000 і більше в 1,0 мл мокротиння. Негативний результат не виключає діагноз ТБ, оскільки в мокротинні може міститися кількість мікобактерій нижча за межу виявлення методом мікроскопії.

Основним діагностичним матеріалом для мікроскопії на КСБ служить мокротиння.

Результати мікроскопічного дослідження на КСБ інших біологічних матеріалів (різних рідин, гною, сечі і т. д.) мають обмежене значення.

Дослідження мазків з осаду центрифугованої сечі не завжди дозволяє отримати достовірні результати, оскільки в сечі можуть бути присутніми нетуберкульозні мікобактерії.

При необхідності виявлення збудника туберкульозу в різних біологічних матеріалах рекомендується використовувати культуральний метод дослідження.

Процедура приготування мазка розпочинається з підготовки предметних скельць. Необхідно використовувати тільки одноразові, нові, без подряпин і сколів, знежирені у спирті або суміші Нікіфорова (96° етиловий спирт + ефір в співвідношенні 1: 1).

Скло підписують простим олівцем по матовій смузі або алмазним олівцем по склу. Номер, проставлений на скельці, повинен відповідати номеру дослідження в лабораторному реєстраційному журналі.

При приготування мазків з нативного матеріалу контейнер відкривають акуратно, уникаючи розбризкування аерозолю, що містить мікобактерії.

Мікобактерії частіше виявляються в щільних гнійних грудочках мокротиння.

Обпаленою в полум'ї спиртівки і охолодженою бактеріологічною петлею, одноразовою бактеріологічною петлею або зламаними кінцями дерев'яної палички (нової для кожної порції мокротиння) захоплюють невелику кількість мокротиння з гнійними грудочками. Щільно притиснувши петлю або паличку перпендикулярно до скла, дрібними круговими рухами розподіляють гнійну грудочку мокротиння по поверхні предметного скельця як можна тоншим шаром площею 1,0–2,0 см x 2,0–3,0 см у вигляді овалу.

Товщина мазка у висушеному незабарвленому стані має бути такою, щоб можна було прочитати газетний шрифт, розташований за скельцем на відстані 5,0–10,0 см. Якщо мазок занадто тонкий, при мікроскопічному дослідженні можна отримати хибнонегативний результат. Якщо мазок занадто товстий, він може бути змитий з предметного скельця при забарвленні.

На одному предметному склі необхідно робити тільки один мазок.

Використані для приготування мазка палички або одноразову бактеріологічну петлю скидають в ємність з дезінфікуючим розчином або в контейнер з відпрацьованим інфекційним матеріалом. Пінцет і ножиці обпалюють в полум'ї пальника (за необхідністю).

Приготування мазків для мікроскопічного дослідження є відносно небезпечною процедурою, під час якої може відбуватися розсіювання аерозолів, що містять збудник.

У разі, коли мазок готують за допомогою бактеріологічної петлі, необхідно обпалювати петлю після кожної маніпуляції в полум'ї спиртового або газового пальника до тих пір, поки вона не стане червоного кольору. Перед повторним використанням петлю ретельно прожарюють в полум'ї пальника, яке при цьому має бути безбарвним або блакитним. Прийнятніше використовувати одноразові бактеріологічні петлі.

Мазки із осаду діагностичного матеріалу готують з отриманого після центрифугування осаду будь-якого рідкого. Для приготування мазка до осаду додають 1,0 мл фосфатного буфера, ресуспендують. На скельце наносять 1–2 краплі ресуспендованого осаду, розподіляючи його тонким шаром в центрі скла на площі приблизно 1,0–2,0 см x 2,0–3,0 см.

Мазки з осаду рідкого матеріалу легко змиваються в процесі забарвлення, тому необхідно готувати на скельцях, заздалегідь оброблених сироваткою або бичачим сироватковим альбуміном, який наносять ватним тампоном на чисті знежирені предметні скельця, рівномірно розподіляючи на 2/3 їх поверхні. Оброблені сироваткою скельця висушують при кімнатній температурі. Скельця готують заздалегідь; термін зберігання таких скелець – до 5 днів.

Не здійснювати приготування мазків способом «розтяжки» матеріалу між двома предметними скельцями, такий спосіб збільшує площу мазка і більш ніж в 2 рази та знижує можливість виявлення КСБ.

Приготовані мазки висушують при кімнатній температурі до висихання у витяжній шафі або шафі біологічної безпеки.

Не допускається підсушування або фіксація сирих мазків над полум'ям пальника.

Приготування, фіксацію, забарвлення і перегляд препаратів необхідно закінчити до кінця робочого дня. Якщо дослідження не вдається закінчити, предметні скельця з мазками залишають на ніч в закритій коробці. Нефіксовані мазки ні не повинні залишатися відкритими на ніч в робочому приміщенні.

Для фіксації мазків можна використовувати наступні прийоми:

скельця з мазками, що висохли, фіксують триразовим проведенням їх впродовж 3–5 секунд через верхню третину полум'я спиртівки до зникнення ознак запотівання скелець;

скельця з мазками, що висохли, поміщають на електронагрівач для сушки предметних скелець при температурі 65–75 °С не менше, як на 1 годину;

скельця мазкам, що висохли, поміщають в сушарну шафу при температурі 105 °С на 10 хвилин.

2. Фарбування кислотостійких організмів. Барвники, які використовуються, нерідко містять різні домішки, тому при приготуванні розчинів барвників треба враховувати вміст фарбувальної речовини. Наважку розраховують шляхом ділення необхідної кількості фарби на десятковий еквівалент вмісту фарбувальної речовини.

Приклад. Треба зважити 3,0 г фарби, яка містить 75,0 % (десятковий еквівалент 0,75) фарбувальної речовини. Слід розділити необхідну кількість на вміст фарбувальної речовини: $3,0 \text{ г} : 0,75 = 4,0 \text{ г}$. Отже, треба зважити 4,0 г фарби.

Якщо вміст фарбувальної речовини складає 88,0 % і більше, перераховувати наважку не треба.

Кристали фенолу безбарвні, якщо вони мають коричневий колір, їх не слід використовувати, оскільки в цьому випадку якість забарвлення може бути незадовільною.

Реактиви:

Забарвлюючий розчин (3,0 % розчин фуксину).

Розчин 1. Розчин основного фуксину:

Основний фуксин	– 0,3 г
96° етиловий спирт	– 10,0 мл

Розчиняють основний фуксин у спирті.

Розчин 2. Розчин фенолу 5,0 % водний.

Кристалічний фенол	– 5,0 г
Дистильована вода	– 100 мл

Повільно нагрівають кристали фенолу у флаконі до рідкого стану на водяній бані і додають злегка підігріту дистильовану воду.

Робочий розчин:

Змішують 10,0 мл розчину 1 і 90,0 мл розчину 2, переливають в ємність з темного скла. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс. Перед використанням розчин слід профільтрувати.

Знебарвлюючий розчин (розчин 3,0 % солянокислого спирту):

Концентрована соляна кислота – 3,0 мл
96° етиловий спирт – 97,0 мл.

Акуратно додають концентровану соляну кислоту до спирту у флакон з темного скла. Забороняється вливати спирт в кислоту! Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Замість 3,0 % розчину солянокислого спирту для знебарвлення можна використовувати 25,0 % розчин сірчаної кислоти.

Знебарвлюючий розчин (розчин 25,0 % сірчаної кислоти):

Концентрована сірчана кислота – 25,0 мл

Дистильована вода – 75,0 мл

Акуратно додають концентровану сірчану кислоту до води, нашаровуючи її по стінці посудини.

Забороняється вливати воду в кислоту! Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Розчин, що дофарбовує (0,3 % розчин метиленового синього):

Хлорид метиленового синього – 0,3 г

Дистильована вода – 100 мл

Розчиняють хлорид метиленового синього в дистильованій воді. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати при кімнатній температурі впродовж 6 міс.

Процедура забарвлення

Промарковані і зафіксовані мазки поміщають на підставку («рейки») так, щоб вони не торкалися один одного. Не слід забарвлювати одночасно більше 12 скельць.

На кожен мазок накладають смужку фільтрувального паперу. На усю поверхню фільтрувального паперу, що покриває скельце, наливають забарвлюючий розчин.

Повільно нагрівають препарат над полум'ям пальника до легкої появи парів. Не допускається закипання або повне випарювання забарвлюючого розчину на предметному скельці. Якщо розчину недостатньо, його треба додати і нагрівати ще в другий раз.

Прогрітий мазок залишають на 5 хв., не допускаючи повного випарювання рідини, після чого фільтрувальний папір видаляють пінцетом і поміщають його в контейнер для відходів.

Кожне предметне скельце акуратно змивають під слабкою течією води до повного видалення забарвлюючого розчину. Не дозволяється змивати і знебарвлювати одночасно декілька мазків щоб уникнути перехресної контамінації.

На скельця з мазками наливають знебарвлювальний розчин, повністю покриваючи усю поверхню мазка, залишають на 3 хв.

Обережно промивають кожне предметне скельце, як описано вище.

Знебарвлений мазок дофарбовують 0,3 % розчином метиленового синього впродовж 60 сек.

Промивають скельця водою, видаляють залишки вологи.

Залишають препарат на повітрі при кімнатній температурі у вертикальному або похилому положенні для висихання. Не слід промокати препарат.

3. Налаштування мікроскопа і методика дослідження препаратів шляхом обертання макрогвинта віддаляють об'єктив від предметного столика. Обертаючи револьвер, встановлюють об'єктив з малим збільшенням (5x або 10x) точно над конденсором. Предметне скельце розміщують на предметному

столику прямо під об'єктивом. Дивлячись збоку для контролю відстані між склом і лінзою об'єктиву, повільно обертаючи мікрогвинт, опускають об'єктив до предметного скельця, не торкаючись лінзою препарату.

Дивлячись через окуляри, регулюють інтенсивність світлового потоку джерела світла.

Повертають макрогвинт, щоб лінза об'єктиву відійшла від предметного столика до отримання різкого зображення. Повертають мікрогвинт, щоб отримати чіткіше зображення.

Дивлячись на препарат збоку, вибирають об'єктив з великим збільшенням (100x). Слід переконатися, що об'єктив не торкається предметного скла. Аплікатором (піпеткою) наносять одну краплю імерсійної олії на препарат, не торкаючись скла. Щоб уникнути забруднення імерсійної олії і отримання хибноопозитивного результату не можна торкатися піпеткою крапельниці олії до мазка, крапля олії повинна вільно впасти на скельце. Опускають об'єктив до зіткнення з краплею олії. Повільно підіймають об'єктив до появи чіпкого зображення. Настроюють зображення, використовуючи мікрогвинт.

Для дослідження мазків, забарвлених за методом Ціля-Нільсена, слід використовувати світловий біокулярний мікроскоп з об'єктивом (100x) з масляною імерсією і окуляром (10x) (загальне збільшення 1000x). Слід використовувати тільки синтетичну імерсійну олію з коефіцієнтом заломлення $n_D = 1,5$.

Нижче представлена рекомендована процедура перегляду мазка під імерсійною системою (лінії із стрілками означають напрям перегляду) і відповідність розмірів мазка та кількості полів зору.

Відповідними вважають поля зору, в яких видно клітинні елементи бронхіального походження (лейкоцити, слизові тяжи, клітини епітелію). Поля зору, що не містять таких елементів, не враховуються. Кількість полів зору по довжині мазка близько 2,0 см відповідає як мінімум 100–120. У разі, коли результат такого дослідження виявляється негативним, для підтвердження рекомендується проглянути додатково ще 200 полів зору. Таким чином, вивчається 300 полів зору. При значній кількості КСП в мазку (2+) досить дослідити 50 полів зору, для мазка КСП (3+) досить проглянути 20 полів зору (Додаток 1).

Після закінчення мікроскопічного дослідження кожного препарату для видалення імерсійної олії необхідно помістити мазок у витяжну шафу, накрити смужкою фільтрувального паперу і змочити її декількома краплями ксилолу. Через 2–3 хв. фільтрувальний папір видаляють.

Очищений, таким чином, від імерсійної олії препарат слід зберігати в коробці для позитивних або негативних препаратів, що були переглянуті раніше. Після перегляду кожного препарату слід ретельно протирати об'єктив мікроскопа від імерсійної олії безворсовими серветками, щоб запобігти контамінації наступного мазка. Серветки потім опускають у бак для відходів.

Кислотостійкі бактерії – тонкі малиново-червоні палички завдовжки 1–10 (частіше 1–4) мкм, шириною 0,2–0,6 мкм, злегка зігнуті, більш-менш зернисті. Мікобактерії розташовуються ізольовано, або парами або у вигляді груп, добре видні на блакитному фоні мазка.

Кислотостійкість, що виявляється при забарвленні за Цілем-Нільсеном, властива не лише різним видам мікобактерій, але і іншим мікроорганізмам, наприклад, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, а також цистам *Cryptosporidium* і *Isospora*. Мікобактерії, що швидко ростуть, можуть розрізнятися по мірі кислотостійкості, іноді вони можуть забарвлюватися у фіолетово-малиновий колір. У сумнівних випадках рекомендується тривало (впродовж 45–60 хв.) знебарвлювати мазок в солянокислому спирті. Сапрофіти при цьому втрачають забарвлення і виглядають у виді паличок блакитного кольору.

4. Облік і інтерпретація результатів мікроскопії за методом Ціля-Нільсена. Підраховують кількість КСБ в мазку. Кількість виявлених КСБ визначає тяжкість захворювання і міру епідемічної небезпеки хворого. Отже, дослідження має бути не лише якісним, але і кількісним. Реєстрація результатів з вказівкою кількості виявлених КСП проводиться відповідно до таблиці 1.

5. Результати мікроскопічного дослідження вносять до лабораторного реєстраційного журналу обліку мікроскопічних досліджень та бланків направлення на дослідження.

Результати мікроскопії слід повідомляти до відділення, яке надало проби, якнайшвидше, бажано впродовж 24 годин з моменту отримання проб мокротиння. У бланку результату дослідження мають бути приведені наступні відомості:

паспортні дані пацієнта;

найменування установи виконавця і відправника;

Таблиця 1 – Градація результатів мікроскопічного дослідження при забарвленні за методом Ціля-Нільсена

Кількість кислотостійких бактерій	Мінімальне число імерсійних полів зору, які обов'язкові для перегляду	Форма запису результатів	Інтерпретація результатів дослідження
КСП не виявлені	300	Негативний	Негативний
1–2 КСП в препараті	300	Рекомендується повторити дослідження	Результат не оцінюється
Від 3 до 9 КСП в 100 полях зору	100	Вказати точну кількість (3–9 КСП в 100 п/з)	Позитивний
Від 10 до 99 КСП в 100 полях зору	100	1+	Позитивний
Від 1 до 10 КСП в 1 полі зору	50	2+	Позитивний
Більше 10 КСП в 1	20	3+	Позитивний

полі зору			
-----------	--	--	--

характеристика якості матеріалу;
 використаний метод забарвлення;
 кількість КСБ в мазку;
 дата дослідження і прізвище співробітника, що проводив дослідження.

Мазок з виявленими КСП є документом, від якого залежить постановка діагнозу ТБ легень у конкретної людини. Його слід зберігати в лабораторії, а результати необхідно підтвердити повторним дослідженням.

6. Флуоресцентний метод мікроскопії.

Флуорохромні барвники (аурамін О, родамін С та ін.) зв'язуються з воскоподібними структурами бактерійних клітин, які при опроміненні ультрафіолетовими променями візуалізуються як палички жовтого або помаранчевого кольору на темному фоні.

Перевага флуоресцентного методу мікроскопії полягає в можливості перегляду більшої площі мазка, що пов'язано з використанням об'єктиву з меншим збільшенням.

Аурамін має канцерогенну активність, тому не слід допускати попадання на шкіру його порошку або розчину. Зважувати аурамін треба у вінілових рукавичках або 2 парах звичайних рукавичок та захисних окулярах. Для захисту дихальної системи рекомендується використання респіратора. Приміщення після зважування слід провітрювати. Готувати розчин і проводити забарвлення мазків слід тільки у витяжній шафі.

При забарвленні мазків флуорохромними барвниками необхідно:

- уникати неповного знебарвлення;
- готувати досить тонкі мазки, оскільки зайва товщина мазка перешкоджає якісному знебарвленню, а додаткове дофарбовування може приховати наявність мікобактерій. Окрім цього, товсті мазки погано фіксуються на предметному скельці, в силу чого можуть бути змиті в процесі фарбування;
- уникати надмірно інтенсивного дофарбовування, яке приховує наявність мікобактерій.

Оскільки з часом флуоресцентне забарвлення може збліднути, мікроскопію роблять по можливості відразу ж після закінчення процедури забарвлення і висихання мазків. У разі неможливості проведення мікроскопії безпосередньо після фарбування, допускається зберігання забарвлених мазків в темному місці, бажано в холодильнику, не більше 24 годин.

Приготування реактивів

Реактиви:

1. Забарвлюючий розчин

Розчин 1. Спиртовий розчин аураміну О:

аурамін – 0,1 г
 96 ° етиловий спирт – 10,0 мл

Розчиняють аурамін у спирті.

Розчин 2. Розчин фенолу:

фенол кристалічний	– 3,0 г
дистильована вода	– 87,0 мл

Кристали фенолу (температура плавлення 41 °С) розчиняють в дистильованій воді, підігрівачи на водяній бані.

Робочий розчин:

У витяжній шафі змішують розчини 1 і 2, переливають в ємність з темного скла, що щільно закривається. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання.

Розчин можна зберігати в ємності з темного скла в прохолодному затемненому місці впродовж 3 міс. В процесі зберігання розчин може стати каламутним, проте це не впливає на якість фарбування.

Знебарвлюючий розчин (розчин 0,5 % солянокислого спирту):

Концентрована соляна кислота – 0,5 мл

96°етилловий спирт – 100,0 мл

Акуратно додають концентровану соляну кислоту в етиловий спирт. Слід обережно влити кислоту в спирт, але не навпаки. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла при кімнатній температурі впродовж 3 міс.

Дофарбовуючий розчин

Для дофарбовування можна використовувати розчини перманганату калію, акридинового помаранчевого або метиленового синього:

Розчин перманганату калію:

Перманганат калію (KMnO_4) – 0,5 г

Дистильована вода – 100 мл

Розчиняють перманганат калію в дистильованій воді і переливають у бутель з темного скла, який щільно закривається. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла при кімнатній температурі впродовж 3 міс.

Розчин акридинового помаранчевого:

Безводний двозаміщений фосфат натрію (Na_2HPO_4) – 0,01 г;

Акридиновий помаранчевий – 0,01 г;

Дистильована вода – 100 мл.

Розчиняють фосфат натрію в дистильованій воді. Додають акридиновий помаранчевий. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла при кімнатній температурі впродовж 3 міс.

Розчин метиленового синього:

Метиленовий синій хлорид – 25,0 мг;

Вода дистильована – 100 мл.

25,0 мг метиленового синього хлориду розчиняють в 100 мл дистильованої води. Вказують на етикетці назву реактиву, дату приготування і

термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла при кімнатній температурі впродовж 3 міс.

6. Процедура забарвлення мазків.

Промарковані і зафіксовані мазки поміщають на підставку («рейки») так, щоб вони не торкалися один одного. Не слід забарвлювати одночасно більше 12 скельць.

На кожне скельце наливають крізь воронку з паперовим фільтром забарвлюючий розчин на 15–20 хв. Не слід підігрівати мазки і користуватися смужками фільтрувального паперу.

Промивають мазок дистильованою водою. Водопровідна вода містить з'єднання хлору, які можуть вплинути на флюоресценцію.

На скельце наливають знебарвлювальний розчин, залишають на 2 хв.

Промивають мазок дистильованою водою.

Знебарвлений мазок дофарбовують розчином перманганату калію, акридинового помаранчевого або метиленового синього з використанням воронки з паперовим фільтром впродовж 2 хв.

Промивають мазок дистильованою водою.

Залишають препарат на повітрі при кімнатній температурі у вертикальному або похилому положенні для висихання. Не слід промокати препарат. Можливе висушування мазків в сухожаровій шафі малого об'єму при 110 °С впродовж 10 хв.

При використанні перманганату калію час його дії не повинен перевищувати 2 хв.

Точність експозиції має вирішальне значення, оскільки при перевищенні часу експозиції інтенсивність флюоресценції може зменшуватися.

7. Облік результатів мікроскопічного дослідження при забарвленні флуорохромними барвниками здійснюється при значно меншому збільшенні (зазвичай 400х), ніж збільшення, яке використовується для перегляду мазків, забарвлених за методом Цля-Нільсена (1000х). Тому поле зору, що переглядається під люмінесцентним мікроскопом, має значно більшу площу, ніж поле зору світлового мікроскопа. Отже, кількість КСП в 100 полях зору препарату, забарвленого флуорохромами і переглянутого при збільшенні в 400 разів, буде значно вищою, ніж при дослідженні цього ж препарату, забарвленого за Цлем-Нільсеном і переглянутого при збільшенні в 1000 разів.

При мікроскопії препарату, забарвленого флуорохромними барвниками, слід переглядати не менше 40 полів зору. Переглянута площа мазка при мікроскопії 40 полів зору зі збільшенням x400 дорівнює площі 100 полів зору зі збільшенням x1000, або одній лінії мазка, рівній 2,0 см Реєстрація результатів з вказівкою кількості виявлених КСП проводиться відповідно до табл. 5.

Таблиця 2 – Градація результатів дослідження при забарвленні флуорохромами

Кількість кислотостійких бактерій	Мінімальне число імерсійних полів зору, які обов'язкові для	Форма запису результатів	Інтерпретація результатів дослідження
-----------------------------------	---	--------------------------	---------------------------------------

	перегляду		
КСП не виявлені	40	Негативний	Негативний
Від 1 до 99 КСБ в 40 полях зору	40	Вказати точну кількість (1–9 КСБ в 40 п/з)	Позитивний
Від 20 до 199 КСБ в 40 полях зору	40	1+	Позитивний
Від 5 до 50 КСБ в 1 полі зору	5	2+	Позитивний
Більше 50 КСБ в 1 полі зору	5	3+	Позитивний

8. Внутрішній контроль якості мікроскопічного дослідження проводиться при фарбуванні кожної партії мазків.

З цією метою досліджуються контрольні (свідомо позитивні і негативні мазки), які готують заздалегідь, фіксують і зберігають в закритому контейнері.

Для підготовки контрольних мазків бажано використовувати справжні проби мокротиння, проте допустимо додавати до проб мокротиння суспензію *M. tuberculosis* (для позитивних мазків) або кишкової палички або інших не кислотостійких паличок (для негативних мазків).

З кожного зразка мокротиння готують принаймні по 20 мазків, максимально ідентичних за розміром і товщиною, маркуючи кожну серію мазків одним і тим же ідентифікаційним номером.

Мазки забарвлюють, переглядають 2–3 мазки з кожної серії, відмічають середню кількість КСБ для КСБ+ мазків в журналі контролю якості.

Включають позитивні і негативні контрольні мазки в кожну партію мазків, що будуть забарвлюватися. Мікроскопію контрольних мазків слід проводити перед мікроскопією мазків від пацієнтів.

Досліджують контрольні мазки, відмічають результати в журналі контролю якості, реєструючи номер партії барвника і/або дату приготування розчину.

Незадовільними результатами контролю мікроскопічного дослідження за Цілем-Нільсеном є наступні:

в позитивному контрольному мазку КСБ забарвлені не яскраво або їх кількість занадто мала;

фон позитивного контрольного мазка залишається червоним;

в негативному контрольному мазку виявляються КСБ;

в мазках є присутніми конгломерати барвника.

Незадовільними результатами контролю мікроскопічного дослідження із забарвленням флуорохромами:

в позитивному контрольному мазку КСБ забарвлені в неяскравий жовтий колір або їх кількість занадто мала;

фон негативного контрольного мазка залишається яскраво-жовтим після знебарвлення;

фон занадто темний або містить надто багато флуоресціюючих артефактів;

в негативному контрольному мазку виявляються КСБ.

Якщо при проведенні контролю якості відзначаються проблеми хоч би по одному з пунктів, що вище перелічені, слід з'ясувати, чи мали місце проблеми з приготуванням розчинів, і повторити забарвлення двох негативних і двох позитивних контрольних мазків, зважаючи на можливі помилки. Якщо при повторному фарбуванні мають місце незадовільні результати, слід приготувати нові розчини барвників.

Причини, що знижують результативність мікроскопічного дослідження:

неправильне маркування флаконів з мокротинням (наприклад, при маркуванні кришки флакона, а не самого флакона);

відсутність маркування на склі або ушкодження її в процесі забарвлення, помилки при маркуванні зразків;

відсутність біокулярного мікроскопа; поганий стан або погане налаштування мікроскопа;

недостатня підготовка персоналу;

технічні помилки при записі або передачі результатів дослідження;

неправильна реєстрація результатів.

Неправильні результати можуть бути обумовлені помилками лабораторних працівників, пов'язаними переважно з фізичними і психологічними причинами (так званий «людський чинник»). Багато помилок, що виникають при неправильному обліку результатів мікроскопії мазків мокротиння, можна попередити при здійсненні постійного централізованого контролю роботи по мікроскопічній діагностиці ТБ курируючими бактеріологічними лабораторіями, при правильному навчанні і періодичній перепідготовці лабораторних працівників.

Можливі причини хибнопозитивних результатів:

повторне використання контейнерів або предметних стекол;

розчин барвника приготований з використанням води, що містить сапрофітні мікобактерії;

використання не профільтованого розчину або забарвлюючого розчину, що тривало зберігався і містить преципітат і кристали;

недотримання методики фарбування мазків;

крос-контамінація КСБ внаслідок відсутності проміжків між сусідніми стеклами, що забарвлюються;

неадекватне знебарвлення;

неправильна інтерпретація результатів мікроскопії, коли внаслідок недоліку досвіду наявність в мазку кристалів погано профільтованого барвника розцінюється як КСБ+;

поганий стан або погане налаштування мікроскопа;

контамінація імерсійної олії.

Можливі причини хибнонегативних результатів:

низька якість зразка мокротиння;

недостатній об'єм зразка мокротиння, узятого для підготовки мазка;

неправильний вибір грудочок мокротиння для приготування мазка;

порушення методики приготування мазка (занадто тонкий або товстий),
 погана його фіксація;
 погана якість барвників;
 недотримання методики приготування розчинів;
 недостатній час експозиції із забарвлюючим розчином;
 надмірне знебарвлення;
 занадто сильне дофарбовування;
 перегрівання в ході фарбування;
 читання менше 100 полів зору, хаотичний або недостатньо ретельний перегляд;
 занадто тривала експозиція забарвлених мазків при денному освітленні;
 занадто довгий інтервал між фарбуванням і читанням, особливо якщо мазки були погано забарвлені і не зберігалися в темряві.

IV. ОБРОБКА ДІАГНОСТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ, ДЕКОНТАМІНАЦІЯ ТА КОНЦЕНТРАЦІЯ ЗРАЗКІВ

1. Проби клінічного матеріалу, що надходить до мікробіологічної лабораторії для бактеріологічного дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії ТБ, у різній мірі забруднені бактеріями, які швидко ростуть, пишній їх ріст на багатих живильних середовищах заважає розвитку мікобактерій і ускладнює їх виділення. Тому перед посівом на живильні середовища діагностичний матеріал піддають спеціальній обробці, що забезпечує деконтамінацію, тобто загибель гноєрідної та гнилісної мікрофлори.

M. tuberculosis, що виділяються з дихальних шляхів хворого оточені великою кількістю слизових речовин, що затрудняють їх виділення. Тому мокротиння й інші подібні матеріали перед посівом одночасно з деконтамінацією піддають розрідженню і гомогенізації.

Усі препарати, що використовуються в даний час для розрідження і деконтамінації діагностичного матеріалу, мають виражену токсичність відносно мікобактерій. Щоб забезпечити виживання достатньої частини мікобактеріальної популяції, необхідно використовувати бережні методи обробки, які дозволяють, з одного боку, подавити гнійні і гнилісні мікроорганізми, що швидко ростуть, а з іншого – максимально зберегти життєздатність присутніх в матеріалі мікобактерій.

Частота контамінації посівів (кількість проростів) у лабораторіях, де проводяться дослідження свіжозібраних проб, при культивуванні мокротиння на щільних яєчних середовищах зазвичай становить 2,0–5,0 %. Якщо клінічний матеріал до надходження в лабораторію зберігався протягом декількох днів у нерегламентованих умовах, частота контамінації може досягати більше 5,0 %,

що неприпустимо. Якщо кількість проростів менше 2,0 %, це свідчить про надмірно жорсткий режим деконтамінації, що може призводити до загибелі значної кількості *M. tuberculosis*, що містяться в діагностичному матеріалі. Для уніфікації результатів дослідження необхідно, щоб мікробіологічні лабораторії використовували для гомогенізації і деконтамінації діагностичного матеріалу один із стандартних методів, викладених нижче.

При виконанні посівів на *M. tuberculosis* необхідно мати на увазі три важливі аспекти:

1. Клінічні зразки мають бути гомогенізовані, щоб звільнити *M. tuberculosis* з тканин, в яких вони можуть знаходитися.
2. Ні гомогенізація, ні деконтамінація не повинні істотно зменшувати кількість життєздатних *M. tuberculosis* в діагностичному матеріалі.
3. Успіх гомогенізації і деконтамінації залежить від ряду чинників:
 - підвищеній стійкості мікобактерій до різко лужної або кислої реакції розчинів, які використані для гомогенізації матеріалу;
 - тривалість обробки матеріалу цими речовинами;
 - температури зразка в процесі його центрифугування;
 - ефективності центрифугування, яке використовується для осадження мікобактерій.

Процедура передпосівної обробки має бути максимально щадна і забезпечувати частоту контамінації не більше 5,0 % для щільних середовищ і 8,0–10,0 % для рідких.

Усю процедуру деконтамінації проводять тільки у шафах біологічної безпеки 2 класу. Оскільки тривалість обробки матеріалу повинна суворо дотримуватися, доцільно проводити одночасну обробку не більше 8–12 проб.

Для передпосівної обробки діагностичного матеріалу використовують тільки стерильні розчини детергентів, лугів і кислот. Для обробки і посіву матеріалу використовують тільки стерильний посуд (контейнери для збору діагностичного матеріалу, центрифужні пробірки, піпетки і т. д.).

Надосадову рідину, отриману в результаті центрифугування, зливають в контейнер з воронкою, що зменшує розбрикування рідини і утворення аерозолі. Використані піпетки поміщають в ємність з дезінфікуючим розчином або в пакети для автоклавування. Увесь забруднений лабораторний посуд з біологічними рідинами і використані витратні матеріали утилізуються автоклавуванням.

2. Усі реактиви, що використовуються при приготуванні розчинів для обробки діагностичного матеріалу, повинні мати ступінь очищення не менше категорії «хімічно чисті» (ХЧ). Для передпосівної обробки діагностичного матеріалу рекомендується використовувати наступні методи і реагенти.

3. Застосування муколіпичного препарату NALC, що використовується для швидкого розрідження мокротиння, прискорює процес деконтамінації і зменшує концентрацію деконтамінуючої речовини (NaOH) до 1,0 %. NALC швидко втрачає свою активність в розчиненому вигляді, тому його розчин повинен готуватися щодня і вживатися свіжим. У муколіпичну суміш входить

цитрат натрію для зв'язування іонів важких металів, що можуть бути присутніми в пробі і інактивувати дію N- ацетил-L-цистеїну.

Методика застосування даного препарату викладена в інструкції, що додається до нього.

NALC викликає тільки розрідження зразків мокротиння і не має деконтамінуючих властивостей. Тому для інших біологічних матеріалів (сеча, змиви, ліквор та ін.) деконтамінацію слід проводити без додавання NALC (тільки розчином гідроксиду натрію і цитрату натрію).

4. Приготування реагентів для обробки клінічних зразків.

Для отримання деконтамінуючого розчину, що містить 2,0 % NAOH (з цитратом натрію), необхідно з'єднати рівні об'єми 4,0 % розчину NAOH і 2,9 % розчину цитрату натрію безпосередньо перед використанням.

Розчини готують таким чином:

розчин NAOH: 4,0 г NAOH розчинити в 100 мл дистильованої води;

розчин цитрату натрію: 2,9 г Na-цитрату дегідрату або 2,6 г Na-цитрату безводного розчинити в 100 мл дистильованої води.

Вказані розчини стерилізують і зберігають в стерильному закритому посуді для подальшого використання.

Другий варіант приготування розчину NaOH-цитрат – в 1,0 л дистильованої води розчинити:

гідроксид натрію (NAOH) – 20,0 г

цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) – 14,5 г.

Безпосередньо перед проведенням процедури обробки матеріалу готують робочий розчин деконтамінанту: у розчин NaOH-цитрат додають порошок муколітичного (розріджуючого) агента NALC, із розрахунку 0,5 г на 100 мл розчину.

Суміш NALC-NaOH може бути використана тільки *впродовж 24 годин*, оскільки після закінчення зазначеного терміну розчин швидко втрачає свою муколітичну активність. Тому рекомендується готувати невеликі об'єми розчину, щоб кожного разу використовувати для процедури деконтамінації свіжий розчин, не зберігаючи для подальшого використання об'єм розчину, що залишився.

При високому забрудненні зразків сторонньою мікрофлорою концентрацію гідроксиду натрію у вихідному розчині можна збільшити до 3,0 %.

Для отримання фосфатного буфера (рН=6,8) готують два розчини:

9,47 г безводного Na_2HPO_4 розчиняють в 10,0 мл дистильованої води;

9,07 г KH_2PO_4 розчиняють в 10,0 мл дистильованої води.

Далі для приготування буфера з рН=6,8 обидва приготовані розчини змішують в рівній кількості і перевіряють рівень рН за допомогою рН-метра або індикаторної паперової смужки. Необхідного значення рН досягають, додаючи розчини (а) або (б). Розчин (а) підвищує значення рН, розчин (б) – знижує.

Другий варіант приготування буферного розчину – в 10,0 мл дистильованої води необхідно розчинити:

двозаміщений фосфат натрію (Na_2HPO_4) – 4,74 г;

однозаміщений фосфат калію (KH_2PO_4) – 4,54 г.

Стерилізація буфера проводиться в автоклаві при $121\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 15 хв. в ємкості з кришкою, що частково відкручена. Після охолодження розчину до кімнатної температури кришку слід щільно закрити.

Обробку матеріалу слід проводити в ламінарній шафі біобезпеки з дотриманням стерильності за наступною схемою:

до зразка (приблизно 5,0–10,0 мл), який знаходиться в пластиковій градуйованій центрифужній пробірці на 50,0 мл, додати рівний об'єм NALC-NaOH;

- щільно заклавши кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за допомогою вортексу (протягом 5–20 сек), прагнучи досягти повного розрідження; рекомендується кілька разів перевернути пробірку, щоб усі ділянки внутрішніх поверхонь пробірки і кришки піддалися дії розчину.

Необхідно уникати посиленого струшування, щоб запобігти окисленню і інактивації NALC. Необхідний ступінь інтенсивності змішування деконтамінуючого розчину з оброблюваним матеріалом забезпечується під час центрифугування:

- залишити зразок на 15 хв. при кімнатній температурі для деконтамінації (в тому випадку, якщо необхідно збільшити ступінь деконтамінації, час експозиції може бути продовжений до 25 хв.).

- додати в пробірку стерильний фосфатний буфер ($\text{pH}=6,8$) до відмітки «50,0 мл» (для зниження дії NaOH і зменшення щільності розчину перед центрифугуванням); щільно закрити кришку і перемішати вміст пробірки струшуванням, щоб змити всі внутрішні поверхні пробірки і кришки.

центрифугувати зразок протягом 15–20 хв. при 3000 г в антиаерозольній центрифугі для осадження 95,0 % наявних в матеріалі мікобактерій.

видалити надосадову рідину в ємність з дезінфікуючим розчином за допомогою стерильної піпетки (або злити супернатант в ємність з дезінфектантом, після чого витерти край пробірки серветкою, змоченою дезінфектантом, або акуратно обпалити), а потім закрити пробірку.

Додати до осаду 0,5–2,0 мл нової порції стерильного фосфатного буфера, потім ресуспендувати осад і використовувати його для інокуляції.

Обробка матеріалу розчином тризаміщеного фосфорнокислого натрію.

Розчин тризаміщеного фосфорнокислого натрію може використовуватися в 10,0 % концентрації.

Тризаміщений фосфорнокислий натрій (Na_3PO_4) добре пригнічує супутню флору і навіть при 2–3-денному зберіганні матеріалу при температурі $(+4)\text{ }^\circ\text{C}$ не пошкоджує мікобактерії і мало впливає на їх здатність до росту на живильних середовищах.

Тризаміщений фосфорнокислий натрій може використовуватися для консервації, транспортування і деконтамінації зразків мокротиння. Метод не

має жорстких обмежень за часом. Цей метод обробки матеріалу використовується тільки для посіву на щільні живильні середовища.

Приготування розчинів

100 г тризаміщеного фосфату натрію розчиняють в 800 мл дистильованої води і доводять об'єм розчину до 1,0 л. Стерилізують автоклавуванням при 121 °С протягом 15 хв.

Методика обробки

Досліджуваний матеріал залити рівним об'ємом 10,0 % тризаміщеного фосфату натрію, щільно закрити ємність і помістити її на 10 хв. на струшувач. Крім того, для кожного зразка бажано мати свою пробірку з Na_3PO_4 або окрему піпетку, щоб уникнути перехресної контамінації зразків при zalиванні деконтамінуючого розчину.

Пробірку або флакон з матеріалом, залитим деконтамінантом, помістити на 18–20 годин у термостат при 37 °С.

Після цього пробірки, не відкриваючи, помістити у відповідну центрифугу, урівноважити їх і центрифугувати при 3000 g протягом 15 хв. При зазначеному режимі відбувається осадження 95,0 % присутніх у матеріалі мікобактерій.

Якщо процес деконтамінації проводився у контейнері, в якому матеріал надійшов у лабораторію, після закінчення деконтамінації осад матеріалу з контейнера слід перенести стерильною піпеткою об'ємом 5,0–10,0 мл у центрифужну пробірку, врівноважити пробірки й центрифугувати в описаному режимі.

Надосадову рідину відібрати стерильною піпеткою на 5,0–10,0 мл і перенести її в ємність з дезінфікуючим розчином, залишивши в кожній пробірці 1,2–1,5 мл осаду.

Використану піпетку опустити в ємність з дезінфікуючим розчином.

До осаду стерильно додати кілька крапель 6,0 % соляної кислоти або 1,0 % лимонної кислоти до отримання нейтрального значення рН, визначеного індикаторною паперовою смужкою.

Пробірку з осадом помістити у штатив в порядку реєстраційних номерів матеріалу.

Для зниження токсичного впливу на мікобактерії різних залишків речовин (у тому числі можливих хіміопрепаратів) проводять ще одну процедуру відмивання осаду 10,0–15,0 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Супернатант видаляють, а осад в об'ємі 0,8–1,0 мл готують до інокуляції і приготування мазка.

При проведенні процедури деконтамінації необхідно пам'ятати, що центрифугування є однією з найбільш небезпечних процедур відносно ризику утворення інфекційного аерозолі.

Процедури піпетування, переливання з ємності в ємність також повинні бути скорочені до мінімуму і здійснюватись у шафі біобезпеки.

Обробка матеріалу 4,0 % розчином їдкого натру (модифікований метод Петрова). Загальний час обробки матеріалу лугом не повинен перевищувати 40 хвилину.

Обробка за допомогою NaOH є досить жорсткою і може призвести до загибелі у зразку, що досліджується, до 60,0 % мікобактерій. Даний показник не залежить від додаткової загибелі бактерій за рахунок підвищеної температури при центрифугуванні та інших факторів.

Розчин їдкого натру токсичний по відношенню як до супутніх мікроорганізмів, так і до *M. tuberculosis*. Тому при використанні даного методу необхідно суворо дотримуватись вказаних термінів обробки.

Приготування розчинів:

4,0 % розчин їдкого натру (NaOH).

40,0 г їдкого натру заливають дистильованою водою до об'єму 1000 мл.

10,0 % розчин соляної кислоти.

10,0 мл концентрованої соляної кислоти додають до 90,0 мл дистильованої води.

Розчини стерилізують в автоклаві при 121 °C протягом 20 хв.

Методика обробки

Досліджуваний матеріал, який перебуває в стерильному контейнері, залити подвійним об'ємом 4,0 % розчину їдкого натру і помістити на 10–30 сек. на струшувач.

Витримати отриману суміш 15 хв. при кімнатній температурі з періодичним ручним струшуванням. Не перевищувати час експозиції!

Стерильною піпеткою об'ємом 5,0–10,0 мл перенести оброблений матеріал у пробірки.

Пробірки врівноважити і центрифугувати матеріал при 3000 g протягом 15 хв.

Стерильною піпеткою об'ємом 5,0–10,0 мл перенести надосадову рідину в ємкість з дезінфікуючим розчином, залишивши в пробірці 0,8–1,2 мл осаду.

До осаду додати стерильною піпеткою 15,0 мл стерильного 0,9 % розчину хлориду натрію.

Пробірки врівноважити і повторно центрифугувати матеріал при 3000 g протягом 15 хвилин.

Стерильною піпеткою об'ємом 5,0–10,0 мл перенести надосадову рідину в ємність з дезінфікуючим розчином, залишивши в пробірці 1,2–1,5 мл осаду.

До осаду додати 0,5–1,0 мл буферного розчину для отримання нейтрального значення рН.

Закрити пробірку і струснути її вміст.

Пробірку з осадом помістити в штатив, розташувавши її у порядку реєстраційних номерів матеріалу.

4. Обробка інших видів діагностичного матеріалу.

Мазок з носоглотки.

Стерильним пінцетом вносять тампон в стерильну пробірку для центрифугування (50,0 мл). Додають 2,0 мл стерильної дистильованої води.

Проводять обробку матеріалу NaLC-NaOH. Перед додаванням фосфатного буфера тампон видаляють з пробірки.

Промивні води шлунку.

Дослідження промивних вод шлунку має бути проведене впродовж перших чотирьох годин після їх отримання від пацієнта, оскільки із-за високої кислотності *M. tuberculosis* можуть швидко загинути. Зазвичай при дослідженні промивних вод шлунку немає необхідності здійснювати деконтамінацію, якщо проба була узята в стерильний контейнер з дотриманням правил асептики. Увесь об'єм проби центрифугують при 3000 g впродовж 30 хв. Відразу ж після цього роблять посів матеріалу на живильне середовище.

Сеча.

З метою виділення мікобактерій з сечі до зразка рекомендується додати:

на об'єм до 20,0 мл – 1 краплю 1,0 % Твін 80, 1 краплю 20,0 % сульфосаліцилової кислоти і 0,1 мл білкового розчину (7,0–8,0 % стерильного бичачого сироваткового альбуміну, сироватки або плазми);

на об'єм 20,0–30,0 мл – 1 краплю 1,0 % Твін 80, 2 краплі 20,0% сульфосаліцилової кислоти і 0,3 мл білкового розчину (7,0–8,0 % стерильного бичачого сироваткового альбуміну, сироватки або плазми);

об'єм 30,0–50,0 мл – 1 краплю 1,0 % Твін 80, 3 краплі 20,0 % сульфосаліцилової кислоти і 0,5 мл білкового розчину (7,0–8,0 % стерильного бичачого сироваткового альбуміну, сироватки або плазми); Проби сечі залишають на 2 години в холодильнику при 2 °С. Зразки, об'єм рідини в яких перевищує 30,0 мл, слід розділити порівну на дві пробірки. Зразки центрифугують при 3000 g впродовж 20 хв., зливають надосадову рідину. Далі обробку матеріалу проводять за методикою деконтамінації мокротиння (NaLC-NaOH), після чого негайно роблять посів на живильне середовище. Дослідження бактеріоскопії осаду сечі на КСП проводити недоцільно.

Тканини.

Лімфатичні вузли, біоптати і інші тканини, що резецировані під час хірургічного втручання, необхідно подрібнити за допомогою стерильного скальпеля або ножиць і пінцета. Зразок гомогенізують в стерильній фарфоровій ступці або в гомогенізаторі тканин, додавши 0,5–1,0 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію і, при необхідності, невелику кількість стерильного піску. Цю суспензію можна використати для посіву на живильне середовище в тих випадках, якщо вказані вище маніпуляції були проведені з дотриманням правил асептики. Якщо правила асептики не дотримувалися, проводять деконтамінацію проби 4,0 %-м розчином сірчаної кислоти, як це рекомендується робити при обробці сечі. Якщо отриманий матеріал не може бути відпрацьований в день отримання проби, в зразок необхідно додати рівну за об'ємом кількість (не менше 1,0 мл) стерильного ізотонічного розчину, щоб запобігти висиханню тканини. Зберігати матеріал у такому вигляді можливо не більше 48 годин в холодильнику при +4 °С.

Гній.

Гній обробляється так само, як і аспіровані рідини. Якщо гній дуже густий, його слід обробляти так само, як мокротиння.

Спинномозкова рідина.

Стерильно взяту спинномозкову рідину засівають без попередньої обробки.

Якщо стерильність зразка викликає сумніви, можна обробити його за методикою, описаною для мокротиння. Рекомендується проводити посів на рідкі живильні середовища. Якщо дозволяє об'єм зразка, доцільно розділити його на 2 частини, посіявши одну з них без обробки, іншу – після обробки.

Інші біологічні рідини (включаючи плевральну рідину)

Слизово-гнійні рідини.

Обробляють так само як і мокротиння, коли об'єм проби складає 10,0 мл або менше.

Чисті рідини.

Якщо матеріал отриманий з дотриманням правил асептики, його центрифугують при 3000 g впродовж 15 хв. і відразу ж роблять посів осаду на живильне середовище. Якщо об'єм проби перевищує 10,0 мл, її обробляють так само, як промивні води шлунку.

Кров і інші рідкі матеріали з великою домішкою крові після додавання 3,0 % розчину лимоннокислого натрію центрифугують при 3000 g, і осад 3 рази відмивають стерильною дистильованою водою.

M. tuberculosis можуть «приклеюватися» до скла або пластика. Щоб добитися максимального витягання мікобактерій, контейнер обполіскують стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію. Центрифугують розчин при 3000 g впродовж 15 хв. і роблять посів 2–3 крапель осаду на живильне середовище.

Кал.

Близько 5,0 г калу переносять в пробірку. Заливають гіпернасиченим розчином NaCl (у розчині повинна міститися нерозчинена сіль) і залишають на 4 години у ШББ. Зразок фільтрують через стерильну марлю в центрифужну пробірку, центрифугують при 3000 g впродовж 20 хв., зливають надосадову рідину. До осаду додають 0,3 % розчин хлорамфеніколу в пропорції 1:3. Зразок поміщають на ніч в холодильник при 2 °C. Далі проводять обробку матеріалу за методикою деконтамінації мокротиння (NaLC-NaOH). Посів проводять як на щільні, так і в рідкі живильні середовища. Дослідження бактеріоскопії осаду калу на КСП проводити недоцільно.

5. При внутрішньолабораторному контролю якості деконтамінації та оцінка можливих причин контамінації зразка, слід уточнити, чи не був занадто великий інтервал між збором зразка і його обробкою. Якщо це так, необхідно вжити заходів в організації транспортування зразків її організації роботи в лабораторії.

Необхідно строго дотримуватися часу контакту зразка з деконтамінантом. Короткий час контакту призводить до високої частоти контамінації, занадто довгий контакт викликає втрату життєздатності мікобактерій.

Необхідно переконатися, що ротор досягає необхідну відносну силу центрифугування 3000 g і підтримує її впродовж 15 хв.

Контамінація може мати місце серед зразків, оброблених протягом одного дня або серед деконтамінованих зразків, зібраних в якому-небудь одному місці. У таких випадках слід перевірити стерильність розчинів для деконтамінації, виконання процедури деконтамінації або організацію системи збору і транспортування зразків. Якщо виявлені помилки, слід прийняти негайні корегувальні дії. Якщо виявлені проблеми у виконанні процедури, слід провести навчання співробітників лабораторії, що виконують деконтамінацію.

Якщо має місце контамінація зразків від одного і того ж пацієнта, використовувати жорсткішу процедуру деконтамінації для обробки зразків від цього пацієнта. Треба збільшити концентрацію реактиву, але не термін обробки, використати два об'єми розчину для деконтамінації одного об'єму зразка. Таку жорстку процедуру слід застосовувати тільки для обробки контамінованих зразків, а не для всіх зразків.

Крос-контамінація зразків від епідеміологічно не пов'язаних між собою пацієнтів може привести до серії позитивних результатів бактеріологічного дослідження за короткий проміжок часу. У таких випадках слід оцінити можливість крос-контамінації для виключення хибнопозитивних результатів дослідження. Необхідно проаналізувати наступні обставини:

чи мають пацієнти, у яких отриманий позитивний результат культурального дослідження, клінічні симптоми туберкульозу;

чи отриманий позитивний результат культурального дослідження при дослідженні інших зразків від тих же пацієнтів;

чи не були один або декілька зразків із ростом одиничних колоній *M. tuberculosis* оброблені відразу після зразків з великою кількістю КСП.

Якщо крос-контамінація не може бути виключена, слід переконатися, що наступні процедури виконуються правильно:

деконтамінація зразків не проводиться паралельно з посівом культур мікобактерій;

при внесенні розчинів в пробірки не відбувається торкання шийки;

розчини реагентів діляться на аліквоти;

аліквоти розчинів, відкриті впродовж робочого дня, не використовуються повторно;

зразки з високою вірогідністю КСП+ обробляються і засіваються в останню чергу;

контейнери або пробірки із зразками не відкриваються до того, як будуть закриті попередні;

контейнери або пробірки із зразками не відкриваються безпосередньо після дістання з центрифуги;

надосадова рідина акуратно зливається в контейнер, що містить дезінфікуючий розчин, уникаючи розпліскування, наприклад, через воронку.

- рукавички в ході роботи міняються часто і ніколи не використовуються повторно.

Тестування якості деконтамінації з використанням референс-штамупроводять з використанням референс-штаму мікобактерій. Можна використати будь-який доступний референс-штам або добре вивчений клінічний ізолят мікобактерій.

Прийнятніше використати швидкорослі НТМБ (*M. fortuitum* та ін.). При проведенні тестування оцінюється швидкість і рясність зростання деконтамінованої і необробленої суспензії мікобактерій.

Тестування проводиться щомісячно; кожного разу при зміні реагентів; у разі неадекватного рівня контамінації або при незадовільних результатах контролю якості – щотижня.

Готують суспензію *M. fortuitum* в 2,0 мл стерильного фосфатного буфера за стандартом каламутності McFarland 1.

Суспензія 1: 0,1 мл суспензії вносять в 9,9 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Суспензія 2: 1,0 мл суспензії 1 вносять в 9,0 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Засівають по 0,2 мл суспензії 1 в дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена. Засівають по 0,2 мл суспензії 2 в дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена.

Залишки суспензії 1 і суспензії 2 піддають повній процедурі деконтамінації і центрифугування. Осад суспензії 1 ресуспендують в 1,0 мл стерильного буфера (суспензія 3). Осад суспензії 2 ресуспендують в 1,0 мл стерильного буфера (суспензія 4).

Засівають по 0,2 мл суспензії 3 в дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена. Засівають по 0,2 мл суспензії 4 в дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена.

Засівають по 0,2 мл суспензії 4 в дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена.

Облік результатів.

Через 5–7 днів інкубації оцінюють рясність росту *M. fortuitum*.

У пробірках, засіяних суспензією 1, має бути отримано густий ріст *M. fortuitum* (3+), в пробірках, засіяних суспензією 2, – помірний ріст (2+).

У пробірках, засіяних суспензіями 3 і 4, має бути отриманий такий ж ріст (3+, 2+), або на ступінь нижче (2+, 1+).

У разі використання іншого референс-штаму слід проводити облік густоти росту після закінчення терміну, достатнього для появи видимого росту цього референс-штаму.

Процедурі деконтамінації і центрифугування піддають пробірку з середовищем Middlebrook 7H9 або ізотонічним розчином хлориду натрію, засіяну *E. coli*. Через 3 дні оцінюють наявність росту *E. coli* в контрольній

пробірці і інших пробірках, оброблених одночасно, з метою встановлення можливої крос-контамінації.

Можна піддати процедурі деконтамінації і центрифугування незасіяну пробірку з середовищем Middlebrook 7H9 або ізотонічним розчином хлориду натрію. Через 3 дні оцінюють наявність росту в контрольній пробірці.

Статистична оцінка рівня контамінації.

Для оцінки рівня контамінації визначають питому вагу контамінованих пробірок від загального числа засіяних пробірок для кожного живильного середовища. Така оцінка проводиться щомісячно, у разі неадекватного рівня контамінації або при незадовільних результатах контролю якості – щотижня. Розрахунок рівня контамінації проводиться по наступній формулі:

$$\text{Рівень контамінації} = \frac{\text{число контамінованих пробірок}}{\text{загальна кількість засіяних пробірок}} \times 100 \%$$

Допустимий рівень контамінації для посівів на щільні живильні середовища складає, 2,0–5,0 %. Незадовільним вважається показник як більше 5,0 %, так і менше 2,0 %.

Допустимий рівень контамінації для посівів в рідкі живильні середовища складає 6,0–8,0 %.

Якщо він перевищує 10,0 %, використання рідких середовищ економічно недоцільне.

Високий рівень контамінації може бути викликаний наступними причинами:

- недостатній час деконтамінації;
- низька концентрація NaOH, NALC;
- розчин NALC-NaOH приготований більше 24 годин назад;
- незадовільна якість реагентів;
- проблеми з референс-штамом (нежиттєздатний, неправильна каламутність суспензії);
- нестерильні розчини.

Низький рівень контамінації, відсутність росту або повільно мізерний ріст культур мікобактерій може бути викликаний наступними причинами:

- перевищення часу деконтамінації зразків більше 20 хв.;
- завищена концентрація NaOH, NALC;
- незадовільна якість реагентів;
- проблеми з референс-штамом (нежиттєздатний, неправильна каламутність суспензії);
- неадекватний рівень рН (вище 8);
- неадекватний режим центрифугування (час, швидкість, температура).

Дії при відхиленнях від норми рівня контамінації.

У випадках відхилення рівня контамінації від норми слід переконатися, що в лабораторії дотримуються наступні вимоги внутрішнього контролю якості:

- адекватні якість, термін придатності, концентрації реагентів і розчинів;
- приготований робочий розчин використовується впродовж 24 ч;

pH розчинів і зразка після деконтамінації не перевищує 8,0;
 термін експозиції з деконтамінуючим розчином не перевищує 20 хв.;
 розчини і живильні середовища стерильні;
 адекватна якість стерилізації в автоклаві і сухожаровій шафі;
 адекватна якість контрольного штаму *M. fortuitum*.

При будь-якому відхиленні від задовільних показників деконтамінації слід проаналізувати отримані результати і можливі причини.

Якщо в період, за який зареєстровані відхилення рівня контамінації, результати внутрішнього контролю якості живильних середовищ, обладнання і внутрішнього контролю якості деконтамінації, проведеної з використанням тест-штаму, були задовільними, зміни в методикі деконтамінації не вносять, спостерігають за рівнем контамінації при використанні нової партії середовища.

Якщо мають місце незадовільні результати внутрішнього контролю якості деконтамінації, негайно роблять заходи до підвищення якості методу.

V. ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА, ПОСІВИ І КУЛЬТИВУВАННЯ

1. Для посіву діагностичного матеріалу використовують живильні середовища, серед яких можна виділити 3 основних групи:

- щільні живильні середовища на яєчній основі;
- щільні або напіврідкі живильні середовища на агаровій основі;
- рідкі живильні середовища;
- рідкі синтетичні і напівсинтетичні живильні середовища.

Кожне з цих середовищ має свої переваги і недоліки. Оптимальне середовище для культивування *M. tuberculosis* повинне бути недорогим, простим в приготуванні, складатися з доступних компонентів. Крім того, середовище повинне пригнічувати ріст супутньої мікрофлори, забезпечувати хороший ріст при посіві невеликої кількості мікобактерій і можливість попередньої диференціації колоній, що вирости, за морфологічними ознаками. Тобто оптимальне середовище повинне мати добрі інгібуючі, ростові та диференційні властивості. Яєчні середовища найбільшою мірою відповідають вищезазначеним вимогам при проведенні посіву з мокротиння.

Переваги яєчних середовищ:

- економічність (найбільш дешеві зі всіх середовищ, що використовуються для виділення мікобактерій) і простота приготування;
- можуть зберігатися в холодильнику до 4 тижнів;
- добре підтримують ріст більшості штамів *M. tuberculosis*;
- дозволяють проводити попередню ідентифікацію мікобактерій за морфологією колоній;
- малахітовий зелений, що входить до складу середовищ, пригнічує ріст супутньої мікрофлори, яка росте швидко, зменшуючи вірогідність контамінації посівів.

Недолік яєчних середовищ:

поява росту мікобактерій на протязі від 2 до 12 тижнів і більше.

у процесі культивування з'являється ріст супутньої мікрофлори, він відмічається на всій поверхні живильного середовища, внаслідок чого ці пробірки необхідно відбракувати.

Для підвищення результативності бактеріологічного дослідження рекомендується застосовувати посів діагностичного матеріалу одночасно на живильних середовища різного складу.

Для бактеріологічної діагностики ТБ використовувати як мінімум два різних за складом живильних середовища. Найбільш широко використовуються в Україні 2 яєчних середовища – Левенштейна-Єнсена і Фінна-ІІ.

Середовище Левенштейна-Єнсена – щільне яєчне середовище, на якому хороший ріст *M. tuberculosis* одержують приблизно на 18–25 добу після посіву клінічного матеріалу з позитивним результатом мікроскопії на КСБ. До складу цього живильного середовища входить гліцерин, який сприяє росту *M. tuberculosis*. Для виділення *M. bovis* рекомендується варіант середовища Левенштейна-Єнсена, до складу якого замість гліцерину входить 0,5 % розчин пірувату натрію.

Середовище Фінна-ІІ

Середовище Фінна-ІІ відрізняється від середовища Левенштейна-Єнсена тим, що замість L-аспарагіну в ньому використовується глютаміновокислий натрій (глутамат натрію) і склад солей розрахований так, що кінцева кислотність середовища має нижчі значення (рН 6,3–6,5), ніж у середовищі Левенштейна-Єнсена (рН 7,2–7,4), і більшу стабільність. Ці властивості обумовлюють більш високу ефективність середовища при посіві матеріалу, обробленого лужними детергентами.

Ріст мікобактерій з'являється на цьому середовищі на декілька днів раніше, ніж на середовищі Левенштейна-Єнсена, а відсоток виділення культур на 6,0–8,0 % вищий.

2. Приготування якісних живильних середовищ.

Вода для приготування живильних середовищ повинна бути дистильованою, вільною від речовин, які можуть сповільнити ріст мікроорганізмів.

Дистильовану воду зберігають у контейнерах, виготовлених з інертних матеріалів (наприклад з нейтрального скла, поліетилену тощо), які повинні бути вільні від будь-яких інгібуючих речовин.

Усі реактиви, що використовують для приготування живильних середовищ, повинні мати ступінь очищення не менше категорії «ХЧ».

Посуд для приготування живильних середовищ має бути досить великого об'єму, щоб було зручно перемішати середовище. Не слід готувати в одній ємності більше 2,0 л середовища.

При приготуванні середовищ необхідно використовувати хімічно чистий лабораторний посуд, а також свіжо приготовану дистильовану воду.

Всі живильні середовища чутливі до нагрівання, тому не треба їх нагрівати довше, ніж того потребує процедура.

Для отримання якісного середовища і уникнення забруднення його сторонньою мікрофлорою рекомендується слідувати наступним основним правилам:

- приміщення, де готують живильні середовища, утримують в максимальній чистоті. Рекомендується регулярно мити підлогу з додаванням дезінфікуючого засобу, а також протирати дезінфектантом обладнання і робочі поверхні. Перед приготуванням середовищ необхідна обробка приміщення УФ-опромінювачем;
- використовувати тільки стерильний посуд;
- використовувати точно зважені кількості реагентів;
- правильно проводити приготування розчинів: використовувати мірний посуд, доводити об'єм розчину по нижній межі меніска;
- постійно контролювати температуру у згортувачі. Не допускати перегріву середовищ у згортувачі;
- строго дотримуватись вимог асептики;
- ретельно обробляти поверхню яєць перед їх розбиванням для приготуванні яєчної маси;
- не піддавати готове середовище дії УФ променів. Зберігати готові середовища у темному прохолодному місці;
- проводити контроль якості кожної партії приготованих середовищ;
- не економити при розливі середовища у пробірки, рекомендується розливати в пробірки по 5,0 мл середовища.

Для приготування щільних яєчних живильних середовищ використовують сольову основу різного складу, в залежності від найменування середовища, яке потрібно приготувати, яєчну масу і розчин малахітового зеленого (антисептик, який запобігає росту на середовищі не мікобактеріальної мікрофлори).

Нижче наведені склад і рекомендації щодо приготування найбільш поширених щільних яєчних середовищ – Левенштейна-Єнсена і Фінна-П.

Середовище Левенштейна-Єнсена

Склад середовища

Розчин мінеральних солей:

Калій однозаміщений фосфорнокислий KH_2PO_4	– 2,4 г
Магній лимоннокислий $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Mg}_3)_2 \times 14\text{H}_2\text{O}$	– 0,6 г
Магній сірчанонокислий $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,24 г
L-аспарагін	– 3,6 г
Гліцерин	– 12,0 мл
Вода дистильована	– 600 мл

Зазначені інгредієнти розчиняють в теплій дистильованій воді у вказаній послідовності при слабкому підігріванні (не доводячи до кипіння) на водяній бані. L-аспарагін рекомендується розчинити окремо і вносити останнім. Потім сольовий розчин стерилізують в автоклаві при 1атм. (121°C) протягом 30 хв. Термін зберігання розчину становить 3–4 тижні при кімнатній температурі.

Примітка. Для культивування *M. bovis* середовище Левенштейна-Єнсена збагачують 0,5 % піруватом натрію, виключивши з сольового розчину гліцерин. З цією метою до складу сольового розчину замість гліцерину додають 8,0 г пірувату натрію.

Розчин малахітового зеленого:

Малахітовий зелений	2,0 г
Стерильна дистильована вода	100 мл

Наважку порошку малахітового зеленого розчинити в стерильній теплій дистильованій воді і помістити розчин в термостат на 1,0–2,5 години для більшого розчинення (рекомендується часте помішування, оскільки порошок розчиняється дуже погано). Потім профільтрувати розчин через паперовий фільтр, розлити по флаконах або невеликих колбах і стерилізувати при 1 атм. (121 °С) протягом 30 хв. Приготований розчин не підлягає тривалому зберіганню і при появі осаду або зміні забарвлення його слід замінити свіжим розчином.

Яєчна маса.

Свіжі (не більше 7 днів) дієтичні курячі яйця без тріщин і дефектів шкаралупи ретельно відмивають в теплій проточній воді за допомогою ручних щіток і лужного мила. Потім яйця занурюють в 70,0 % етиловий спирт на 30 хв.

Перш ніж почати роботу з чистими і сухими яйцями, рекомендується ретельно вимити руки з милом і щіткою. Потім в стерильному боксі розбивають яйця стерильним ножом в стерильний посуд, доводячи загальний об'єм яєчної маси до 1000 мл (для цього потрібно в середньому 20–25 яєць в залежності від їх розміру).

Необхідна кількість яєчної маси визначається за об'ємом, а не за кількістю яєць.

Ретельно перемішують яєчну масу стерильним вінчиком або в стерильному міксері при мінімальній швидкості. Необхідно мінімізувати утворення піни!

Приготування середовища

У велику стерильну ємність, дотримуючи правила асептики, поміщають наступні розчини:

розчин мінеральних солей	600 мл;
гомогенізована яєчна маса	1000 мл.

Суміш ретельно перемішують і фільтрують через стерильний марлевий фільтр, що має не менш 4 шарів марлі. Додають 20,0 мл розчину малахітового зеленого, ретельно перемішують, уникаючи утворення піни. Одразу розливають в пробірки приблизно по 5,0 мл, стежачи за тим, щоб в розчині не сформувався осад. Не допускайте попадання піни в пробірки!

Згортання середовища

Для згортання середовища використовуються спеціальні апарати – згортувачі. Пробірки з розлитим в них середовищем поміщають в спеціальні касети з підібраним кутом нахилу для формування скосу середовища заввишки

8,0–10,0 см. Штативи встановлюють в згортувач і проводять коагуляцію при 80–85 °С протягом 30 хвилин.

Згортання не є процедурою стерилізації, а лише коагуляції.

Стерильність середовища забезпечується стерильними умовами його приготування і розливу.

Приготування і розлив живильного середовища проводиться в умовах дотримання стерильності, якість приготованого яєчного середовища залежить від дотримання температурного і часового режимів коагуляції.

Зберігання середовища

Приготована партія середовища повинна мати етикетку з датою виготовлення і зберігатися в холодильнику при +4 °С з ретельно закритими пробками для запобігання висиханню. Термін зберігання середовища не повинен перевищувати 4 тижні.

Середовище Фінна-ІІ

Склад середовища

Розчин мінеральних солей:

Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \times 7H_2O$	– 0,5 г
Натрій лимоннокислий $C_6H_5O_7Na_3 \times 5,5H_2O$	– 1,0 г
Галун залізоамонійний $Fe(NH_4) \cdot (SO_4)_2 \times 12H_2O$	– 0,05 г
Калій однозаміщений фосфорнокислий KH_2PO_4	–20,0 г
Амоній лимоннокислий однозаміщений $C_8H_{11}O_7N$	– 5,0 г
Натрій глютаміновоокислий однозаміщений $C_5H_8NNaO_4 \times$	–10,0 г

H_2O

Гліцерин – 20,0 мл

Вода дистильована – до 1000 мл

Перелічені інгредієнти розчиняють в дистильованій воді у вказаній послідовності при слабкому підігріванні (не доводячи до кипіння) на водяній бані. Кислотність не коригують. Стерилізують в автоклаві при 1 атм. (121 °С) протягом 30 хв. Термін зберігання розчину складає 3–4 тижні при кімнатній температурі.

Розчин малахітового зеленого.

Яєчна маса.

Приготування середовища. Згортання середовища та зберігання аналогічні у розділі в опису середовища Левенштейна-Єнсена.

3. Внутрішньолабораторний контроль якості щільних живильних середовищ. Приготоване яєчне середовище після його коагуляції повинне бути візуально оцінене. Правильно приготоване середовище повинне бути щільним і міцно прилипати до стінок пробірки. Вміст конденсату в пробірці з середовищем не повинен перевищувати 0,2 мл. Знебарвлення середовища або поява поглиблень або бульбашок усередині середовища та на його поверхні свідчать про надмірну температуру коагуляції. Партія середовища з виявленими недоліками не може використовуватися для посіву і повинна бути знищена.

Однією з обов'язкових процедур внутрішнього контролю якості є перевірка приготованого середовища на стерильність і на ростові властивості.

Тест на стерильність

Після згортання кожна приготована партія середовища спочатку піддається контролю на стерильність. З цією метою 6 пробірок з свіжоприготовленої партії середовища поміщають в термостат при 37 °С і витримують протягом 3 діб, що достатньо для росту забруднюючих мікроорганізмів.

Якщо проростає супутньою мікрофлорою, принаймні, 1 пробірка, то аналогічним чином повинні бути перевірені 10 додаткових пробірок. Якщо хоч би в одній з цих 10 пробірок з'являється ріст, аналогічним чином повинні бути перевірені всі пробірки даної партії. Всі пробірки з ростом забруднюючої мікрофлори слід видалити. Решта не контамінованих пробірок може бути використана.

Тест на перевірку ростових якостей середовища.

Необхідно проводити тестування ростових якостей кожної партії середовища за допомогою стандартного тест-штаму. Як тест-штам рекомендується використовувати лабораторний (музейний) штам *M. tuberculosis* H₃₇R_v. Для приготування суспензії необхідно зробити змив 4-тижневої культури зі всієї поверхні щільного середовища, гомогенізувати суспензію за допомогою струшування з скляними намистами на струшувачі (вортексі) протягом 1 хвилини і приготувати декілька її розведень.

Розвести бактеріальну суспензію за стандартом мутності 1 McF (3×10^8 КУО/мл) – суспензія № 1.

Приготувати серійні 10-кратні розведення культури з суспензії № 1, щоб одержати 3×10^3 і 3×10^4 бактерії в 1,0 мл.

Засіяти по 0,2 мл кожної із суспензій (3×10^3 і 3×10^4) на дві пробірки приготованої партії середовища. Розподілити інокулят по поверхні пробірок. Подальша інкубація – у звичайному порядку. Реєструвати щотижня ріст і відносний розмір колоній в пробірках, порівнюючи ріст на ново-приготованій партії середовища з результатами росту, одержаними на попередній партії середовища і зафіксованими в журналі приготування середовищ (термін появи росту, кількість і розмір колоній).

Посів розведень 3×10^3 і 3×10^4 повинен дати ріст 1–10 і 10–100 колоній відповідно. При таких результатах росту на середовищах, що контролюються, їх якість вважають задовільною.

Контроль ростових властивостей середовища можна проводити одночасно з посівом діагностичного матеріалу. У разі незадовільної якості середовища негативні результати посіву, одержані на ній, вважаються недостовірними. Залишки незасіяного середовища повинні бути знищені.

Реєстрація результатів контролю якості середовища

Результати контролю якості середовищ фіксують в журналі приготування середовищ. У журналі приготування середовищ повинні бути вказані: дата приготування середовища; об'єм приготованого середовища або кількість

розлитих пробірок; ПБ лаборанта, що приготував середовище; результати тесту на стерильність і на ростові якості (час появи росту для обох штамів, кількість колоній в різних розведеннях); дата проведення контролю; ПБ лаборанта, що проводив контроль якості середовища; висновок про придатність середовища. Нове середовище придатне до вживання, якщо ріст на ньому еквівалентний або кращий, ніж на попередньому середовищі. Не використовуйте партію середовища, якщо ріст на ньому гірше, ніж на попередній партії.

4. Техніка посіву та інкубації на щільному середовищі.

Мікроскопічне та бактеріологічне дослідження повинні проводитися паралельно з однієї і тієї ж проби діагностичного матеріалу.

Процедура посіву.

Перед процедурою посіву необхідно підготувати пробірки з живильними середовищами, пронумерувати їх, відповідно до реєстраційних номерів зразків, і послідовно розташувати у вертикальному штативі. Аналогічним чином підготувати і пронумерувати предметні скельця.

Осад, одержаний після попередньої обробки діагностичного матеріалу одним з вищезгаданих методів, необхідно піддати паралельно бактеріологічному і мікроскопічному дослідженням в наступному порядку.

Перед початком відбору посівного матеріалу в піпетку слід переконатися в тому, що номер пробірки з посівним матеріалом відповідає номерам пробірок з поживним середовищем і номеру предметного скла для приготування мазків:

набрати стерильною мірною піпеткою (краще одноразовою пастерівською пластиковою) 1,0–1,2 мл підготовленого осаду, залишивши приблизно 0,1–0,2 мл для подальшого приготування мазка для мікроскопії;

дотримуючись умов стерильності, внести необхідні об'єми набраного матеріалу в 2 пробірки з різними щільними живильними середовищами;

пробірки з живильним середовищем при посіві повинні знаходитися в похилому положенні (під кутом 40–45 °);

посівний матеріал нанести на верхню третину скосу живильного середовища;

засіяні пробірки закрити пробками і помістити в штатив так, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всій поверхні скосу живильного середовища; краще використовувати пробірки з кришками, що загвинчуються;

залишок осаду забрати тією ж піпеткою і нанести на заздалегідь підготоване і пронумероване предметне скло 2–3 краплі осаду для отримання мазка для мікроскопічного дослідження, розподіливши матеріал рівномірним шаром в центрі скла на площі приблизно 1,0x2,0 см;

використану для посіву і приготування мазка піпетку опустити в ємкість з дезінфікуючим розчином;

після закінчення посіву всіх проб засіяні пробірки перемістити в горизонтальні штативи і помістити в термостат при температурі 37 °С; при цьому поверхня скосу живильного середовища повинна знаходитися в горизонтальній площині, а нахил штатива повинен виключити змочування

пробки матеріалом посіву в разі використання ватно-марлевих пробок.

Інкубація посівів з метою виділення *M. tuberculosis* вимагає тривалого терміну для отримання видимого росту колоній. Тривалий термін інкубації вимагає дотримання низки правил для збереження життєздатності клітин мікобактерій і ростових властивостей живильного середовища.

Оптимальна температура інкубації – 37 °С.

При первинному посіві мікроскопічно негативного матеріалу середня тривалість росту мікобактерій на щільних живильних середовищах може становити 20–46 діб. Ріст окремих штамів з'являється через 60 і навіть більше. Це обумовлює необхідність, в разі відсутності росту мікобактерій, витримувати посіви в термостаті до 10 тижнів для видачі негативного результату.

У процесі інкубації посівів необхідно дотримуватись наступного:

у разі використання ватно-марлевих пробок після закінчення першої доби інкубації їх замінюють герметичними;

пробірки переводять у вертикальне положення;

інкубацію проводять протягом 10 тижнів при обов'язковому щотижневому перегляді пробірок з посівами;

для полегшення процедури щотижневого перегляду і обліку, посіви, які виконані протягом одного дня, розміщувати в окремих ящиках з матеріалу, який піддається обробці дезінфектантами і автоклавуванню, або штативах у порядку номерів реєстрації; кожен штатив або ящик слід супроводжувати етикеткою, на якій указується дата посіву, перший і останній реєстраційний номер партії.

5. Оцінка результатів посіву.

При оцінці результатів культурального дослідження діагностичного матеріалу необхідно дотримуватись наступних правил.

Спостереження за посівами і перегляд пробірок з посівами слід проводити щотижня.

За відсутності росту посіви повинні витримуватися в термостаті протягом 10 тижнів. Негативний результат бактеріологічного дослідження може бути виданий тільки після закінчення цього терміну інкубації.

Під час чергового перегляду слід відбирати всі пробірки, в яких є ріст колоній, розставляючи їх по порядку номерів реєстрації матеріалу.

При оцінці результатів реєструвати наступні параметри:

«появу росту» – дату появи росту в пробірках (в тому випадку, якщо ріст з'являється одночасно в обох пробірках). Якщо культура виросла тільки в одній з пробірок (при цьому є хороший ріст культури у відповідні терміни), а в другій ріст відсутній, рекомендується зареєструвати дату появи росту і показник росту в пробірці з культурою, що виросла, і використовувати її для подальшої роботи, не чекаючи появи росту колоній в іншій пробірці. Другу пробірку залишають в термостаті для подальшої інкубації і за наявності в ній росту надалі реєструють отримані результати;

«інтенсивність росту» – число колоній, що виросли в кожній з пробірок. За наявності одночасного росту у пробірках рекомендується оцінити кількість

КУО у кожній пробірці, що засіяна даним матеріалом. Цей показник має важливе діагностичне і прогностичне значення, особливо якщо посіви проводяться в динаміці спостереження за хворим в процесі хіміотерапії;

«проріст» сторонньою мікрофлорою або грибами, при наявності такого;
«відсутність росту» (вказаний параметр реєструється через 10 тижнів культивування).

Дотримання вказаних правил дозволяє, по-перше, своєчасно виявляти видимий ріст мікобактерій або супутньої мікрофлори, а по-друге, на підставі реєстрації термінів появи росту і його особливостей здійснювати первинну ідентифікацію мікобактерій.

Поява росту кислотостійких мікобактерій протягом 7–10 днів культивування на щільних живильних середовищах може свідчити про виділення нетуберкульозних мікобактерій, що швидко ростуть, які не належать до комплексу *M. tuberculosis*, тому перед видачею відповіді такі культури повинні піддатися первинній ідентифікації;

поява росту кислотостійких мікобактерій після 3–4 тижнів культивування свідчить про виділення *M. tuberculosis*, а також інших мікобактерій, що повільно ростуть, які можуть належати до потенційно патогенних нетуберкульозних мікобактерій або до нешкідливих кислотостійких сапрофітів.

Під час щотижневих переглядів посівів при підозрі на забруднення сторонньою мікрофлорою необхідно видалити і знешкодити ті пробірки, в яких відмічається забруднення всієї поверхні живильного середовища або зміна самого живильного середовища (розрідження або знебарвлення).

Мікроорганізми, що забруднюють посіви, мають здатність розкласти інгредієнти середовища з утворенням кислоти; це призводить до зниження рН середовища. На такому середовищі мікобактерії не ростуть, і такі пробірки підлягають видаленню.

Посіви з частковим забрудненням необхідно витримати до закінчення терміну інкубації або до розвитку хоч би декількох колоній мікобактерій, оскільки пізня поява забруднення не виключає ріст *M. tuberculosis*. У таких випадках необхідно зробити мазок, пофарбувати його за методом Ціля-Нільсена і за наявності кислотостійких мікобактерій обробити культуру, що виросла, 3,0–4,0 % розчином сірчаної кислоти, а після відмивання її ізотонічним розчином хлористого натрію знову посіяти осад на живильні середовища.

В усіх випадках отримання росту, щоб уникнути невірної результату, відповідь про виділення кислотостійких мікобактерій видається тільки після мікроскопії мазка з колоній, що виросли, забарвленого за методом Ціля-Нільсена.

Характеристика колоній *M. Tuberculosis*.

Вірулентні культури *M. tuberculosis* ростуть на щільних живильних середовищах у вигляді R-колоній різного розміру та вигляду, мають жовтуватий або злегка кремовий відтінок (колір слонової кістки), шорстку поверхню, що нагадує манну крупу або кольорову капусту. Колонії сухі,

зморшкуваті, але у разі дисоціації можуть зустрічатися і вологі, злегка пігментовані колонії, рожево-жовтий пігмент яких різко відрізняється від оранжевого або жовтого пігменту сапрофітних або деяких нетуберкульозних мікобактерій. Останні ростуть в S-формі. Слід зазначити, що на середовищі Фінна-П колонії часто виглядають вологішими, ніж на середовищі Левенштейна-Єнсена.

Після курсу хіміотерапії від хворих на туберкульоз можуть виділятися гладкі колонії з вологим ростом (S-форми).

При приготуванні мазків для мікроскопічного дослідження колонії *M. tuberculosis* проявляють свої фізико-хімічні особливості: вони не емульгуються в ізотонічному розчині, а утворюють зернисту крихтоподібну суспензію.

При мікроскопічному дослідженні мазків з колоній, забарвлених за Цілем-Нільсеном, виявляються яскраві малиново-червоні паличкоподібні бактерії, що розташовуються поодинокі або групами. При культивуванні на рідких середовищах або в умовах підвищеної вологості *M. tuberculosis* утворюють скупчення або переплетення у вигляді «кіс» – феномен «корд-фактора».

M. tuberculosis виглядають як тонкі, прямі або злегка зігнуті палички довжиною 1–10 (частіше 1–4) мкм, шириною 0,2–0,6 мкм, гомогенні або зернисті з ледь закругленими кінцями. Часто в препараті, особливо з культур, що тривало ростуть, видно скупчення темно забарвлених зерен. У молодих культурах, особливо виділених від хворих, що тривало лікуються протитуберкульозними препаратами, мікобактерії відрізняються великим поліморфізмом аж до появи коротких, майже кокоподібних, форм.

Нетуберкульозні мікобактерії та авірулентні сапрофітні мікобактерії можуть варіювати за формою колоній і морфологією клітин. Деякі з них грубіші, товщі, іноді менш інтенсивно забарвлені, рідко утворюють джгутоподібні скупчення («корд-фактор», як правило, відсутній). Проте деякі види нетуберкульозних мікобактерій (фотохромогенні) можуть рости у вигляді характерної для *M. tuberculosis* R-формі. Багато нетуберкульозних мікобактерій і сапрофітних мікобактерій мають кислотостійкі зерна, схожі за морфологією з такими у вірулентних *M. tuberculosis*.

Остаточний висновок про належність виділеної культури до комплексу *M. tuberculosis* можна зробити тільки після проведення первинної диференціації культури, що здійснюється в ході постановки тесту медикаментозної чутливості. Необхідно проводиться подальша ідентифікація виділеної культури, що дозволяє віднести мікобактерії до того або іншого виду.

Облік результатів посіву

При виділенні культури кислотостійких мікобактерій відповідають певним характеристикам, а саме:

поява росту колоній на щільних живильних середовищах не раніше, ніж через 3–4 тижні інкубації;

наявність колоній характерної морфології і забарвлення;

мікроскопічне підтвердження кислотостійкості виділеного мікроорганізму при забарвленні за методом Ціля-Нільсена необхідно провести напівкількісну оцінку інтенсивності росту.

Всі характеристики мікобактерій, що вирости на щільних живильних середовищах, заносяться в лабораторний журнал обліку результатів культуральних досліджень, в бланки відповідей, а також у картотеку. Результати дослідження реєструються та зберігаються в лабораторному модулі Реєстру хворих на ТБ.

6. Дослідження з використанням рідких живильних середовищ. Автоматичні та напівавтоматичні аналізатори

Аналізатор ВАСТЕС MGIT 960/320 являє собою повністю автоматизований комплекс для одночасної інкубації та моніторингу 960 /320 пробірок. Культивування мікобактерій здійснюється в індикаторній пробірці MGIT, що містить 7,0 мл модифікованого середовища Middlebrook 7H9. Дана система дозволяє виявляти у клінічних зразках більшість штамів *M. tuberculosis* протягом 10–20 днів і визначати чутливість культури збудника до медикаментозних препаратів в термін, що не перевищує двох тижнів.

Аналізатор ВАСТЕС MGIT 960/320 є єдиною повністю автоматизованою системою для визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів, яка забезпечує прискорене тестування культури до практично усіх препаратів, в тому числі і до піразинаміду.

7. Матеріалом дослідження на аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960/320 можуть бути респіраторні зразки, в першу чергу мокротиння, будь-які біологічні рідини (крім крові і сечі), а також виділення ран, промивні води шлунку і тканини організму, отримані при хірургічних втручаннях. Умови збору діагностичного матеріалу і його якість повинні відповідати існуючим вимогам, оскільки преаналітичний етап значно впливає на результати дослідження. Найбільш зручною ємкістю для збору клінічних зразків слід вважати стерильну градуйовану пробірку на 50,0 мл з кришкою, що загвинчується і перешкоджає розбризкуванню матеріалу при відкриванні. Оптимальна кількість рідкого діагностичного матеріалу повинна складати приблизно 5,0 мл.

Перед інокуляцією у рідкі середовища розрідження і деконтамінацію матеріалу рекомендується проводити з використанням NALC-NAOH (за методом Kubika) з подальшим отриманням осаду в результаті центрифугування (при 3000 g протягом 15 хв.). Цей метод дозволяє перетворити зразок в сконцентровану гомогенну суспензію, в якій практично знищена будь-яка мікрофлора, крім мікобактерій, що зберегли життєздатність. При такій обробці одним з факторів збільшення ефективності культурального (як і мікроскопічного) дослідження є збереження реакції середовища, близькою до нейтральної (рН 6,8).

Виявлення мікобактерій з використанням системи бульйонного культивування обов'язково передбачає паралельний посів зразка на щільне яєчне середовище. Інокуляцію діагностичного матеріалу в рідке середовище

проводять одночасно з посівом на щільне ячне середовище, що необхідно для більш повного задоволення живильних потреб мікобактерій, які можуть дати ріст лише на одному із середовищ. Цей принцип дозволяє також уникнути деяких помилок, пов'язаних з технічними похибками, неправильною інтерпретацією росту в позитивній пробірці.

З метою підтвердження належності культури, що виросла на рідкому середовищі будь-якого аналізатора, до комплексу *M. tuberculosis* необхідно проводити бактеріоскопію за Цлем-Нільсеном і субкультивування на щільному ячному середовищі вмісту позитивної процесорної ємкості. Використання ПЛР-аналізу (ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція) з метою диференціювання комплексу *M. tuberculosis* і НТМБ при отриманні позитивних результатів в автоматизованій системі може на 7 і більше днів скоротити час бактеріологічної діагностики туберкульозу.

8. Застосування автоматизованої системи ВАСТЕС MGIT 960/320 для бактеріологічної діагностики туберкульозу Аналізатор ВАСТЕС MGIT 960/320 працює на принципах технології MGIT: індикаторні пробірки після внесення у них діагностичного матеріалу інкубуються у приладі і періодично піддаються УФ-тестуванню.

Важливим компонентом системи ВАСТЕС MGIT 960/320 є пробірка MGIT з флуоресцентним індикатором, світіння якого погашене киснем. Мікробна популяція, що розмножується, активно поглинає кисень, вивільняючи флуоресцентний компонент, який починає світитися в промені ультрафіолетового світла.

Прискорення росту мікобактерій і зниження контамінації забезпечується доповненням бульйону 7H9 рідкою живильною добавкою OADC і п'ятьма ліофілізованими антибіотиками PANTA, які вносять до індикаторної пробірки перед посівом. OADC містить чотири живильні компоненти: олеїнову кислоту, бичачий сироватковий альбумін, декстрозу і каталазу. Суміш PANTA включає препарати, що пригнічують життєдіяльність Грам+, Грам– і анаеробних бактерій, а також грибів; вона складається з поліміксину В, амфотерицину В, налідиксової кислоти, триметоприму і азлоциліну. Прилад ВАСТЕС 960 оцінює пробірку як позитивну, якщо кількість живих мікроорганізмів у ній досягла 10^5 – 10^6 на 1,0 мл середовища.

Таким чином, прилад ВАСТЕС MGIT 960/320 здійснює комп'ютерний моніторинг стану бактеріальної популяції у збагаченому рідкому живильному середовищі Middlebrook 7H9 і сигналізує про розмноження мінімального числа мікроорганізмів.

Реагенти і витратні матеріали

MGIT tube, 7,0 ml (Пробірки MGIT, 7,0 мл)

Пробірки призначені для культивування мікобактерій з використанням приладу ВАСТЕС 960/320. У кожній пластиковій пробірці з кришкою, що загвинчується, міститься 7,0 мл середовища Міддлбука 7H9, яке перед інокуляцією збагачується живильними добавками і антимікробними речовинами для запобігання контамінації. Інокулятом можуть служити

заздалегідь оброблені (розріджені, деконтаміновані і концентровані) клінічні зразки, за винятком сечі, стерильні біологічні рідини (виключаючи кров) і культури мікобактерій. Пробірки також призначені для визначення медикаментозної чутливості мікобактерій, за виключенням піразинаміду. Пробірки поставляються у картонній коробці, що містить 100 пробірок. Температура зберігання 2–25 °С.

MGIT 960/320 Supplement (Додатковий набір)

Набір включає 6 флаконів з 15,0 мл ростової добавки OADC, що містить олеїнову кислоту, бичачий альбумін, глюкозу і каталазу, а також 6 флаконів з ліофілізованою сумішшю антибіотиків PANTA, що містять поліміксин Б, амфотерицин Б, налідиксову кислоту, триметоприм і азлоцилін. Кожен набір розрахований приблизно на 100 пробірок, температура зберігання 2–8 °С.

MGIT 960/320 IRE Kit

Набір призначений для визначення чутливості культури мікобактерій до критичних концентрацій ізоніазиду, рифампіцину та етамбутолу, містить по одному флакону кожного з препаратів (стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин та етамбутол) у ліофілізованому стані, а також 8 флаконів по 20,0 мл збагачувальної добавки MGIT 960 AST supplement (OADC), яка відрізняється від аналогічної добавки, призначеної для виявлення мікобактерій, за кількісним співвідношенням компонентів. Перед додаванням у пробірки MGIT, препарати слід розчинити у 4,0 мл стерильної деіонізованої води. Набір розрахований на 40 тестів, температура його зберігання 2–8 °С.

BACTEC MGIT 960/320 PZA Kit

Набір призначений для визначення чутливості мікобактерій до піразинаміду, містить 2 флакони з ліофілізованим піразинамідом і 6 флаконами живильної добавки. Перед додаванням піразинаміду у пробірки MGIT з пониженим рН (5,9) його слід розчинити в 2,5 мл стерильної деіонізованої води. Набір розрахований на 50 тестів, температура його зберігання 2–8 °С.

Пробірки MGIT 960/320 PZA

Призначені для визначення чутливості мікобактерій до PZA. Пробірка містить 7,0 мл модифікованого бульйону Міддлбука 7H9 із зниженим значенням (рН=5,9). Пробірки поставляються в картонній коробці по 25 штук. Температура зберігання пробірок 2–25 °С.

МусоPrep

Набір призначений для розрідження і деконтамінації клінічних зразків, направлених для мікроскопічного і культурального досліджень з метою виявлення кислотостійких мікобактерій. Набір включає:

10 флаконів (по 75,0 мл або по 150 мл) 2,0 % розчину NaOH, причому в кожному флаконі міститься скляна ампула з порошкоподібним муколітиком NALC;

пакети фосфатного буфера.

Безпосередньо перед використанням розчину NALC-NaOH (перед додаванням його в рівному об'ємі до досліджуваного зразка) ампулу слід роздавити усередині флакона. Кожен пакет з солями для фосфатного буфера

розчиняють в 0,5 л очищеної води і заздалегідь стерилізують автоклавуванням. Температура зберігання набору 2–25 °С.

Реагенти для обробки клінічних зразків можна приготувати в умовах лабораторії

1. Для отримання деконтамінуючого розчину, що містить 2,0 % NaOH (з цитратом натрію), необхідно з'єднати рівні об'єми 4,0 % NaOH і 2,9 % цитрату натрію або розчинити в 1 літрі дистильованої води:

гідроксид натрію (NaOH) 20,0 г

цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 14,5 г

Перед обробкою додати порошок муколітичного (розріджуючого) агента NALC у розчин NaOH-цитрат, з розрахунку 0,5 г на 100 мл. Після додавання NALC суміш NALC-NaOH може бути використана тільки протягом 24 годин, оскільки після закінчення зазначеного терміну розчин швидко втрачає муколітичну активність.

Цитрат натрію додається до розчину NaOH, щоб зв'язати іони важких металів, які можуть бути присутніми у зразку та інактивувати NALC.

При високому забрудненні зразків сторонньою мікрофлорою концентрацію гідроксиду натрію у початковому розчині можна збільшити до 3,0 %.

2. Для отримання фосфатного буфера в 1 л дистильованої води необхідно розчинити:

двозаміщений фосфат натрію (Na_2HPO_4) – 4,74 г

однозаміщений фосфат калію (KH_2PO_4) – 4,54 г

Стерилізація буфера проводиться в автоклаві при 121 °С протягом 15 хв. в ємкості з кришкою, яка частково відкручена. Після охолодження розчину при кімнатній температурі кришку слід щільно закрити.

Опис методу

Детекція росту мікобактерій за допомогою автоматизованої системи бульйонного культивування BACTEC MGIT 960

Підготовка матеріалу для посіву

Перш ніж провести інокуляцію в індикаторну пробірку MGIT, необхідно виконати попередню обробку клінічного зразка з метою його розрідження, деконтамінації і концентрації. Якнайкращі результати забезпечує обробка 2,0–3,0 % розчином NaOH з NALC, яку рекомендується здійснювати у ламінарній шафі з дотриманням стерильності за такою схемою:

до зразка (приблизно 5,0 мл), який знаходиться у пластиковій градуйованій пробірці об'ємом 50,0 мл, додати рівний об'єм NALC-NaOH або препарату MucOPrep;

щільно закрити кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за допомогою вортексу 15–30 секунд прагнучи досягти повного розрідження, і залишити на 15 хвилин при кімнатній температурі, перевертати для змішування кожні 5 хвилин;

дати фосфатний буфер до відмітки «50,0 мл» і змішати струшуванням (після додавання фосфатного буфера рН досліджуваного матеріалу відповідає

6,8);

центрифугувати зразок протягом 15 хвилин при 3000 g, залишити у шафі біологічної езпеки на 5 хвилин для осадження аерозолів;

видалити надосадову рідину;

додати до осаду 1,0 мл фосфатного буфера, загальний вміст повинен скласти 1,5–2,0 мл.

Використовувати отриманий матеріал для:

посіву в пробірки MGIT;

посіву на щільне середовище;

приготування мазків;

для молекулярно-генетичних досліджень (GeneXpert та ін.).

Якщо матеріал не використовується негайно, він повинен бути заморожений (-20°C).

Посів діагностичного матеріалу в пробірки MGIT

Інокуляція осаду обробленого матеріалу в індикаторні пробірки MGIT проводиться за допомогою одноразової пастерівської піпетки:

зняти кришку, що відкручується, з пробірки MGIT;

додати вміст флакона із збагачувальною добавкою MGIT (Growth supplement) (15,0 мл) у флакон з ліофілізованими антибіотиками PANTA;

перенести 0,8 мл отриманої суміші в пробірку MGIT;

внести 0,5 мл осаду діагностичного матеріалу до пробірки MGIT і паралельно провести посів 0,2 мл матеріалу на щільне середовище Левенштейна-Єнсена або Фінна-П та нанести каплю на предметне скло, яке промарковане заздалегідь;

переконавшись, що пробка пробірки щільно закручена, перевернути для перемішування вмісту та провести завантаження пробірки в прилад BACTEC 960 відповідно до інструкції з експлуатації.

Інкубація пробірок у системі

Відкрити один з ящиків приладу BACTEC MGIT 960/320 і натиснути кнопку «Tube enter», що з'явилася на екрані («Завантаження пробірки»). При цьому загорається лампа сканера для зчитування штрих-коду з пробірки.

Відсканувати сканером штрих-код пробірки з інокулятом і встановити її у гніздо, що рекомендує прилад.

Слід щодня перевіряти показання приладу на предмет появи позитивних і негативних результатів.

Про позитивний результат (ріст мікобактерій) свідчить червоний сигнал позитивного індикатора на відповідному ящику і значок на дисплеї приладу.

При появі інформації про позитивний результат необхідно відкрити вказаний ящик, натиснути кнопку «positive», що з'явилася на екрані, витягнути відповідну пробірку з гнізда і відсканувати штрих-код.

Пробірки, у яких не зафіксовано приладом ріст мікобактерій протягом 42 дб, оцінюються системою як негативні. Про негативний результат (відсутність росту мікобактерій) свідчить зелений сигнал негативного індикатора на відповідному ящику і значок на дисплеї приладу.

При появі інформації про негативний результат необхідно відкрити вказаний ящик, натиснути кнопку «negative», що з'явилася на екрані, витягнути вказану пробірку з гнізда і просканувати її штрих-код.

Оцінка результатів культивування на автоматизованій системі

Позитивний результат, що свідчить про зростання культури в індикаторній пробірці, може реєструватися з 4-го дня після інокуляції, позитивний сигнал в 1–3-у добу може бути розцінений як мікробна контамінація зразка. Для підтвердження росту мікобактерій, а також ідентифікації *M. tuberculosis* у позитивній пробірці проводяться наступні процедури:

Видаливши позитивну пробірку з приладу, слід візуально оцінити прозорість бульйонного середовища для визначення можливого росту мікобактерій. Зазвичай ріст культури *M. tuberculosis* виявляється у вигляді характерних придонно розташованих пластівців, які при незначному струшуванні піднімаються і поширюються по усьому середовищу, при цьому рідке середовище зберігає прозорість. Помутніння середовища у позитивній пробірці свідчить про можливу контамінацію сторонньою флорою.

Приготувати мазок за методом Ціля-Нільсена для виявлення кислотостійких мікобактерій.

Провести субкультивування на щільне ячне середовище для підтвердження росту типових колоній мікобактерій.

Провести субкультивування на середовищі Левенштейна-Єнсена, що містить 500 мкг/мл саліциловокислого натрію або 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти, для диференціації *M. tuberculosis* і НТМБ.

Для того, щоб переконатися у відсутності контамінації позитивної пробірки сторонньою мікробною флорою, слід приготувати мазки із забарвленням за Грамом і провести пересіви вмісту пробірки на чашку з кров'яним агаром. Наявність росту на чашці у результаті інкубації протягом 24 годин при 37 °С свідчить про мікробну контамінацію матеріалу.

При наявності ніацинового, нітратредуктазного або імунохроматографічного тестів доцільно провести ідентифікацію позитивної культури отриманої після культивування в автоматизованій системі.

Порядок видачі результату

Позитивний результат, що свідчить про виділення культури *M. tuberculosis*, видається на 5–41-й день за наступних умов:

позитивний сигнал приладу + наявність мікроколоній у вигляді «кіс» при бактеріоскопії, позитивної проби, забарвленої за Цілем-Нільсеном;

позитивний сигнал приладу + кислотостійкі бактерії при бактеріоскопії + характерний ріст колоній на щільному середовищі + відсутність росту на середовищі Левенштейна-Єнсена, що містить 500 мкг/мл саліциловокислого натрію;

позитивний сигнал приладу + відсутність кислотостійких бактерій і мікроколоній контамінуючої мікрофлори при бактеріоскопії + характерний ріст колоній на щільному середовищі + відсутність росту на середовищі

Левенштейна-Єнсена, що містить 500 мкг/мл саліциловокислого натрію;

позитивний сигнал приладу + кислотостійкі бактерії і мікроколонії контамінуючої мікрофлори при бактеріоскопії + характерний ріст колоній мікобактерій на щільному середовищі (за відсутності контамінації в контрольному мазку з даного щільного середовища) + відсутність росту на середовищі Левенштейна-Єнсена, що містить 500 мкг/мл саліциловокислого натрію;

позитивний сигнал приладу + кислотостійкі бактерії або відсутність кислотостійких бактерій і мікроколоній контамінуючої мікрофлори при бактеріоскопії + позитивний результат ПЛР з праймерами для *M. tuberculosis* з позитивної процесорної ємкості.

Негативний результат росту *M. tuberculosis* на автоматизованих системах видається на 42-й день. За наявності ознак можливого росту *M. tuberculosis* на щільному середовищі (наприклад, є колонії у вигляді пластівців у рідкій фазі над скосом) негативна відповідь видається за результатами відсутності росту мікобактерій на щільному середовищі через 10 тижнів (70 днів).

Контроль якості виконується при отриманні кожної нової партії пробірок з використанням колекційних штамів мікобактерій: *M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478 і *M. fortuitum* ATCC 6841. Контроль якості можливо проводити за допомогою інших лабораторних штамів. Зокрема, штам *M. tuberculosis* H₃₇R_v (при посіві в пробірку MGIT 0,5 мл мікробної суспензії, приготованої по 0,5 стандарту McFarland і розведенню 1:100) повинен дати ріст, підтверджений позитивним сигналом BACTEC 960, на 7–9-й день після внесення до приладу.

Контамінація при використанні системи BACTEC MGIT і її попередження

Прийнятним для збагаченого рідкого середовища вважається рівень контамінації, що досягає 5,0–8,0 % від загального числа посівів. При підвищенні рівня контамінації більше 10,0 % необхідне термінове виявлення її причин і вживання заходів щодо їх усунення.

При отриманні позитивного результату приладу BACTEC 960 (з 4-го по 42-й день) необхідно переконатися, що в рідкому середовищі позитивної пробірки не міститься контамінуючих мікроорганізмів. Якщо в результаті мікроскопії за Цілем-Нільсеном виявлені мікобактерії, а при посіві на кров'яний агар контамінація матеріалу в пробірці підтверджена, то, при необхідності, можливо провести повторну деконтамінацію і спробувати виділити чисту культуру мікобактерій. З цією метою:

перенести увесь контамінований вміст з позитивної пробірки MGIT у стерильну пробірку об'ємом 50,0 мл;

додати рівний об'єм стерильного 4,0 % розчину NAOH і провести обробку за методом Петрова;

зробити посів на щільне ячне середовище.

Як заходи боротьби з контамінацією посівів, здійснюваних за допомогою автоматизованих систем, можуть бути рекомендовані наступні заходи:

збільшення концентрації лугів при первинній обробці матеріалу (не більше, ніж до 1,5 % після з'єднання із зразком);

збільшення часу обробки мокротиння розчином NALC-NaOH до 25 хвилин;

збільшення концентрації PANTA шляхом зменшення кількості рідкої добавки, яку використовують для розчинення ліофілізованої PANTA (більш концентрований розчин PANTA можна одержати при розчиненні PANTA у 10,0 мл (замість 15,0 мл) збагачуючої добавки, при цьому перед інокуляцією у пробірку MGIT додають звичайний об'єм – 0,8 мл розчину отриманої суміші).

Зміни параметрів обробки мокротиння рекомендується проводити у вказаному порядку. Слід пам'ятати, що при надмірному збільшенні концентрації PANTA може спостерігатися пригнічення росту деяких видів мікобактерій (але не *M. tuberculosis*). Не треба змінювати відразу декілька параметрів одночасно.

Якщо контамінація одним і тим же видом (видами) мікроорганізмів спостерігається часто, то її причина у недостатній чистоті реактивів або відсутності стерильності реагентів і посуду.

Загальним правилом є аліквотування розчинів невеликими об'ємами. Таким чином, кожного разу використовується свіжий розчин, розчин, що залишився від аліквоти, не зберігається.

Важливим фактором боротьби з контамінацією є скорочення часу зберігання мокротиння, чим попереджається його забруднення сторонньою мікрофлорою. При необхідності, зберігати мокротиння слід у холодильнику при +4 °С.

У процесі деконтамінації мокротиння розчином NALC-NaOH важливо кілька разів перевернути пробірку, щоб дії розчину були піддані усі ділянки внутрішньої стінки пробірки, особливо в її верхній частині.

VI. ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО КОМПЛЕКСУ, ВИДОВА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ

1. Попередня ідентифікація комплексу *M. tuberculosis* (родова ідентифікація) бактеріологічних лабораторіях II–III рівнів має проводитися визначення належності виділених або доставлених культур мікроорганізмів.

Основою ідентифікації є такі характеристики:

швидкість росту бактерій – більше 10 днів;

морфологія і забарвлення колоній;

результати дослідження мазків, приготованих з виділеної культури і забарвлених за методом Ціля-Нільсена.

При перегляді посівів проводиться вивчення усіх культур, що вирости. На підставі морфологічних ознак колоній здійснюється попередній розподіл культур на ті, що належать до *M. tuberculosis complex*, нетуберкульозних мікобактерій і споріднених таксонів.

Колонії *M. tuberculosis* на більшості живильних середовищ виглядають сухими, світло-кремового кольору, шорсткими (R-форма), товстими, піднятими в центрі, з вузлуватою або зморшкуватою поверхнею і нерівними краями (нагадують цвітну капусту).

На деяких живильних середовищах (Фінна-П, ліофілізоване середовище Левенштейна-Єнсена) або при обробці діагностичного матеріалу 1,0 % розчином сірчаної кислоти (без подальшої нейтралізації) колонії виглядають напівкулястими, гладкими (S-форма), м'якими, вологими, іноді злегка складчастими. Ріст культури *M. tuberculosis* характеризується як пишний – еугонічний. Після курсу хіміотерапії від хворих на ТБ можуть виділятися гладкі колонії з вологим ростом (S-форми).

M. bovis на середовищі Левенштейна-Єнсена показує дистонічний ріст, що стелеться.

Колонії більшості нетуберкульозні мікобактерії морфологічно не схожі з *M. tuberculosis*. Сапрофітні мікобактерії можуть варіювати за формою колоній. Вони бувають гладкі, круглі, вологі, блискучі, куполоподібні, маслянисті. Добре емульгуються у воді. Іноді можуть мати проміжну форму. Колонії кремового кольору *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* і *M. terrae complex* бувають сухі і зморшкуваті, тому їх іноді помилково приймають за *M. tuberculosis*. Забарвлення колоній НТМБ може бути від білого, тілесного і кремового кольору до світло-жовтого, жовтого і помаранчевого. Ріст культури НТМБ може бути пишним або таким, що стелеться, і має випіт – дистонічним.

Морфологічно колонії споріднених мікроорганізмів відрізняються від колоній *M. tuberculosis*, проте деякі види нетуберкульозні мікобактерії (фотохромогенні) можуть рости у вигляді характерної для *M. tuberculosis* R-формі. Оскільки нетуберкульозні мікобактерії також можуть викликати захворювання людини (мікобактеріози), вони також підлягають вибору для подальшої ідентифікації.

Головною відмінною особливістю роду мікобактерій є суворе кислото-, луго- і спиртостійкість, тому першим ступенем ідентифікації є мікроскопія усіх виділених культур із забарвленням мазків за методом Ціля-Нільсена.

Методика виконання.

Приготувати мазки із всіх культур, відібраних при перегляді посівів.

Забарвити мазки за методом Ціля-Нільсена.

Провести мікроскопію мазків.

При забарвленні методом Ціля-Нільсена КСП виглядають червоними на синьому фоні. Мікобактерії мають вигляд тонких ледь зігнутих паличок, коротких, довжиною 1–10 (частіше 1–4) мкм, шириною 0,2–0,6 мкм, гомогенних або зернистих з трохи закругленими кінцями. У мазках культури *M. tuberculosis*, що виросла на напіврідкому або рідкому середовищі, можна побачити мікроколонії мікобактерій у вигляді кіс і джгутів, феномен «корд-фактора».

При приготуванні мазків для мікроскопічного дослідження колонії *M. tuberculosis* проявляють свої фізико-хімічні особливості: вони не

емульгуються в ізотонічному розчині, а утворюють зернисту крихтоподібну суспензію.

При перегляді мазка слід звернути увагу на морфологічні особливості паличок і розташування їх в препараті. НГМБ в мазку з культури можуть розташовуватися у вигляді частоколу, паркету або мати форму кокобадил. Не зважаючи на те, що морфологічна характеристика паличок може асоціюватися з певним видом мікобактерій, вона не є підставою для видової ідентифікації.

При підтвердженні кислотостійкості культур, що вирости, їх відносять до роду мікобактерій і проводять подальше вивчення.

На підставі морфології колоній і позитивного забарвлення мазка з культури видається попередня відповідь.

Група споріднених мікроорганізмів (нокардії, родококи та ін.) відрізняється частковою або слабкою кислотостійкістю. У мазку можна одночасно зустріти червоні і сині палички або фіолетово-сині кокобадили. Морфологічно в мазку з культури вони представлені у вигляді міцелію, що фрагментується на палички, або крупних поліморфних паличок (табл. 6).

Таблиця 3 – Характеристика мікобактерій і споріднених таксонів

Властивість мікроорганізмів	Мікобактерії	Нокардії	Родококи	Коринебактерії
Морфологія	Палички	Міцелій, що далі фрагментується на палички і коки; повітряний міцелій	Мізерний міцелій, що фрагментується на палички і коки	Поліморфні палички
Швидкість росту, в днях	2–40	1–5	1–3	1–2
Кислотостійкість	Повна	Часткова	Часткова	Слабка
Ступінь забарвлення за Грамом	Слабка	Сильна	Сильна	Сильна

Для диференціації роду мікобактерій і споріднених таксонів, окрім описаного тесту, додатково можна використовувати забарвлення мазка за методом Грама.

Мікобактерії мають дуже слабе забарвлення за Грамом. Нокардії, родококи і коринебактерії добре сприймають забарвлення за Грамом – грампозитивні.

На підставі морфологічних і тінкторіальних властивостей та швидкості росту проводиться визначення роду виділеної культури. У споріднених мікроорганізмів відзначається слабка або часткова кислотостійкість, швидкий ріст на простих і яєчних середовищах, виражене забарвлення за методом Грама і значний поліморфізм при мікроскопічному дослідженні мазка. Нокардії і

родококи не мають важливого клінічного значення і можуть вивчатися в наукових лабораторіях.

Рід мікобактерій характеризується суворою кислотостійкістю при забарвленні за методом Ціля-Нільсена і слабким забарвленням за Грамом. У мазках мікобактерії представлені у вигляді довгих, тоненьких або коротких паличок. Мікобактерії характеризуються повільним ростом при посіві діагностичного матеріалу на яечні середовища.

Після оцінки культур, що вирости, лікар-бактеріолог робить висновок про належність культури до комплексу *M. tuberculosis*, про що робить відмітку в відповідній графі журналу реєстрації досліджень і видає відповідь за результатом культурального дослідження.

2. Диференціація *M. tuberculosis complex* від НТМБ повинна проводитися в лабораторіях 2-го і 3-го рівнів. Культури, віднесені за морфологічними властивостями до *M. tuberculosis complex*, необхідно диференціювати від НТМБ.

У роботі лабораторії зустрічаються культури, які за морфологічними ознаками не вкладаються в характеристику *M. tuberculosis*, але показують кислотостійкі властивості при забарвленні мазка. І навпаки, при зовнішній схожості вирощених колоній з колоніями *M. tuberculosis* мікроскопічна картина (дрібні палички, кокобацили) викликають сумніви щодо належності культури до цього виду. У подібних випадках не можна видавати відповідь про виділення *M. tuberculosis* до проведення диференціальної діагностики з НТМБ.

При первинному виділенні культури з діагностичного матеріалу з уrogenітального тракту також слід видавати позитивну відповідь тільки після диференціальної діагностики. Це пояснюється не тільки тим, що подібний матеріал має найбільш високу ймовірність забруднення мікобактеріями навколишнього середовища, але і тим, що сапрофітні мікобактерії можуть бути нормальною мікрофлорою людини.

Ідентифікація *M. tuberculosis complex* і нетуберкульозні мікобактерії заснована на їх культуральних властивостях і здатності росту на диференційно-діагностичних середовищах.

Бактеріологічна характеристика *M. tuberculosis*:

на середовищі Левенштейна-Єнсена утворюють сухі колонії з нерівними краями, кольору слонової кістки;

ріст тільки при 35–37 °С;

ріст на щільних живильних середовищах не раніше 3 тижнів. Ріст субкультури може з'явитися через 10–14 днів;

відсутність росту на середовищі з 500 мкг/мл саліциловокислим натрієм або 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти (ПНБК), а також з 1000 мкг/мл тіоацетазону (тібону).

Диференційно-діагностичні середовища

Середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл саліциловокислого натрію
Реактиви.

Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).

Натрій саліциловокислий – 50,0 мг.

Методика приготування.

До наважки натрію саліциловокислого 50,0 мг додати 1,0 мл етилового спирту для дезінфекції, 2,0 мл стерильної дистильованої води та 97,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена до згортання. Ретельно розмішати. Середовище з вмістом 500 мкг/мл саліциловокислого натрію розлити в пробірки по 5,0 мл і згортувати при 85 °С протягом 30 хв.

Середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл ПНБК

Реактиви.

Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).

ПНБК – 50,0 мг.

4,0 % розчин NaOH.

10,0 % розчин HCl.

Методика приготування.

Наважку ПНБК (50,0 мг) ретельно розтерти в стерильній ступці, додати 1,0 мл етилового спирту, 4,0 мл дистильованої стерильної води і 20–24 краплі 4,0 % розчину NaOH до отримання рН 8,0 (за індикаторним папірцем). За допомогою 10,0 % розчину HCl довести рН до 7,0 (дати 1–2 краплі). Приготований розчин додати до 95,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена, ретельно розмішати. Середовище з 500 мкг/мл ПНБК розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 30 хв.

Середовище з тіоацетазоном (тібоном)

Тіоацетазон (тіосемікарбазон пара-ацетамінобензальдегід), ПТП. *M. tuberculosis* та *M. bovis* чутливі до цього препарату, тоді як інші мікобактерії, за винятком *M. kansasii*, до нього стійкі.

Реактиви.

Тіоацетазон (тібон) – 10,0 мг.

Етиловий спирт 96 °.

Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).

Методика приготування.

Готують розчин тіоацетазону з 1000 мкг/мл препарату. Для цього до наважки 10,0 мг тібону, висипаної у пробірку, додають 1,0 мл етилового спирту і 9,0 мл стерильної дистильованої води, отримують розведення 1000 мкг/мл. 1,0 мл цього розведення додають до 99,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена, одержують концентрацію тібону 10,0 мкг/мл і розливають у пробірки по 5,0 мл. Середовище в пробірках згортають в скошеному вигляді при 85 °С протягом 30 хв.

Для диференціації *M. tuberculosis complex* і нетуберкульозних мікобактерій 0,1 мл бактеріальної суспензії дослідної культури в стандартному розведенні 10^{-2} засіяти на середовище з саліциловокислим натрієм або на середовище з ПНБК. Визначення здатності росту мікобактерій на одному з цих діагностичних середовищ проводиться одночасно з визначенням їх стійкості до протитуберкульозних препаратів.

M. tuberculosis complex не ростуть на середовищах із саліциловокислим натрієм та ПНБК, а також з тіоацетазоном (тібоном) і ця властивість служить для диференціації *M. tuberculosis* та *M. bovis* від нетуберкульозних мікобактерій.

В деяких випадках при постановці тесту спостерігається почорніння, побуріння середовища з саліциловокислим натрієм без зміни кольору середовища в контролі. Здатність викликати деградацію саліциловокислого натрію є відмінною особливістю *M. fortuitum* і *M. chelonae*.

Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl

Принцип. Метод ґрунтується на здатності нетуберкульозних мікобактерій V групи рости на середовищі з 5,0 % NaCl. Крім цієї групи, на даному середовищі ростуть тільки *M. terrae complex* (включає *M. triviale*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* і *M. flavescens*, а також деякі мікобактерії I групи (*M. marinum*). Всі інші мікобактерії, у тому числі *M. tuberculosis* і *M. bovis*, на цьому середовищі не ростуть.

Інгредієнти.

NaCl.

Сольова основа середовища Левенштейна-Єнсена.

Яєчна суміш середовища Левенштейна-Єнсена.

До сольової основи середовища Левенштейна-Єнсена додають NaCl із розрахунку 5,0 г на 100,0 мл сольової основи (5,0 %). Отриманий розчин стерилізують при 121 °C 20 хв. Далі готують середовище, як указано в рецепті приготування середовища Левенштейна-Єнсена.

На всі вказані вище середовища засівають по 0,2 мл зависі дослідної культури.

Диференціальна діагностика *M. tuberculosis complex* і нетуберкульозних мікобактерій надана в табл. 4.

Таблиця 4 – Диференціальна діагностика *M. tuberculosis complex* і НТМБ

Властивість культури	<i>M. tuberculosis complex</i>	НТМБ
Поява видимих колоній протягом 1 тижня	–	±
Пігментація колоній	–	±
Строгі мезофіли (ріст тільки при 35–37 °C)	+	–
Ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм	–	+
Ріст на середовищі з ПНБК	–	+
Ріст на середовищі з тіоацетазоном (тібон)	–	+
Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl	–	±

На підставі відсутності росту на діагностичних середовищах з саліциловокислим натрієм або ПНБК, утворення сформованих не пігментованих колоній протягом 3–4 тижнів при температурі 37 °C досліджену культуру можна віднести до *M. tuberculosis complex*.

Виявлення корд-фактору

Крім росту на цих середовищах, використовують здатність мікобактерій по-різному рости на рідких живильних середовищах. НТМБ ростуть дифузно у вигляді кучок, на відміну від істинних туберкульозних мікобактерій, що ростуть плівкою, або придонно, мають корд-фактор і ростуть у вигляді «кіс», «джгутів», «вусів» – у тісному переплетенні окремих паличок одна з одною. Це може служити диференціальною ознакою. Проте, стійкі до препаратів групи ГНК (препарати групи гідразиду ізоніотинової кислоти) *M. tuberculosis* цілком або частково втрачають корд-фактор. Тому для диференціації туберкульозних культур від НТМБ визначення корд-фактору треба використовувати в комплексі з іншими тестами.

Для відрізнення *M. tuberculosis* від інших мікобактерій (*M. bovis* і НТМБ) використовують різноманітні біохімічні методи.

3. Видова ідентифікація *M. tuberculosis complex* повинна проводитися у всіх лабораторіях II-го і III-го рівнів. Найбільш актуальними представниками цього комплексу є *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caneti*.

Їх видова ідентифікація заснована на фенотипічній характеристиці і біохімічних тестах, а саме:

- тесту на наявність здатності продукувати нікотинову кислоту;
- тесту на наявність нітратредуктазної активності;
- тесту визначення здатності росту культури на середовищі з гідразид-тіофен-2-карбоксіловою кислотою (ТСН);
- тесту визначення здатності до росту на середовищі з нікотинамідом;
- тесту визначення чутливості до циклосерину;
- тесту визначення каталазної і пероксидазної активності одночасно;
- тесту на наявність термостабільної каталази;
- реакції гідролізу твіну-80.

Визначення ніацину (ніациновий тест)

Ніацин продукують всі мікобактерії, але у *M. tuberculosis* в результаті блокування ряду метаболічних шляхів нікотинова кислота накопичується у великих кількостях. Тому цей тест є одним з основних, що дає можливість відрізнити *M. tuberculosis* від інших мікобактерій.

Принцип методу полягає в визначенні нікотинової кислоти хімічними методами в живильному середовищі, але не в самих мікобактеріях за допомогою ціаністих сполук, з якими нікотинова кислота дає яскраво-жовте забарвлення. Цей тест одержав назву ніацинового. Класичний метод заснований на використанні ціаністих сполук.

Вказаний метод визначення ніацину вимагає для роботи застосування ціаністого калію, робота з яким повинна проводитися під витяжною шафою і вимагає певних умов, що обмежує широке застосування цього тесту. У зв'язку з цим, особливої уваги заслуговує метод визначення ніацину паперовими смужками, запропонований Кубика і Кильбурн, у модифікації Бараускене.

Перевага цього методу – у використанні роданистого калію замість ціаністого калію – речовини нелеткої і більш доступної для бактеріологічних лабораторій, а також у швидкості реакції, яка дозволяє через 3–4 години дати відповідь про належність культури, що виросла на щільному середовищі, до *M. tuberculosis* або до інших мікобактерій.

Принцип методу полягає в екстракції ніацину з мікобактерій дистильованою водою і визначення його за допомогою паперових смужок, які заздалегідь обробляються відповідними реактивами.

Приготування реактивів.

20,0 % розчин пара-аміносаліцилової кислоти (ПАСК). У пробірку наливають 1,75 мл 95,0 % спирту, 0,25 мл диметилсульфоксиду (димексиду) і додають 400,0 мг ПАСК. Суміш підігрівають на водяній бані при 56 °С протягом 5–10 хв. при періодичному струшуванні до повного розчинення ПАСК.

60,0 % розчин роданистого калію. Наважку 1,5 г роданистого калію розчиняють у пробірці з 2,5 мл 8,0 % розчину лимонної кислоти (200,0 мг лимонної кислоти і 2,5 мл дистильованої води).

50,0 % розчин хлораміну «Б». 3,125 г хлораміну «Б» розчиняють у 6,25 мл дистильованої води на водяній бані при температурі 56–60 °С при струшуванні. Гарячий розчин капають на смужки.

Індикаторні смужки готують із фільтрувального паперу Filtrak 11. Один кінець смужки, розміром 60,0x8,0 мм, позначають простим олівцем. Пастерівськими піпетками на папір наносять по одній краплі щойно приготовлених реактивів у наступному порядку: 20,0 % розчин ПАСК – на позначений олівцем кінець, 60,0 % розчин роданистого калію – посередині смужки і 50,0 % розчин хлораміну «Б» – на інший кінець. Між краплями повинні залишатися сухі проміжки. Папірці висушують при кімнатній температурі в темряві протягом 24 годин, після чого зберігають їх у холодильнику в пробірках, що загвинчуються, або закритих гумовими корками. Індикаторні смужки залишаються активними протягом 3-х місяців. Для одержання більш чіткої реакції рекомендується наносити повторно 1 краплю хлораміну «Б» на вже висохлу краплю.

Хід дослідження. Для тесту використовуються 3–4 тижневі життєздатні культури (не менше 50 колоній) в середовищі Левенштейна-Єнсена.

Екстракт мікобактерій одержують шляхом додавання в пробірку з культурою 1,0–1,5 мл дистильованої води або ізотонічного розчину натрію хлориду і витримування пробірок у горизонтальному положенні, щоб усі колонії добре відмилися водою протягом 30 хв. у термостаті. Якщо культура росте «газоном», поверхню середовища необхідно злегка проткнути піпеткою для того, щоб збільшити контакт дистильованої води або ізотонічного розчину натрію хлориду із середовищем. Потім 0,6 мл екстракту мікобактерій відсмоктують мірною піпеткою в пробірку.

Індикаторну смужку поміщають кінцем, поміченим олівцем, у пробірку з 0,6 мл досліджуваного екстракту мікобактерій. Пробірку закривають пробкою

та витримують при кімнатній температурі, періодично струшують, поки вся смужка не просочиться екстрактом. При позитивному ніациновому тесті через 15–30 хв. рідина забарвлюється в яскраво-жовтий колір. Дегазація пробірки після проведення реакції здійснюється шляхом додавання 10,0 % розчину нашатирного спирту.

Використання паперових смужок для визначення ніацину дає можливість застосовувати цей тест в усіх практичних лабораторіях.

В даний час існують комерційні набори готових паперових смужок, крапельних наборів для проведення ніацинового тесту, що значно його спрощує і стандартизує.

Необхідно пам'ятати, що ряд НГМБ – *M. simiae*, *M. chelonae* і деякі штами *M. marinum* також блокують ніацин. Хромогенні штами НГМБ можуть давати хибнопозитивні реакції.

Негативний результат не є остаточним, оскільки культури *M. tuberculosis*, виділені від хворих, які тривалий час одержують протитуберкульозні препарати, слабо продукують ніацин. У подібних випадках необхідно повторити тест. Культуру пересіяти, щоб одержати пишній ріст і використати для тестування 3–4-тижневу культуру.

Для ВКЯ у якості позитивного контролю слід використовувати штамп *M. tuberculosis*, як негативний – *M. bovis*.

Внутрішній контроль якості

ВКЯ ніацинового тесту проводиться кожного разу при проведенні тестування. В якості позитивного контролю використовують ідентифікований або референс-штамп (музейний) *M. tuberculosis*. В якості негативного контролю використовують ідентифікований або референс-штамп (музейний) НГМБ, наприклад, *M. fortuitum*, або дистильовану воду.

Слід переконатися в чистоті дослідних штамів, строго дотримуватися правил зберігання і термінів використання розчинів, реагентів і паперових смужок.

Визначення нітратредуктази

Для ідентифікації *M. tuberculosis* користуються також реакцією відновлення нітратів в ніприти. Реакція відновлення нітратів дає можливість диференціювати *M. tuberculosis*, які мають нітратредуктазу, від *M. bovis*, *M. avium* і від деяких НГМБ, у яких цей фермент відсутній. Виняток складають фотохромогенні мікобактерії (*M. kansasii*) і деякі з III і IV груп.

Принцип. Активність нітратредуктази визначається по кількості відновленого з нітрату ніприту, що дає кольорову реакцію з пара-диметиламінобензальдегідом.

Реактиви.

0,067 М фосфатний буфер (рН-7,1), що містить 0,1 % нітрату натрію.

2,0 % розчин (вага/об'єм) пара-диметиламінобензальдегіду в 10,0 % НСІ.

10,0 % розчин НСІ.

Для реакції використовують 3–4-тижневі культури, вирощені на яєчному середовищі.

Хід дослідження. 2 петлі біомаси 3–4-тижневої культури суспендують в 5,0 мл (можна суспендувати 10,0 мг культури в 1,0 мл) 0,067 М фосфатного буферу (рН-7,1), що містить 0,1 % нітрату натрію, і інкубують при 37 °С 15–16 годин. Утворення нітриту перевіряється додаванням 2 крапель 2,0 % розчину пара-диметиламінобензальдегіду в 10,0 % НСІ + 1,0 мл 10,0 % НСІ. Поява жовтого забарвлення свідчить про належність культури до *M. tuberculosis* (метод Тсукамура).

Крім активності вказаних ферментів для відрізнення *M. tuberculosis* від інших кислотостійких мікобактерій можна використовувати різну активність окисно-відновних ферментів.

Визначення здатності росту культури на середовищі з гідразид-тіофен-2-карбоксиліною кислотою

Метод використовується для диференціальної діагностики *M. tuberculosis* complex. *M. tuberculosis* резистентні до ТСН і дають хороший ріст на цьому середовищі. *M. bovis* і *M. bovis*-BCG чутливі до ТСН і не ростуть на середовищі, що містить цю сполуку.

Реактиви.

Середовище Левенштейна-Єнсена – 600 мл (до згортання).

Гідразид-тіофен-2-карбоксиліною кислоти.

Приготувати наважку ТСН 20,0 мг, розчинити у 20,0 мл стерильної дистильованої води. Одержали розведення 1000 мкг/мл. Розчин А.

До 12,0 мл стерильної дистильованої води додати 3,0 мл розчину А.

Отримали розведення 200 мкг/мл. Розчин Б.

Приготування середовища Левенштейна-Єнсена з ТСН:

а) розведення – 199 мл середовища + 1,0 мл розчину Б – розведення 1,0 мкг/мл;

б) розведення – 195 мл середовища + 5,0 мл розчину Б – розведення 5,0 мкг/мл;

в) контрольна пробірка з середовищем без реактиву.

6. Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 30 хв.

Методика виконання.

По 0,2 мл культури в стандартному розведенні засівається на поверхню середовища. Інкубація при температурі 37 °С. Перегляд росту культур через 3–4 тижні. Визначення чутливості мікобактерій до ТСН проводиться одночасно з визначенням їх стійкості до медикаментозних препаратів.

Метод використовується для диференціації мікобактерій туберкульозного комплексу. *M. tuberculosis* стійкі до усіх концентрацій ТСН, *M. bovis* чутливі до ТСН в концентрації 1,0 і 5,0 мкг/мл (слід пам'ятати, що *M. bovis* іноді дає слабкий ріст на середовищі з концентрацією 1,0 мкг/мл, але ніколи не росте на середовищі з 5,0 мкг/мл). *M. bovis*-BCG чутливий до усіх досліджуваних концентрацій.

Визначення здатності до росту на середовищі з нікотинамідом

M. tuberculosis чутливі до нікотинамідів. *M. bovis* і вакцинний штам *M. bovis*-BCG мають природну резистентність до нікотинамідів. На цій властивості заснована диференціація *M. tuberculosis complex*.

Реактиви.

Середовище Левенштейна-Єнсена (до згортання).

Нікотинамід.

Приготування основного розчину нікотинамідів:

Наважку нікотинамідів 1000 мг розчинити в 10,0 мл стерильної дистильованої води; стерилізувати через бактерійний фільтр або кип'ятінням на водяній бані при 100 °С протягом 30 хв.

Приготування робочого розчину:

Розчин А – до 4,0 мл дистильованої води додати 1,0 мл основного розчину. Розведення 20,0 мг/мл.

Розчин Б – до 3,0 мл дистильованої води додати 2,0 мл основного розчину. Розведення 40,0 мг/мл.

Приготування середовища з нікотинамідом:

а) до 95,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена додати 5,0 мл робочого розчину А; кінцева концентрація – 1,0 мг/мл;

б) до 95,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена додати 5,0 мл робочого розчину Б; кінцева концентрація – 2,0 мг/мл;

в) одночасно приготувати 100 мл контрольного середовища Левенштейна-Єнсена.

Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 30 хв.

По 0,2 мл досліджуваної культури в стандартному розведенні засівається на приготовані середовища, інкубація при 37 °С протягом 3 тижнів.

Визначення чутливості до циклосерину

У всіх штамів *M. bovis*-BCG відмічається стійкість до 30,0–50,0 мкг/мл циклосерину. Ця біологічна особливість вакцинного штаму BCG є важливим діагностичним тестом в його ідентифікації.

Реактиви.

Середовище Левенштейна-Єнсена (200 мл до згортання).

Циклосерин.

Наважку циклосерину 20,0 мг розчинити в 5,0 мл дистильованої води, розведення 4000 мкг/мл.

До 99,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена додати 1,0 мл приготованого розчину. Кінцева концентрація препарату – 40,0 мкг/мл.

Одночасно приготувати 100 мл контрольного середовища.

Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 45 хв.

По 0,2 мл досліджуваної культури в стандартному розведенні засівається на приготовані середовища, інкубація при температурі 37 °С протягом 3 тижнів.

M. tuberculosis і *M. bovis* чутливі до циклосерину, вакцинний штам BCG росте на середовищі з циклосерином. Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу наведена у табл. 8.

Таблиця 5 – Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу

Біохімічні тести і властивості мікобактерій	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis-BCG</i>
Відновлення нітратів	+	–	–
Ніациновий тест	+	–	–
Нікотинамідазна активність	+	–	–
Ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена	пишний еугонічний	дисгонічний, що стелеться	пишний еугонічний
Чутливість до піразинаміду	S	R	R
Чутливість до ТСН:			
1,0 мкг/мл	R	V	S
5,0 мкг/мл	R	S	S
Чутливість до циклосерину 40,0 мкг/мл	S	S	R

Примітка: S – чутливий штам, R – стійкий штам, V – результат, що варіює.

Диференціація мікобактерій за окисно-відновними ферментами

У окисно-відновних процесах мікробної клітини активну участь приймають такі ферменти, як каталаза і пероксидаза. У *M. tuberculosis* і *M. bovis*, чутливих до препаратів групи ГНК, виявляється активність обох ферментів паралельно. При цьому у чутливих культур спостерігається швидке активне виділення пухирців кисню, обумовлене діяльністю каталази, і забарвлення колоній у темно-коричневий колір, обумовлене діяльністю пероксидази. Поява коричневого пігменту пояснюється переходом пірогалолу в пурпурогалін в присутності перекису водню під впливом пероксидази. У культур *M. tuberculosis*, стійких до препаратів групи ГНК, активність цих ферментів різко знижена, при визначенні каталазної активності пухирці кисню виділяються в невеликій кількості, повільно або майже відсутні, а при визначенні активності пероксидази колонії або ледь забарвлюються, або (при високому ступені стійкості до ізоніазиду) залишаються безбарвними. На відміну від *M. tuberculosis*, у НТМБ, незалежно від стійкості до ГНК, каталазна активність завжди різко позитивна, пероксидазна ж, як правило, не виявляється.

Визначення каталазної і пероксидазної активності одночасно
(модифікована методика Богена)

Принцип каталазної реакції полягає в розщепленні перекису водню ферментом каталазою на воду й атомарний кисень, що супроводжується виділенням пухирців кисню і переходом пірогалолу в пурпурогалін в присутності перекису водню під впливом пероксидази.

Реактиви.

0,5 % п-рогалол: 50,0 мг чистого пірогалолу розчинити в 10,0 мл дистильованої води.

2,0 % пергідроль. 0,2 мл пергідролю розвести в 10,0 мл дистильованої води.

Обидва розчини готують безпосередньо перед дослідом, змішують і наливають у пробірку так, щоб покрити культуру.

Хід дослідження. Обидва розчини зливають у колбу в рівній кількості і наливають по 6,0–8,0 мл суміші у пробірку з культурою. В залежності від кількості культур, що перевіряють, об'єм розчинів, як готуються, відповідно збільшують.

Облік реакції активності каталази проводять через 5 хв. по активному виділенню пухирців кисню. Реакцію на пероксидазу враховують через 1,5–2 години по забарвленню колоній у темно-коричневий колір.

Ступінь активності каталази позначають по 3-бальній системі:

(3+) ясне виділення пухирців кисню в 1-шу хвилину;

(2+) помірне виділення пухирців кисню;

(1+) поодинокі пухирці.

При відсутності пухирців реакція вважається негативною (–).

Активність пероксидази оцінюється також по 3-бальній системі:

(3+) темно-коричневе забарвлення колоній;

(2+) коричневе забарвлення колоній;

(1+) блідо-коричневе забарвлення колоній.

При негативній реакції колір колоній не змінюється.

Цінною реакцією для відрізнення *M. tuberculosis* від нетуберкульозних мікобактерій є проба на термостабільність каталази.

Термостабільність каталази

Каталаза у кислотостійких мікобактерій різна. У вірулентних мікобактерій вона швидко і легко руйнується при нагріванні до 65–68 °С. У НТМБ і кислотостійких сапрофітів вона термостабільна.

Визначення активності термостабільної каталази

Готують 3,0 мл густої зависі мікобактерій. 1,5 мл зависі переносять у центрифужну пробірку, яку нагрівають на водяній бані при 68 °С протягом 10 хв. Потім пробірку охолоджують і на предметне скло наносять по 1 краплі зависі: на один кінець – непрогріту (служить контролем), на другу – завись після нагрівання. До цих двох зависів додають по 1 краплі пергідролю. Утворення пухирців свідчить про активність ферменту, відсутність – про пригнічення. На підставі цієї реакції легко відрізнити *M. tuberculosis*, у яких каталаза завжди термолабільна, від більшості НТМБ і кислотостійких сапрофітів із різко термостабільною каталазою.

Термостабільність каталази, так само як і її активність, враховується по 3-бальній системі.

Співвідношення окисно-відновних ферментів у різних видів мікобактерій показано в табл. 9.

Реакція гідролізу твіну-80

Важливою реакцією для ідентифікації мікобактерій всередині □□ і □□□ груп (за Раньоном), є реакція гідролізу твіну-80. Твін-80 зв'язує нейтральний

червоний, і суміш до реакції має солом'яно-жовтий колір. Принцип реакції – у ензимному гідролізі твіну-80. При цьому відбувається звільнення нейтрального

Таблиця 6 – Ідентифікація мікобактерій по окисно-відновним ферментам □ ніациновий пробі

Мікобактерії	Каталаза	Пероксидаза	Термостабільність каталази	Ніацинова проба
Нетуберкульозні	+++	–	+	–
<i>M. tuberculosis</i> , чутливі до ізоніазиду	++	++	–	+
<i>M. tuberculosis</i> , стійкі до ізоніазиду	+, ±	–	–	+
<i>M. bovis</i>	++	++	–	–

червоного і забарвлення відновлюється від рожевого до червоного. Позитивна реакція відзначається у *M. aquae* (на відміну від *M. scrofulaceum*, у яких реакція негативна), а з □□□-□ групи вона позитивна тільки у *M. terrae*.

Реактиви.

1/15 М фосфатний буфер (рН=7) – 100,0 мл.

Твін-80 – 0,5 мл.

0,1 % основний нейтральний червоний – 2,0 мл. Краще розчинити 0,1 г нейтраль-рот не в 100,0, а в 85,0 мл дистильованої води.

Змішати усі три реагенти. Розлити по 4,0 мл у пробірки і автоклавувати при 120 °С 15 хвилин. Протягом доби перевіряють на стерильність у термостаті і зберігають у холодильнику. Стабільність розчину – не більше 2-х тижнів.

Хід дослідження. Емульгують 3 бактеріологічні лопатки культури в пробірках із приготованим субстратом (Твін-80 із нейтральним червоним). Пробірки поміщають у термостат. Реакцію перевіряють через 4 години, на 5-у і 10-у добу. Тест вважається позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до 10-ої доби, негативним, якщо забарвлення не з'явилося (модифікована методика Вайна). Контролем є пробірка з середовищем без реактивів.

Всі перелічені тести не повинні використовуватися в лабораторії одночасно. З іншого боку, не можна зупиняти свій вибір на застосуванні тільки одного з диференціально-діагностичних тестів, оскільки жоден тест не має 100 % чутливості і специфічності. Тільки поєднання декількох тестів дозволяє провести чітку ідентифікацію мікобактерій.

У практичних лабораторіях для ідентифікації *M. tuberculosis* широке застосування одержали визначення здатності росту мікобактерій на середовищі з ТСН і визначення активності нітратредуктази. Можна також використовувати в комплексі визначення нітратредуктази і ніацинового тесту.

У випадках, коли ідентифікація не пройшла (один з тестів позитивний, інший – негативний), слід пересіяти культуру, дочекатися отримання пишного росту і поставити обидва тести знову. Для отримання правильного результату ідентифікації можна додати ще один (третій з перелічених) тест.

Зважаючи на появу випадків БЦЖ-ускладнень у дітей, необхідно проводити диференційну діагностику між *M. tuberculosis* і *M. bovis*-BCG. З цією метою рекомендується використовувати три тести: визначення нітратредуктази, ніацину і здатність до росту на середовищі з нікотинамідом або циклосерином. Культури *M. bovis*-BCG не мають ніацину, не відновлюють нітрати і дають ріст на середовищах з вищезазначеними реактивами.

Культури, що не піддаються ідентифікації в умовах лабораторії протитуберкульозного диспансеру, рекомендується направляти в Центральну референс-лабораторію для проведення поглибленої ідентифікації.

Біохімічні властивості є основою визначення виду культур, виділених з патологічного матеріалу.

Остаточна біохімічна ідентифікація із застосуванням складних біохімічних досліджень проводиться у лабораторіях III рівня.

3. При диференціації мікобактерій крім використання комплексу тестів, застосованих при вивченні НТМБ культур, необхідно користуватися обов'язковими для кожного виду тестами (так звані ключові тести), проведення яких полегшує ідентифікацію культур.

Таблиця 7 – Ключові тести для диференціації окремих видів мікобактерій

Види мікобактерій	Тести	Результати тесту, властиві для даного виду мікобактерій
1	2	3
<i>M. tuberculosis</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	+
	Відновлення нітратів	+
	Каталаза при 68 °С.	–
	Утворення пігменту в темряві	–
	Ріст на середовищі з 500 мкг/мл ПНБК	–
<i>M. bovis</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Каталаза при 68 °С	–
	Утворення пігменту в темряві	–
	Ріст на середовищі з 500 мкг/мл ПНБК	–
<i>M. kansasii</i>	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	+
	Каталаза при 68 °С	+
	Утворення пігменту після освітлення	+
	Гідроліз твіну-80	+
<i>M. scrofulaceum</i>	Швидкість росту	Повільний
	Каталаза при 68 °С	+
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	–
<i>M. goodii</i> (<i>M. aquae</i>)	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	–
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	+

Продовження таблиці 7.

<i>M. xenopi</i>	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	–
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	–
<i>M. avium</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Гідроліз твіну-80	–
<i>M. intracellulare</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Гідроліз твіну-80	–
<i>M. gastri</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Каталаза при 68 °С	–
	Утворення пігменту на світлі	–
	Гідроліз твіну-80	+
<i>M. terrae</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	+
	Каталаза при 68 °С	–
	Утворення пігменту на світлі	+
	Гідроліз твіну-80	+
<i>M. fortuitum</i>	Швидкість росту	Швидкий
	Відновлення нітратів	+
	Утворення пігменту в темряві	–
	Толерантність до 5,0 % NaCl	+
<i>M. smegmatis</i>	Швидкість росту	Швидкий
	Утворення пігменту в темряві	–
	Толерантність до 5,0 % NaCl	+
<i>M. phlei</i>	Швидкість росту	Швидкий
	Утворення пігменту в темряві	+
	Толерантність до 5,0 % NaCl	+

Крім перерахованих тестів, для усіх безпігментних культур необхідно вивчати ніацинову пробу, і якщо вона негативна, перевіряти амідазну активність. Використання описаних тестів дає можливість розділити НТМБ на патогенні для людини і випадкові супутні сапрофіти, які не впливають на захворювання.

Для клініки особливе значення мають наступні види НТМБ:

M. kansasii, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. intracellulerae*, *M. fortuitum*.

Для НТМБ, крім вказаних нами особливостей (швидкості росту, пігментоутворення, морфології колоній і паличок, температурного оптимуму), характерними є: негативна ніацинова проба, відсутність пероксидазної активності при високій активності каталази, виражена термостабільність каталази у більшості мікобактерій, ріст на живильних середовищах із ПНБК і саліциловокислим натрієм, відсутність у більшості випадків корд-фактору.

Характерним також для НТМБ є первинна стійкість до більшості ПТП. Для диференціації *M. tuberculosis* і *M. bovis* від НТМБ, відмінності їх один від одного, а також для розрізнення НТМБ всередині груп зручно користуватися розміщеною нижче у таблиці 8.

Таблиця 8 – Основні тести для диференціації *M. tuberculosis*, *M. bovis* від інших мікобактерій

Тести	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	Інші мікобактерії
Ніациновий тест	+	–	–
Ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена із 500 мкг/мл ПНБК або салциловокислого натрію	–	–	+
Проба на термостабільність каталази	–	–	+
Каталазна активність у ГНК-резистентних штамів	+, ±, –	+, ±, –	+++

Основні тести, що відрізняють *M. tuberculosis* від *M. bovis*

Тести	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>
Ніациновий тест	+	–
Нікотинамідаза	+	–
Відновлення нітратів	+	–

I група – фотохромогенні мікобактерії

	25 °C	37 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Гідроліз твіну-80
<i>M. kansasii</i>	+	±	–	+	+
<i>M. simiae</i>	+	±	–	–	+
<i>M. marinum</i>	+	±	–	–	–

Для розрізнення всередині групи необхідні наступні тести:

утворення пігменту, гідроліз твіну-80, ніацинова проба (*M. simiae* ±), відновлення нітратів, ріст при 25 °C і 37 °C

II група – скотохромогенні мікобактерії

Штами	25 °C	37 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Уреаза	Гідроліз твіну-80
<i>M. aquae</i> (<i>M. gordonae</i>)	+	±	–	–	+	+
<i>M. aquae</i>	+	±	–	–	–	+
<i>M. scrofulaceum</i>	+	±	–	–	+	–

III група – нефотохромогенні мікобактерії (основні тести)

	25 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Гідроліз твіну-80	Каталаза 68 °C	Амідазна активність
<i>M. avium</i>	±	±	–	–	+	H; П
<i>M. intracellulare</i>	±	±	–	–	+	H; П
<i>M. terrae</i>	+	–	+	+	+	0
<i>M. triviale</i>	+	–	+	+	+	H; П; 0*
<i>M. xenopi</i>	–	+	–	–	+	H; П

M. terrae Вайна – 0; *M. terrae* Т сукамура – H, П; H – нікотинамід, П – піразинамід, 0 – негативна реакція.

IV група – мікобактерії, що швидко ростуть (основні тести)

	25 °C	37 °C	45 °C	52 °C	Гідроліз твіну-80
<i>M. fortuitum</i>	+	+	–	–	±
<i>M. phlei</i>	+	+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	–	+

З усіх наведених методик дослідження жодна, сама по собі, не може відповісти на запитання про належність штаму до одного із видів. Тільки їх комплексне застосування дає можливість правильно ідентифікувати виділені культури. При ідентифікації бактеріологи повинні дати відповідь на наступні питання: чи є виділені мікроорганізми мікобактеріями, якщо так, то до якого виду вони належать.

У Додатку 1 наведена видова ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій.

4. Для забезпечення якості досліджень необхідно регулярно контролювати якість і придатність реактивів і обладнання, правильність реєстрації результатів.

При проведенні процедур ВКЯ досліджень, одночасно з діагностичними пробами необхідно тестувати контрольні культури *M. tuberculosis* H₃₇R_v, *M. bovis* і *M. fortuitum* або *M. gordonae*. У зв'язку з цим необхідно вести музей цих культур.

Слід звернути увагу на те, що *M. fortuitum*, так само, як і *M. tuberculosis*, дає позитивну нітратредуктазну реакцію.

5. Імунохроматографічна ідентифікація комплексу *M. tuberculosis*

Біохімічні, імунологічні і молекулярно-біологічні дослідження *M. tuberculosis* привели до виявлення декількох антигенів, які виявилися корисні для розробки досконаліших методів і комерційних тестів ідентифікації *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), як відомо, продукують, тобто виділяють в живильне середовище, більше 30 різних білків, один з переважаючих – МРТ64 (МРВ64). Було встановлено, що НТМБ не продукують цей білок, таким чином, виявлення МРТ64 (МРВ64) в пробі свідчить про приналежність дослідного штаму до комплексу *M. tuberculosis*.

Імунохроматографію можна віднести до групи реакцій з міченими антитілами. У реакції використовують моноклональні антитіла до шуканого антигену, адсорбовані на мікрочастках (забарвлений латекс або частки колоїдного золота), і моноклональні антитіла до того ж антигену, імобілізовані у вигляді смуги на хроматографічному папері. Крім того, в цій реакції є внутрішній контроль (антивидові антитіла, також закріплені у вигляді смуги на хроматографічному папері).

Тест-системи, ґрунтовані на цьому принципі, мають високу специфічність. Цей метод може бути використаний для швидкої ідентифікації комплексу *M. tuberculosis*, отриманих з рідких і твердих живильних середовищ.

Підготовлений дослідний матеріал (суспензія мікобактерій або позитивна рідка культура) в невеликій кількості (100 мкл) вноситься в стартове вікно тест-системи. Тут відбувається взаємодія антигену з антитілами, адсорбованими на частках, і починається рух комплексів, що утворилися, за рахунок капілярності паперу. Дійшовши до антитіл, розташованих на папері у вікні обліку результату, ці комплекси зв'язуються, при цьому частки латексу або колоїдного золота проявляються у вигляді лінії блакитного (латекс) або коричневого кольору.

Наявність смуги у вікні обліку результату свідчить про приналежність дослідного штаму до комплексу *M. tuberculosis*, відсутність – про приналежність дослідного штаму мікобактерій до НТМБ. Оскільки частки, навантажені антитілами, беруться в надлишку, частина їх рухається далі і зв'язується у вікні внутрішнього контролю реакції. Смуга в цьому вікні свідчить про правильну роботу тест-системи. У разі відсутності смуги внутрішнього контролю реакції результати інтерпретувати не можна. Інтерпретація результатів тесту проводиться через 15 хв. після внесення суспензії мікобактерій в стартове вікно. Виконувати дослідження слід відповідно до інструкції виробника.

Внутрішній контроль якості досліджень

Відразу ж після отримання нової партії тестів має бути проведене тестування свідомо позитивних і негативних проб для того, щоб перевірити, чи не сталося ушкодження тестів в ході транспортування.

Внутрішній контроль якості досліджень проводиться кожного разу при проведенні тестування.

В якості позитивного контролю можуть бути використані:

- музейний штам H₃₇R_v або клінічний ізолят *M. tuberculosis*;
- суспензія 1,0 мкл (еквівалент 1 петлі діаметром 1,0 мм) колоній *M. bovis* BCG в 0,2 мл 10 ммоль/л фосфатно-сольового буфера, що містить 0,1% твіну-80;
- рідка культура *M. bovis* BCG (McFarland 1 (3–6x10⁷ КУО/мл), вирощена в рідкому середовищі.

Слід мати на увазі, що деякі штами *M. bovis* BCG (Glaxo, пастерівський, тайський) не експресують МРТ64 або МРВ64. Тому тільки бразильський, японський (Токіо), російський, шведський штами *M. bovis* BCG можна використовувати в якості позитивного контролю.

В якості негативного контролю можуть бути використані:

- незасіяне рідке середовище;
- 10,0 ммоль/л фосфатно-сольовий буфер, що містить 0,1% твіну-80;
- будь-яка НТМБ, наприклад, *M. smegmatis* або *M. gordonae*.

6. Диференціацію *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*) і ідентифікацію НТМБ рекомендується проводити з використанням молекулярно-генетичних методів дослідження.

Використання молекулярно-генетичних методів для ідентифікації мікобактерій ґрунтоване на гібридизації ДНК дослідного штаму із

специфічними для виду мікобактерій ДНК-зондами (див. Додаток 2). Застосування молекулярно-генетичних методів дозволяє проводити ідентифікацію мікобактерій впродовж декількох робочих днів.

Найбільш ефективними визнані молекулярно-генетичні методи, які ґрунтовані на гібридизації з ДНК-зондами (Line Probe Assay, LPA), зокрема, GenoType Mycobacterium CM/AS, GenoType MTBC, INNO-LiPA MYCOBACTERIA. Технологія проведення досліджень з використанням цих методів включає наступні етапи:

Виділення ДНК з культур мікобактерій.

ПЛР для ампліфікації фрагментів генів мікобактерій.

Гібридизація ПЛР-продуктів з ДНК-зондами, які іммобілізовані на смужці.

Візуалізація результатів гібридизації, при цьому визначається приналежність мікобактерій до певного виду.

Виконувати дослідження слід відповідно до інструкції виробника (Додаток 2).

7. Збереження виділених штамів мікобактерій

Короткочасне зберігання

Допускається зберігання культури мікобактерій при температурі 2–8 °С на щільних живильних середовищах впродовж 1 року або при кімнатній температурі (не вище 20 °С) в темному провітрюваному місці до 6 міс.

Зберігання культур в рідкому живильному середовищі допускається на термін не більше 1 міс. при температурі 2–8 °С.

Довготривале зберігання

Клінічні ізоляти і референс-штами для контролю якості мають бути збережені/заархівовані в належних умовах для збереження життєздатності і специфічних характеристик штаму. Щоб уникнути багатократного субкультивування, яке може привести до генетичних змін, які призводять до зміни фенотипічних і біологічних характеристик штаму, доцільно заморожувати культури мікобактерій, які можуть зберігатися в таких умовах впродовж декількох років (–20 °С) або десятиліть (–70 °С). Слід мати на увазі, що життєздатність *M. tuberculosis* знижується набагато швидше при (–20 °С), ніж при (–70 °С), а також те, що велика щільність замороженої суспензії сприяє підтримці життєздатності культури мікобактерій. Штами для контролю якості бажано зберігати при (–70 °С) і використовувати їх впродовж 1-го року, оскільки після закінчення цього терміну життєздатність може значно зменшитися.

Середовище для заморожування

Використовують один з наступних варіантів середовища для заморожування:

10,0 % розчин молока, стерилізований при температурі 110 °С впродовж 10 хв. (можливе використання сухого молока або комерційного реагенту Skimmed Milk Powder);

рідке живильне середовище з підвищеним вмістом гліцерину, наприклад, Middlebrook 7H9 з добавкою ADC або триптіказо-соевий бульйон, приготовані згідно інструкції виробника;

- 5,0 % гліцерин в 0,9 % розчині NaCl, стерилізований при температурі 110 °C впродовж 10 хв.

Процедура

Використовують тільки свіжі культури мікобактерій, що виростили на щільному яєчному середовищі. Якщо культура є старою (більше 3 тижнів), її пересівають на свіже середовище, культивують при 37 °C. Як тільки з'являється хороший ріст, використовують цю культуру для заморожування.

Бактеріологічною петлею знімають максимально можливу кількість колоній, намагаючись не захоплювати живильне середовище, і вносять в кріопробірку, що містить 1,5 мл одного з вище перелічених середовищ.

Пробірки маркують із зазначенням дати приготування суспензії, роблять запис в журналі.

VII. ДОСЛІДЖЕННЯ ПО ВИЗНАЧЕННЮ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ ЧУТЛИВОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

1. Для дослідження МЧ мікобактерій до ПТП потрібно дотримуватись певних стандартів досліджень.

Дослідження МЧ *M. tuberculosis* необхідно проводити в ШББ 2-го класу, які забезпечують не тільки захист оператора, але і збереження від контамінації біологічного об'єкту.

При отриманні від хворого культур *M. tuberculosis* з різного дослідного матеріалу (мокротиння, лаважна рідина, сеча, гній, біопсія, післяопераційний матеріал та ін.) необхідно досліджувати кожний виділений штам.

При одночасному отриманні від хворого двох і більше культур *M. tuberculosis* з однорідного діагностичного матеріалу достатньо досліджувати один штам, який отриманий з одного зразка дослідного матеріалу.

При незначному рості культури (1–2 колонії в пробірці) необхідно зібрати бактеріальну масу з різних пробірок однорідного дослідного матеріалу та здійснювати визначення медикаментозної чутливості.

Визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП необхідно проводити тільки з використанням ХЧ субстанцій ПТП.

На результати ТМЧ суттєво впливають такі чинники, як використане для тестування живильне середовище і стабільність препаратів, що вносяться до нього.

Істотно впливають на стабільність ПТП умови їх стерилізації і зберігання.

Багато ПТП є солями, таким чином, біологічно активні субстанції є тільки частиною загальної маси молекули, тоді як інші радикали (наприклад, сульфати, гідрохлориди і т.д.) можуть складати значну частку загальної маси. У зв'язку з цим, при приготуванні живильних середовищ з препаратами

необхідно враховувати кількість активної речовини і молекулярну формулу препарату.

Стандартне середовище для визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП застосовується середовище Левенштейна-Єнсена. Це середовище рекомендується до використання всіма мікробіологічними лабораторіями ПГС України для отримання порівняних результатів. Дотримання стандартної технології приготування живильного середовища з препаратами має найважливіше значення для отримання достовірних результатів тестування. Як вже згадувалося раніше, для приготування живильних середовищ з метою визначення чутливості *M. tuberculosis* до ПТП повинні використовуватися тільки ХЧ субстанції препаратів. При приготуванні робочих розчинів з необхідними концентраціями активної субстанції розрахунки розміру наважки слід проводити з урахуванням відсотка активності препарату, яка може варіювати від серії до серії.

Особливістю такого ПТП, як піразинамід (Z), є його висока протитуберкульозна активність при знижених значеннях кислотності середовища (рН 5,5). В той же час для культивування *M. tuberculosis* на щільних яєчних середовищах оптимальним є значення рН, близьке до нейтрального. Ці обставини не дозволяють використовувати стандартні методики для визначення чутливості *M. tuberculosis* до Z на щільних яєчних живильних середовищах.

Велике значення при постановці ТМЧ *M. tuberculosis* має правильна підготовка інокулята. Тому правильне приготування бактеріальної суспензії штаму має дуже велике значення для отримання достовірного результату. Якщо число бактерійних одиниць дуже мале, стандартної кількості інокулята буде недостатньо для визначення «критичної» частки стійких штамів. Якщо число мікобактерій дуже велике, ріст резистентних штамів, що природним чином утворюються, може симулювати стійкість до ПТП.

Важливим також є вік культури, що використовується для приготування посівної суспензії. Тести на визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП повинні проводитися тільки з культурами, що активно ростуть (3–4 тижня). Використання старої культури для приготування посівної суспензії може призвести до хибного результату дослідження.

Оскільки, у разі використання непрямих методів ТМЧ *M. tuberculosis*, підготовка бактерійного інокуляту проводиться в лабораторії, при приготуванні мікобактеріальної суспензії для засіву може бути вибране таке співвідношення чутливих і резистентних мікроорганізмів, яке не відповідає дійсній ситуації в ураженому органі пацієнта. У зв'язку з цим, необхідно правильно проводити відбір бактерійної маси для дослідження (обов'язково *робити змиви зі всієї поверхні середовища з культурою*). Важливе значення при проведенні ТМЧ має також тривалість інкубації.

2. Для визначення МЧ *M. tuberculosis* повинні використовуватися тільки стандартизовані методи дослідження, що дозволяють:

правильно вести лікування пацієнтів;

інтерпретувати і порівнювати дані, одержані з різних джерел; проводити оцінку рівнів МС *M. tuberculosis* до ПТП, а також тенденцій, які спостерігаються в різних регіонах або країнах.

В даний час немає єдиного універсального методу визначення МЧ *M. tuberculosis*. Існують культуральні методи з використанням щільних і рідких живильних середовищ з автоматичною детекцією росту мікобактерій, а також молекулярно-генетичні експресні методи.

Вибір того або іншого методу визначається методичними підходами, що традиційно склалися і використовуються в даній країні. Для ефективного управління моніторингом, забезпеченням епідеміологічного нагляду за МС *M. tuberculosis* до ПТП і розповсюдженням стійких штамів збудника, а також для порівнювання результатів досліджень і ефективності лікування в межах світової спільноти в масштабах кожної країни рекомендується використовувати тільки один з наявних уніфікованих методів, регламентований внутрішніми нормативними документами країни.

Всі наявні методи визначення МЧ *M. tuberculosis* можна умовно розділити на 2 категорії:

методи прямого визначення МЧ *M. tuberculosis*;

методи непрямого визначення МЧ *M. tuberculosis*.

При використанні методів *прямого визначення МЧ M. tuberculosis*, мокротиння або інші клінічні матеріали, що заздалегідь знезаражені і гомогенізовані, висіваються безпосередньо на середовища, що містять відповідний препарат. Кількість інокулята визначається в залежності від кількості КСП, визначеної при мікроскопії мазка.

Методи прямого визначення МЧ мають низку недоліків:

для дослідження не можна використовувати зразки діагностичного матеріалу, що мають негативний результат мікроскопії;

при проведенні даного дослідження підвищується ризик контамінації;

може спостерігатися недостатній ріст культури, що не дозволяє зробити достовірні висновки;

основним недоліком є неможливість стандартизувати методику.

При використанні *методів непрямого визначення МЧ M. tuberculosis* проводиться виділення мікроорганізмів з клінічних зразків при культивуванні, а потім на середовище, що містить препарат, висівається гомогенна суспензія або культура, що виросла на бульйоні.

3. Визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів методом пропорцій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена (модифікований метод Канетті)

Даний метод широко застосовується в усьому світі, є коректним, інформативним і точним.

Принцип методу полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на ТБ, до ПТП в «критичних» концентраціях. «Критична» концентрація – один з критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість

кожного медикаментозного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМЧ. «Критична» пропорція – також один із критеріїв стійкості – це відсоток стійких особин в бактеріальній популяції, при якому або вище якого штам вважається стійким до даного медикаментозного препарату. Якщо кількість стійких особин до якогось антибактеріального препарату в популяції буде менше 1,0 %, такий штам вважається чутливим до даного препарату. Якщо стійкість особин в популяції більше 1,0 % – штам вважається стійким до даного препарату.

В даний час в світі застосовується модифікований метод пропорцій з двома контролями.

Переваги методу пропорцій:

завдяки постійному візуальному контролю за ростом та розподілом бактеріальної популяції у 2-х контрольних пробірках, підрахунку кількості колоній, що вирости, можна більш об'єктивно оцінити результати резистентності в пробірках з препаратами;

можливість оцінити бактеріальну популяцію *M. tuberculosis* не тільки як чутливу або стійку, але і розподілити її за ступенем резистентності.

Приготування живильних середовищ з препаратами

Середовища для дослідження МЧ *M. tuberculosis* до ПТП повинні містити точні «критичні» концентрації антибактеріальних препаратів, які відповідають їх активності. Тому при приготуванні розчинів препаратів необхідно враховувати їх антибактеріальну активність. Показники антибактеріальної активності повинні бути вказані в паспорті до препарату.

Наважки ХЧ субстанцій препаратів готують за допомогою вагів, що повірені та дозволяють проводити зважування з точністю до 0,0001 г. Це забезпечує точність наважки препаратів з похибкою не більше $\pm 1,0$ %.

При зберіганні розведених препаратів при температурі (+5) °С і вище більше 6 годин може відбутися зниження їх активності. Тому розчини необхідно готувати безпосередньо перед приготуванням середовищ. У лабораторіях, де є морозильні камери, що підтримують температуру нижче (–20) °С, можливо зберігання розведених препаратів протягом 6 місяців за умови недопущення їх відтаювання і повторного заморожування. Така технологія дає певні переваги: приготування більшого об'єму розчину дозволяє зважувати велику наважку препарату, що, відповідно, зменшує похибку зважування і втрати речовини при зважуванні. У разі заморожування розчину препарату він повинен бути розлитий по кріопробірках в об'ємі, необхідному для додавання в одну порцію середовища.

Для дослідження МЧ *M. tuberculosis* до ПТП методом пропорцій застосовується щільне ячне середовище Левенштейна-Єнсена. Після додавання препарату до середовища необхідно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни, щоб забезпечити рівномірний розподіл препарату в середовищі. Згортання середовища з препаратом повинне проводитися в тих же умовах, що і середовища без препарату. Коагуляцію проводять при 85 °С протягом 30 хв.

У табл. 12 вказані «критичні» концентрації ПТП до яких проводиться дослідження МЧ *M. tuberculosis* методом пропорцій. Відбір препаратів до яких визначається МЧ виділених штамів *M. tuberculosis* залежить від категорії захворювання, випадку та профілю МС *M. tuberculosis*, отриманого при попередніх дослідженнях, якщо такі проводилися.

Приготування розведень протитуберкульозних препаратів

Для приготування розведень використовуються ХЧ субстанції препаратів. Схема процедур:

Ізоніазид (Н) – 0,2 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

* при приготуванні наважки кожного з препаратів 1-го і 2-го ряду необхідно враховувати потенцію ПТП, яка залежить від фірми-виробника та хімічного складу ХЧ субстанції препарату; в кожному випадку необхідно робити відповідне перерахування на вміст активної речовини ХЧ субстанції препаратів.

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

Таблиця 9 – «Критичні» концентрації протитуберкульозних препаратів для тесту медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* методом пропорцій на середовищі Левенштейна-Єнсена

Назва препарату	Концентрація, мкг/мл
<i>Препарати I ряду</i>	
Ізоніазид	0,2
Рифампіцин	40,0
Етамбутол	2,0
<i>Препарати II ряду</i>	
Амікацин	30,0
Канаміцин	30,0
Капреоміцин	40,0
Протіонамід (етіонамід)	40,0
Левофлоксацин	2,0
Моксифлоксацин	1,0

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100,0 мкг/мл;

1,0 мл (3-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 10,0 мкг/мл;

внести 1,0 мл (4-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 0,2 мкг/мл.

Рифампіцин (R) – 40,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 2,0 мл етилового спирту + 8,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 2,0 мл (2-го розведення) в 48,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 40,0 мкг/мл.

Етамбутол (Е) – 2,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл;

внести 1,0 мл (3-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 2,0 мкг/мл.

Стрептоміцин (S) – 4,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 200 мкг/мл;

внести 1,0 мл (3-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 4,0 мкг/мл.

Амікацин (Am) – 30,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 1,5 мл (2-го розведення) в 48,5 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 30,0 мкг/мл.

Канаміцин (Km) – 30,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 1,5 мл (2-го розведення) в 48,5 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 30,0 мкг/мл.

Капреоміцин (Ст) – 40,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 2,0 мл (2-го розведення) в 48,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 40,0 мкг/мл.

Етіонамід (Ет) – 40,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 2,0 мл димексиду (DMSO) + 8,0 мл дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 2,0 мл (2-го розведення) в 48,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 40,0 мкг/мл.

Протіонамід (Рт) – 40,0 мкг/мл

50,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл димексиду (DMSO) + 8,0 мл дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 1000 мкг/мл;

внести 2,0 мл (2-го розведення) в 48,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 40,0 мкг/мл.

Левовфлоксацин (Lfx) – 2,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH* = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл;

внести 1,0 мл (3-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 2,0 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) – 0,25 мкг/мл

16,8 мг (16,95 мг) активної речовини чистої субстанції препарату + 10 мл 0,1 N NaOH = 1680 мкг/мл

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,0 мкг/мл

2,0 мл (2-го розведення) + 2,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл пробірки MGIT = 1 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) – 1,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH* = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл;

внести 0,5 мл (3-го розведення) в 49,5 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 1,0 мкг/мл.

ПАСК (Pas) – 1,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100,0 мкг/мл;

3,0 мл (3-го розведення) + 3,0 мл стерильної дистильованої води = 50,0 мкг/мл;

внести 1,0 мл (4-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 1,0 мкг/мл.

Приготування суспензії культури M. tuberculosis

Готують гомогенну бактеріальну суспензію в ізотонічному розчині натрію хлориду. Для цього культура, що виросла на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена знімається тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду, при цьому тампон повинен торкатися усієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють в пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчині натрію хлориду, культуру змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішнім стінкам пробірки. Пробірку залишають на 30 хв. при кімнатній температурі для осадження крупних часточок культури.

Суспензію культури стандартизують по бактеріальному стандарту мутності (1 McF).

У якості стандарту мутності МакФарланда застосовується суспензія слабозривної у воді солі сульфату барію. Для її приготування використовують наступні розчини: $BaCl_2 \times 2H_2O$ – 1,0 % розчин, H_2SO_4 – 1,0 % розчин.

Для отримання суспензії необхідної мутності змішують розчини хлориду барію і сірчаної кислоти в певних пропорціях

Таблиця 10 – Визначення бактеріальної мутності за стандартом МакФарланда

Одиниці мутності за стандартом МакФарланда	Число мікробних тіл/мл	Кількість 1,0 % розчину $BaCl_2 \times 2H_2O$ (мл)	Кількість 1,0 % розчину H_2SO_4 (мл)
--	------------------------	--	--

0,5	$1,5 \times 10^8$	0,05	9,95
1,0	$3,0 \times 10^8$	0,1	9,9
2,0	$6,0 \times 10^8$	0,2	9,8
3,0	$9,0 \times 10^8$	0,3	9,7
4,0	$12,0 \times 10^8$	0,4	9,6
5,0	$15,0 \times 10^8$	0,5	9,5
6,0	$18,0 \times 10^8$	0,6	9,4
7,0	$21,0 \times 10^8$	0,7	9,3
8,0	$24,0 \times 10^8$	0,8	9,2
9,0	$27,0 \times 10^8$	0,9	9,1
10,0	$30,0 \times 10^8$	1,0	9,0

Стабільність стандарту МакФарланда – 6 місяців при зберіганні у темряві.

Останнім часом в лабораторіях, в тому числі і в Україні, широко застосовуються сучасні оптичні прилади для зручного і швидкого визначення мутності бактеріальної суспензії. Принцип роботи такого приладу – оптична абсорбція з видачею результатів вимірювання в одиницях за МакФарландом.

Процедура приготування суспензії призводить до утворення інфекційного аерозолі! Вона повинна проводитися тільки з використанням товстостінних (переважно боросилікатних) пробірок без видимих пошкоджень! Процедура повинна проводитися в ШББ 2-го класу!

З цієї суспензії готують наступні розведення:

1)	1:10 (10^{-1})	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл суспензії 1 McF);	
2)	1:100 (10^{-2})	контроль 1 (K ₁)	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 1);
3)	1:1000 (10^{-3})	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 2);	
4)	1:10000 (10^{-4})	контроль 2 (K ₂)	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 3).

Пробірки маркують.

Із розведення 10^{-2} вносимо по 0,1 мл бактеріальної суміші в один з двох контролів (K₁) і в усі пробірки з препаратами. Кінцева концентрація бактеріальної суміші в пробірках, що засіяні, дорівнює 10^{-3} .

Із розведення 10^{-4} вносимо по 0,1 мл бактеріальної суміші в другий контроль (K₂). В пробірках з середовищем кінцева концентрація бактеріальної суспензії дорівнює 10^{-5} .

Після закінчення посіву, засіяні пробірки переміщують в горизонтальні штативи і поміщають для інкубації в термостат при температурі 37 °С. При цьому поверхня скосу живильного середовища повинна знаходитися в горизонтальній площині, а нахил штатива повинен виключити торкання пробки з матеріалом посіву; суспензія, що засівається, повинна рівномірно покривати всю поверхню скосу середовища.

Через 2 доби можна перевести пробірки у вертикальні штативи, проте ця процедура не носить обов'язкового характеру.

Посіви переглядають щотижня. В разі наявності росту в контрольних пробірках через 4 тижні після посіву, максимум через 6 тижнів, реєструють отримані результати. Постановка ТМЧ методом пропорцій наведена на схемі 1.

Оцінка результатів

Кількість колоній, що вирости в контрольній пробірці K_1 (вихідне розведення мікробної суспензії 1:100) приймається за 100 %; кількість колоній, що вирости в K_2 відповідає 1,0 % усіх бактерій популяції.

Якщо в контрольних пробірках K_1 і K_2 при посіві досліджуваного штаму *M. tuberculosis* спостерігається ріст відповідно до вищезгаданих пропорцій (100:1), можна робити облік результатів стійкості в пробірках з препаратами. Інтенсивність росту в контролях і в пробірках з препаратами оцінюються в такий спосіб

культура *M. tuberculosis* є «чутливою», якщо в пробірці з «критичною» концентрацією препарату нема росту, або кількість колоній менше ніж в контролі K_2 з 1,0 % бактеріальної популяції;

культура *M. tuberculosis* є «стійкою», якщо в пробірці з «критичною» концентрацією препарату вирости більше колоній ніж в контролі K_2 з 1,0 % бактеріальної популяції.

Дослідження потрібно повторити, якщо:

немає пропорційності росту між K_1 і K_2 ;

відсутній ріст в K_1 і K_2 , або в однієї з контрольних пробірок;

K_1 , K_2 або один з них забруднено;

забруднені пробірки з препаратами.

4. Визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів непрямим методом абсолютних концентрацій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Суть методу полягає в тому, що здійснюють дозований посів ретельно підготовленої мікобактеріальної суспензії з культури *M. tuberculosis* в пробірки з живильним середовищем Левенштейна-Єнсена, що містить певні концентрації ПТП і контрольні пробірки без препаратів. Зазвичай використовується «критична» концентрація препаратів, яка є критерієм стійкості, пригнічує ріст всіх або майже всіх мікобактерій, що визначається як наявність 20 або менше колоній збудника та дає можливість визначити культуру *M. tuberculosis* як чутливу або стійку до даного ПТП.

Приготування живильних середовищ з препаратами

Для дослідження МЧ мікобактерій до ПТП застосовується щільне ячне середовище Левенштейна-Єнсена. Після додавання препарату до середовища необхідно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни та забезпечуючи рівномірний розподіл препарату в середовищі. Згортання середовища з препаратом повинне проводитися в тих же умовах, що і середовища без препарату. Згортання проводять при 85 °С протягом 30 хв.

У табл. 14 вказані «критичні» концентрації ПТП для ТМЧ *M. tuberculosis* до яких проводяться дослідження МС мікобактерій методом абсолютних концентрацій.

Середовища, що входять в набір для тестування 1-го штаму, повинні готуватися з однієї партії середовища Левенштейна-Єнсена в один день!

Приготування і засів мікобактеріальної суспензії

На кожній пробірці з середовищем надписують номер культури і назву препарату. Для зручності подальшого обліку результатів дослідження МЧ мікобактерій рекомендується виконувати написи на верхній частині пробірки зі сторони, де знаходиться нахил живильного середовища; крім того, пробірки з кожного набору середовищ слід розміщувати в штативах в однаковій певній послідовності (відповідно до граф лабораторного журналу).

Приготування живильних середовищ з препаратами та схема розведень проводиться таким же чином як при визначенні МЧ мікобактерій за методом пропорцій.

Таблиця 11– «Критичні» концентрації протитуберкульозних препаратів для тесту медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* непрямим методом абсолютних концентрацій на середовищі Левенштейна-Єнсена

Назва препарату	Концентрація, мкг/мл
<i>Препарати I (основного) ряду</i>	
Ізоніазид	0,2
Рифампіцин	40,0
Етамбутол	2,0
Стрептоміцин	4,0
<i>Препарати II ряду</i>	
Канаміцин	30,0
Амікацин	40,0
Капреоміцин	40,0
Етіонамід/протіонамід	40,0
Офлоксацин	2,0
ПАСК	2,0

Примітка. Виділені жирним шрифтом препарати складають обов'язковий набір ПТП 1-го ряду, до яких визначається МЧ *M. tuberculosis*. Тестування МЧ до решти препаратів рекомендується проводити за наявності резистентності до основних ПТП.

Готують гомогенну бактеріальну суспензію в ізотонічному розчині натрію хлориду. Для цього культура, що виросла на твердому живильному середовищі Левенштейна-Єнсена знімається тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду, при цьому тампон повинен торкатися усієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють в пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчині натрію хлориду, культуру змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішнім стінкам пробірки.

Пробірку залишають на 30 хв. при кімнатній температурі для осадження крупних часточок культури.

Суспензію культури стандартизують по бактеріальному стандарту мутності (1 McF). Для цього суспензію (без осаду) обережно, не торкаючись дна пробірки, відсмоктують піпеткою в іншу пробірку з ізотонічним розчином натрію хлориду.

З цієї суспензії готують розведення:

1:10 (10^{-1}) контроль 1(K_1) (4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл суспензії 1 McF)

Із суспензії з мутністю 1 McF вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші в контроль (K_1). Із розведення 10^{-1} вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші в усі пробірки з препаратами. Постановка ТМЧ методом абсолютних концентрацій наведена на схемі 2.

Кожну пробірку, з засіяною суспензією, закривають кришками, що загвинчуються і ставлять у вертикальний штатив, з тим щоб за час досліду суспензія рівномірно стікала по поверхні косяка середовища до дна пробірки.

Після закінчення посіву всіх суспензій, засіяні пробірки переміщують в горизонтальні штативи і поміщають для інкубації в термостат при температурі 37 °С. При цьому поверхня косяка живильного середовища повинна знаходитися в горизонтальній площині, а нахил штатива повинен виключити торкання пробки матеріалом засіву; суспензія, що засівається, повинна рівномірно покривати всю поверхню косяка середовища.

Через 2 доби можна перевести пробірки у вертикальні штативи, проте ця процедура не носить обов'язкового характеру.

Оцінка результатів визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП

Оцінку результатів визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП проводять через 3 тижні інкубації в термостаті. При поганому рості МБТ на контрольному живильному середовищі слід почекати ще 1–2 тижні до отримання вираженого росту в контролі, після чого видають остаточну відповідь.

При використанні методу абсолютних концентрацій культура *M. tuberculosis* вважається стійкою, якщо на живильному середовищі з певним препаратом виростає 20 і більше колоній мікроорганізмів при рясному рості у контрольній пробірці (без препарату).

5. Визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів 1-го і 2-го ряду з застосуванням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в автоматизованій системі ВАСТЕС 960

Загальнодоступні методи визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП 1-го ряду досконально вивчені, при цьому був досягнутий консенсус щодо відповідних методологій, «критичним» концентраціям препаратів та достовірності і відтворюваності результатів тестування. З іншого боку, у результаті проведення вибірових обстежень діючої практики відносно МЧ до

ПТП 2-го ряду були виявлені істотні відмінності стосовно методів тестування, «критичних» концентрацій препаратів і гранично допустимих пропорцій для виявлення резистентності. На цій підставі достовірність досліджень МЧ до ПТП 2-го ряду була поставлена під сумнів і стала очевидною крайня необхідність в стандартизації методів, встановлення критеріїв визначення резистентності та проведення професійного тестування.

Система ВАСТЕС MGIT 960 призначена для прискореної бактеріологічної діагностики ТБ і визначення МЧ мікобактерій до ПТП 1-го і 2-го ряду, дозволяє визначати МЧ мікобактерій до низьких і високих концентрацій препаратів, аналогічно методикам дослідження на щільних середовищах. Набір з індикаторних пробірок контролю росту (без препарату) і тих що містять ПТП розміщується на спеціальному носії з штрих-кодом, завдяки чому прилад здійснює безперервний моніторинг внесеної до пробірки культури.

Результати інтерпретуються автоматично, виходячи з обліку розмноження мікобактерій в пробірці без препарату, тобто у момент позитивності контролю росту, на 4–13-й день після інокуляції культури.

Набір MGIT 960 SIRE Kit включає 4 флакони з основними ПТП і 8 флаконів із збагачуючою рідиною. «Критичні» (низькі) концентрації препаратів досягаються в живильному бульйоні після розведення. Для цього в кожному флаконі з ліофілізованим препаратом додають 4,0 мл стерильної дистильованої або деіонізованої води, а потім 100 мкл переносять з нього в пробірку MGIT з бульйоном. Інші набори дають можливість проводити тестування у присутності високих концентрацій ПТП. Для отримання високої концентрації медикаментозних препаратів, відповідно до інструкції, в кожен флакон, що містить ліофілізований препарат, необхідно додати 2,0 мл стерильної дистильованої або деіонізованої води.

Для визначення МЧ мікобактерій до Z як контроль використовують спеціальні пробірки MGIT з рН = 5,9. У набір ВАСТЕС MGIT 960 PZA входять 2 флакони з ліофілізованим Z і 6 флаконів живильної добавки. Перед використанням у флакон ВАСТЕС MGIT 960 PZA, що містить ліофілізований препарат, слід додати 2,5 мл дистильованої/деіонізованої води, щоб одержати розчин, що містить 8000 мкг/мл Z. Потім 100 мкл одержаного розчину переносять в пробірку MGIT (рН=5,9) для досягнення «критичної» концентрації Z в бульйоні. Тривалість тестування становить 4–20 діб.

Нижче приводяться фінальні концентрації ПТП 1-го ряду, чутливість до яких може визначатися за допомогою приладу ВАСТЕС 960 (табл. 12).

Таблиця 12 – Кінцеві концентрації протитуберкульозних препаратів (мкг/мл) в наборах ВАСТЕС MGIT 960

Препарат	«Критична» (низька) концентрація	Висока концентрація
Стрептоміцин	1,0	4,0
Ізоніазид	0,1	0,2
Рифампіцин	1,0	–

Етамбутол	5,0	7,5
Піразинамід	100	–

Дослідження медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* в системі ВАСТЕС MGIT 960

Визначення МЧ виділених культур *M. tuberculosis* у вперше виявлених хворих та хворих на рецидив ТБ легень необхідно обов'язково проводити до S, H, E, R і Z. У випадку наявності МС до цих препаратів, або до H та R рекомендується проведення ТМЧ до Et, Pt, Cm, Lfx, Am, Km, Mfx, Ofx, лінезоліду (Lzd), клофазиміну (Cfz), бедаквіліну (Bdq) і деламаніду (Dlm).

У хворих з повторним курсом лікування (невдале лікування та лікування після перерви) і хворих з хронічним перебігом ТБ необхідно проводити визначення МЧ *M. tuberculosis* до всіх препаратів одразу ж з урахуванням результатів попередніх досліджень.

ТМЧ в системі MGIT повинні проводитися за наступною схемою:

позитивний результат в системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура MGIT → ТМЧ MGIT

позитивний результат в системі MGIT + негативний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура MGIT → ТМЧ MGIT

негативний результат на системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура Левенштейна-Єнсена → ТМЧ MGIT

Розчинення препаратів 1-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки ТМЧ

Всі процедури здійснюються в ШББ!

Стандартні концентрації препаратів для використання в системі ВАСТЕС MGIT (мкг/мл): S – 1,0; H – 0,1; R – 1,0; E – 5,0; Z – 100,0.

Схема процедур:

розчинити препарати (постачаються ліофілізованими у флаконах) шляхом додавання 4,0 мл стерильної дистильованої води у флакони з S, H, R і E; та 2,5 мл у флакон з Z;

промаркувати пробірки, вказуючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки:

для постановки одного ТМЧ мікобактерій до препаратів 1-го ряду необхідно підготувати 7 пробірок (рис. 3): 1 пробірка – контроль SIRE, 1 пробірка – контроль Z, 5 пробірок із препаратами (додаток 2 цього наказу)

за допомогою піпетки-дозатора зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок у пробірки із препаратами й контрольні пробірки (добавку PZA – у пробірку з Z й Z контроль; добавку SIRE – у пробірки з S, H, R, E і SIRE контроль) (рис. 4);

за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (S, H, R, E і Z – у відповідні марковані пробірки MGIT (додаток 2 цього наказу).

не додавати препарати в пробірки, які будуть використані для контролю росту мікобактерій.

Розчинення препаратів 2-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки ТМЧ *M. tuberculosis*

Стандартні концентрації препаратів 2-го ряду для використання в системі ВАСТЕС MGIT 960 (мкг/мл): Lfx – 1,0; Mfx – 0,5; Ofx – 2,0; Am – 1,0; Km – 2,5; Cm – 2,5; Et – 5,0; Pt – 2,5; Lzd – 1,0; Cfz – 1,0; Bdq – 1,0; Dlm – 0,06.

Схема процедур:

розведення протитуберкульозних препаратів.

Розведення препаратів готують з ХЧ субстанцій препаратів 2-го ряду з використанням стерильної дистильованої води або інших розчинників*.

Стрептоміцин (S) – 4,0 мкг/мл

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10000 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 200 мкг/мл;

внести 1,0 мл (3-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 4,0 мкг/мл.

Левофлоксацин (Lfx) – 1,0 мкг/мл

8,4 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH* = 840 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл;

внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 1,0 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) – 0,25 мкг/мл

10,5 мг (10,59 мг) активної речовини чистої субстанції препарату + 5 мл 0,1 N NaOH = 2100 мкг/мл;

2. 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210,0 мкг/мл

3. 1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 21,0 мкг/мл

Внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл пробірки MGIT = 0,25 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) – 1,0 мкг/мл

16,8 мг (16,95 мг) активної речовини чистої субстанції препарату + 10 мл 0,1 N NaOH = 1680 мкг/мл

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,0 мкг/мл

2,0 мл (2-го розведення) + 2,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл пробірки MGIT = 1 мкг/мл.

Амікацин (Am) – 1,0 мкг/мл

16,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату (амікацин сульфат)* + 10,0 мл дистильованої води = 1680 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,0 мкг/мл;

2,0 мл (2-го розведення) + 2,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл;

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 1,0 мкг/мл.

Канаміцин (Km) – 2,5 мкг/мл

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату* + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 2100 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210 мкг/мл;

внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 2,5 мкг/мл.

Капреоміцин (Cm) – 2,5 мкг/мл

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату (капреоміцин сульфат)* + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 2100 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210 мкг/мл;

внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 2,5 мкг/мл.

Етіонамід (Et) – 5,0 мкг/мл

21,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл димексиду (DMSO) = 4200 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 420,0 мкг/мл;

внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 5,0 мкг/мл.

Протіонамід (Pt) – 2,5 мкг/мл

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 2100 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210 мкг/мл;

внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 2,5 мкг/мл.

Лінезолід (Lzd) – 1,0 мкг/мл

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату (наважка 5,0 мг – вміст упаковки) + 2,9 мл стерильної дистильованої води = 1689 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,9 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 1,0 мл дистильованої води = 84,5 мкг/мл;

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 1,0 мкг/мл.

Клофазимін (Cfz) – 0,5 мкг/мл

1,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл димексиду (DMSO) = 4200 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 420,0 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 42,0 мкг/мл;

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 0,5 мкг/мл.

Бедаквілін (Bdq) – 1,0 мкг/мл

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату* + 2,9 мл димексиду (DMSO) = 1689 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,9 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 1,0 мл дистильованої води = 84,5 мкг/мл;

внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 1,0 мкг/мл.

Деламанід (Dlm) – 0,06 мкг/мл

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату* + 2,9 мл димексиду (DMSO) = 1689 мкг/мл (1-е розведення);

1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,9 мкг/мл;

1,0 мл (2-го розведення) + 7,0 мл дистильованої води = 21,1 мкг/мл;

1,0 мл (3-го розведення) + 3,0 мл дистильованої води = 5,28 мкг/мл;

внести 0,1 мл (4-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 0,06 мкг/мл.

промаркувати пробірки, вказуючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки:

для постановки ТМЧ для одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів 2-го ряду необхідно підготувати 5 пробірок (додаток 3 цього наказу): 1 контроль і 4 пробірки з препаратами 2-го ряду (**або 8 пробірок: 1 контроль і 7 пробірок з препаратами 2-го ряду в залежності від того, чи має лабораторія штативи для ВАСТЕС MGIT 960 до ТМЧ 2-го ряду на 8 гнізд!**)

за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок у пробірки із препаратами й контрольні пробірки добавку SIRE – у контроль та пробірки з Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz

за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz) у відповідні марковані пробірки MGIT (додаток 3 цього наказу);

НЕ ДОДАВАТИ препарати в пробірки, які будуть використані для контролю росту мікобактерій.

Для постановки ТМЧ для одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів 1-го та 2-го ряду необхідно використовувати 15 пробірок – 1 пробірка – контроль для препаратів 1-го ряду (штатив з препаратами 1-го ряду), 1 пробірка – контроль 2-го ряду (штатив з препаратами 2-го ряду), 1 пробірка – контроль Z, 12 пробірок з препаратами (SIRE та S, H, R, E, Z, Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz) (додаток 3 цього наказу).

Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування в пробірці MGIT) для постановки ТМЧ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT

Важливим фактором є «вік» культури в днях, що пройшов з моменту, коли була отримана позитивна культура у системі MGIT.

День, у який дана культура була вперше ідентифікована системою як позитивна, вважається «НУЛЬОВИМ» (*день 0*).

Для одержання культури, придатної до подальших тестів на ТМЧ, пробірку необхідно інкубувати у системі щонайменше ще добу (тобто до *дня 1*) Якщо простір у системі є критичним чинником, що стримує швидкість роботи, пробірка може бути вилучена із системи після дня 0 (тобто після одержання позитивної відповіді) і культивуватися в наступні дні в термостаті при 37 °С.

Культура є придатною для посіву на ТМЧ протягом п'яти днів після «0» (тобто протягом днів 1 – 5).

Якщо культура інкубувалась у системі або термостаті більше 5 днів після повідомлення про позитивний результат (тобто починаючи з 6-ї доби і далі), вона непридатна для проведення ТМЧ у системі MGIT. Для того, щоб зробити ТМЧ з позитивної культури (MGIT «+»), що була витримана у термостаті більш ніж 5 діб, необхідне здійснити її субкультивування, тобто невеликий об'єм 0,5 мл цієї культури необхідно посіяти у нову пробірку MGIT і культивувати в апараті до отримання позитивного результату.

Процедури підготовки культури для ТМЧ трохи розрізняються залежно від «віку» культур (тобто днів, що пройшли з моменту одержання позитивного результату) (рис. 10).

Проведення ТМЧ з культури віком 1 – 2 дні:

- а) енергійно струсити пробірку (бажано на вортексі) для гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);
- б) залишити пробірку на 5 – 10 хв. для осадження великих часток;
- в) використовувати надосадову рідину для інокуляції пробірок із препаратами (додаток 4 цього наказу).

Проведення ТМЧ з культури віком 3–5 днів:

- енергійно струсити пробірку (бажано на вортексі) для гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);

-залишити пробірку на 5–10 хв. для осадження великих часток;

в) в окрему стерильну пробірку перенести 1,0 мл надосадової рідини й додати 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl, щоб отримати одержавши, таким чином, розведення 1:5. Використовувати його для інокуляції пробірок з препаратами.

Приготувати розведення суспензії мікобактерій 1:100 для посіву контрольних пробірок SIRE. Для цього додати 0,1 мл суспензії мікроорганізмів (надосадової рідини 1–2-денної культури або розведення 1:5 3–5 денної культури) у пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl. Добре перемішати й використовувати для посіву в контрольні пробірки (без препаратів).

ВАЖЛИВО! При тестуванні на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку Z готують розведення 1:10 (не 1:100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1:5 для 3–5 денної культури або суспензії 1–2 денної культури) у пробірку з 4,5 мл. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок при тестуванні стійкості до Z.

Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування на щільних середовищах) для постановки ТМЧ в рідкому середовищі в системі MGIT

Для приготування суспензії мікобактерій для посіву на ТМЧ необхідно:

а) використовувати для постановки ТМЧ культуру з щільного живильного середовища Левенштейна-Єнсена НЕ ПІЗНІШЕ 15 діб з моменту появи росту мікобактерій (додаток 4 цього наказу);

пробірку додати 4,0 мл ізотонічного розчину NaCl;

в) за допомогою традиційного способу зібрати максимальну кількість колоній з поверхні середовища в стерильний ізотонічний розчин NaCl, при цьому уникати потрапляння самого середовища до ізотонічного розчину NaCl.

г) щільно закрити пробку й суспендувати на вортексі протягом 1–3 хв. для повного подрібнення згустків. Проконтролювати мутність суспензії за стандартом мутності McFarland (мутність суспензії повинна бути більше 1,0);

д) залишити пробірку із суспензією на 20 хв. для осадження великих часток;

е) акуратно перенести надосадову рідину піпеткою в іншу стерильну пробірку, не торкаючись осаду на дні пробірки. Залишити пробірку з надосадовою рідиною на 15 хв. для осадження всіх часток, що залишилися;

ж) акуратно перенести надосадову рідину в наступну стерильну пробірку **НЕ ТОРКАЮЧИСЬ ОСАДУ**;

з) проконтролювати мутність отриманої суспензії за стандартом мутності (повинна бути більше 0,5 од). Довести мутність суспензії точно до 0,5 од шляхом додавання в пробірку стерильного ізотонічного розчину. **СТЕЖИТИ, ЩОБ МУТНІСТЬ НЕ БУЛА МЕНШ 0,5 од.**;

і) розвести отриману суспензію в співвідношенні 1:5 стерильним ізотонічним розчином NaCl. Для цього перенести 1,0 мл отриманої суспензії в пробірку з 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати.

Використовувати отримане розведення (1:5) для інокуляції в пробірки MGIT з препаратами;

к) приготувати розведення отриманої суспензії (1:100) для посіву в контрольні пробірки. Для цього додати 0,1 мл отриманої суспензії в пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати дане розведення для посіву в контрольні пробірки;

л) **ВАЖЛИВО!** При тестуванні на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку готують розведення 1:10 (не 1:100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1:5) у пробірку з 4,5 мл ізотонічного розчину NaCl. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок при тестуванні стійкості до Z.

Інокуляція й інкубація. Інокуляцію необхідно проводити згідно з наступними схемами (рис. 12, 13, 14, 15):

а) промаркувати пробірки в залежності від кількості препаратів, до яких потрібно визначити МС:

– для постановки ТМЧ одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів 1-го ряду необхідно підготувати 7 пробірок: 1 пробірка – контроль SIRE, 1 пробірка – контроль Z, 4 пробірки із препаратами та SIRE та Z;

– для постановки ТМЧ одного штаму *M. tuberculosis* одночасно до препаратів 1-го та 2-го ряду необхідно використовувати 15 пробірок: 1 пробірка – контроль для препаратів 1-го ряду (штатив з препаратами 1-го ряду), 1 пробірка – контроль 2-го ряду (штатив з препаратами 2-го ряду), 1 пробірка – контроль Z, 12 пробірок з препаратами (SIRE та S, H, R, E, Z, Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Vdq і Cfz);

б) внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1:100 у контрольні пробірки, які використовуються для контролю росту мікобактерій при тестуванні на чутливість до препаратів 1-го (SIRE) та/або 2-го ряду;

в) внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1:10 у пробірки без препаратів, які використовуються для контролю росту мікобактерій при тестуванні на стійкість до Z;

г) внести по 0,5 мл суспензії мікобактерій 1:5, отриманої з культури, вирощеної на щільному середовищі, або суспензії 1–2-денної культури мікобактерій або розведення 1:5 для 3–5-денної культури мікобактерій, вирощених у системі MGIT у кожному з п'яти пробірок із препаратами 1-го ряду (S, H, R, E і Z) та/або в пробірки із препаратами 2-го ряду (Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Vdq і Cfz);

д) негайно після інокуляції щільно закрити пробки пробірок, перемішати перевертанням кілька разів, встановити пробірки в потрібному порядку в тримач MGIT, і помістити їх у ящики приладу MGIT у гнізда, зазначені приладом. Переконалися в тому, що кришки пробірок щільно закріпі. Не переміщувати й не рухати пробірки в процесі інкубації в приладі;

е) тривалість проведення ТМЧ у системі звичайно становить від 4 до 21 доби.

Система MGIT проводить автоматичний моніторинг росту мікобактерій і повідомляє про завершення тесту при досягненні певного значення мутності середовища в контрольній пробірці. При одержанні такого повідомлення всі пробірки, у які був посіяний даний матеріал, можуть бути витягнуті із приладу й відскановані для одержання остаточного результату дослідження. Результат видається системою у вигляді повідомлень «R-resistente» (стійкий), або «S-Sensitive» (чутливий). Визначення результатів системою здійснюється шляхом виміру оптичної щільності в пробірках із препаратами й порівняння із щільністю контрольної пробірки;

ж) при наявності росту в контрольних пробірках раніше 4-ої доби (що може свідчити про контамінацію), або його відсутності після закінчення 21 доби, система видає повідомлення «X-Error» («помилка»). Це ж повідомлення може видаватися й при виникненні інших обставин, що впливають на якість тесту;

з) при одержанні повідомлення про помилку, пробірки необхідно витягти із приладу, інокулювати нові порції суспензії мікобактерій у нові пробірки й повторити дослідження.

Внутрішньолабораторний контроль якості

ВКЯ при роботі на автоматизованій системі VASTEC 960 здійснюється з кожною новою партією наборів для визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП. З цією метою проводиться постановка тесту з використанням чутливого ($H_{37}R_v$) і стійкого до Н штамів *M. tuberculosis* із колекції АТСС, а також завідомо чутливого і резистентного до Н ізолятів *M. tuberculosis*, виділених від хворих на ТБ.

5. Окрім методу пропорцій на щільному та рідкому живильному середовищі і непрямого методу абсолютних концентрацій для визначення МЧ *M. tuberculosis* можуть бути використані альтернативні методи:

- метод коефіцієнта стійкості;
- прямий метод абсолютних концентрацій.

Дослідження МЧ мікобактерій ПТП методом коефіцієнта резистентності

Суть методу полягає у визначенні мінімальної інгібуючої концентрації ПТП для клінічних штамів мікобактерій і співвідношення МІК тих же препаратів для завідомо чутливого лабораторного штаму мікобактерій (як правило, $H_{37}R_v$). Це самий трудомісткій і дорогий метод, оскільки вимагає використання великої кількості пробірок з живильним середовищем, тому він застосовується в основному для наукових досліджень.

Дослідження МЧ мікобактерій до ПТП прямим методом абсолютних концентрацій

Основним недоліком традиційних культуральних методів визначення МЧ *M. tuberculosis* є їх надзвичайна тривалість. Результати ТМЧ враховуються через 3– 4 тижні інкубації в термостаті, тому необхідна корекція хіміотерапії може бути проведена в кращому разі лише через 2–2,5 місяця від моменту надходження в лабораторію діагностичного матеріалу.

Для прискорення досліджень може бути використаний прямий метод абсолютних концентрацій. При постановці даного методу проводиться прямий посів осаду обробленого детергентами діагностичного матеріалу одночасно на контрольне живильне середовище і середовища з відповідними ПТП. Паралельно проводиться посів матеріалу на стандартні живильні середовища (з метою отримання культури).

Культура мікобактерій вважається стійкою, як і при непрямому методі абсолютних концентрацій, якщо на середовищі з ПТП виростає 20 і більше колоній.

Проте прямий метод абсолютних концентрацій може бути використаний тільки для дослідження бактеріоскопічно позитивного матеріалу з масивністю бактеріовиділення не менше 2+. В цьому випадку підвищується ризик контамінації. Крім того, слід враховувати, що при цьому методі проводиться не дозований посів, що може утруднити інтерпретацію результатів. Тому у ряді випадків отримані результати можуть виявитися недостовірними.

Метод носить попередній характер і збільшує вартість дослідження МЧ *M. tuberculosis* в цілому.

6. Для забезпечення достовірності одержаних результатів необхідно проводити контроль якості виконуваних лабораторією тестів щодо дослідження МЧ мікобактерій до ПТП.

ВКЯ середовищ для визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП

Необхідно перевіряти якість кожної партії середовищ для визначення МЧ мікобактерій до ПТП. З цією метою кожна партія приготованого живильного середовища повинна бути перевірена на стерильність (інкубація у термостаті).

Також для кожної партії середовища при тестуванні на МЧ клінічних зразків необхідно одночасно провести тест на чутливість контрольного штаму *M. tuberculosis* H₃₇R_v, або контрольного штаму *M. tuberculosis* з відомою стійкістю, до усіх досліджуваних ПТП. Якщо середовище з препаратами приготоване правильно, то стійкість контрольної культури буде незмінною. Поява росту контрольного штаму в пробірках з ПТП, до яких він є чутливим, або відсутність його росту в пробірках з препаратами, до яких контрольний штам є стійким, указує на те, що при приготуванні середовища з препаратом було допущено помилку, або на те, що неправильно приготована бактерійна суспензія.

За відсутності у лабораторії контрольних (музейних) штамів, лабораторія може використовувати виділені від пацієнтів штами, які у багатократних дослідженнях підтверджують свою чутливість і/або стійкість.

Реєстрація результатів ВКЯ кожної партії середовищ повинна фіксуватися в журналі приготування середовищ.

ВКЯ включає також регулярну перевірку використовуваного лабораторного обладнання – згортувачів, термостатів, рН-метра, автоматичних дозаторів, стандартів мутності тощо.

7. Реєстрація бактеріологічних досліджень та їх результатів

При реєстрації бактеріологічних досліджень кожному дослідженню діагностичного матеріалу присвоюється індивідуальний номер.

Усі зразки, що надійшли в лабораторію (за винятком відбракованих) повинні бути зареєстровані в формі № 252-2/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2» (далі – форма ТБ 04/2).

Форму ТБ 04/2 заповнюють відповідальні лікарі бактеріологічних відділів клініко-діагностичних лабораторій або бактеріологічних лабораторій і ведуть у лабораторіях 2 та 3 рівнів ПГЗ. Форму ТБ 04/2 заповнюють на підставі форми первинної облікової документації № 200 – 2/о «Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06».

У формі реєструються пацієнти, яким призначено бактеріоскопічне та культуральне дослідження, а також тести на МЧ до ПП.

Графи 1–19 заповнюються на основі форми первинної облікової документації № 200 – 2/о «Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06».

У графі 1 зазначають лабораторний реєстраційний номер пацієнта.

У графу 2 заносяться номер проби.

У графу 3 записують цифрами число, місяць та рік збору біоматеріалу.

У графу 4 записують цифрами число, місяць та рік доставки біоматеріалу на дослідження.

У графу 5 вписують районний реєстраційний номер випадку ТБ (якщо він є), код району, дві останні цифри року, порядковий номер.

У графі 6 зазначають прізвище, ім'я та по батькові пацієнта.

У графі 7 скорочено вказують стать особи, якій проводиться дослідження. Ч – чоловіча; Ж – жіноча.

У графі 8 зазначають рік народження пацієнта.

У графі 9 вказують місце проживання та район адміністративної території, в якому проживає пацієнт.

Необхідно найбільш повно внести ці дані, оскільки лабораторний журнал може стати єдиним джерелом даних про хворого на бацилярний туберкульоз.

У лабораторіях додатково ведеться журнал виділених культур, в який вносять усі дані про проби, з яких були виділені культури мікобактерій.

У графі 10 вказують: у верхній клітинці графі назву закладу чи відділення, звідки було направлено біоматеріал; у нижній клітинці графі 10 – прізвище, ініціали та телефон лікаря, який направив на дослідження біоматеріал пацієнта.

Ці дані необхідні для того, щоб:

- 1) передати результати дослідження лікарю, який направив матеріал;
- 2) у разі вибраковки результатів (проріст, незадовільна деконтамінація, тощо) повідомити про те, що трапилося лікарю і спільно прийняти рішення про доцільність повторного дослідження.

У графах 11 та 12 відмічають, який саме біоматеріал направляється на дослідження – мокротиння або інше. Якщо направляється інший біоматеріал,

необхідно зазначити, який саме (промивні води бронхів, плевральна рідина тощо).

У графах 13–18 відмічають мету проведення дослідження – діагностика, контроль хіміотерапії чи інша.

Дані про вид діагностичного матеріалу та мети дослідження необхідні для проведення ретроспективного аналізу ефективності роботи лабораторії (див. розділ «Забезпечення якості досліджень»).

Якщо мета проведення дослідження – діагностика нового випадку, то відмітити знаком «V» у пункті 13; якщо діагностика рецидиву, то відмітити знаком «V» у пункті 14, інший випадок повторного лікування (невдале лікування, після перерви) відмітити знаком «V» у пункті 15.

Якщо мета проведення дослідження - контроль хіміотерапії, то у пункті 16 необхідно це відмітити знаком «V». У пункті 17 зазначити цифрою, на якому місяці лікування проводиться дослідження.

Якщо мета проведення дослідження інша, то у пункті 18 необхідно зазначити, яка саме, наприклад: диспансеризація, обстеження особи, яка контактувала з хворим на туберкульоз із бактеріовиділенням, тощо.

У графі 19 цифрою вписують категорію захворювання на туберкульоз – 1–4.

У графі 20 записують цифрами число, місяць та рік проведення дослідження.

У графах 21–23 вказують результат бактеріоскопічного дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо у пробі біологічного матеріалу знайдені кислотостійкі палички (КСП), то поряд з відповідним номером зразка мокротиння (1, 2 або 3) у графі 21 необхідно записати ступінь позитивного результату, якщо КСП не знайдені, зазначити, що результат негативний.

Якщо в полі зору більше 10 КСП, то необхідно відмітити «3+».

Якщо в полі зору від 1 до 10 КСП, то необхідно відмітити «2+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 10 до 99 КСП, то необхідно відмітити «1+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 1 до 9 КСП, то необхідно записати точну цифру знайдених КСП.

Якщо на 100 полів зору не знайдено КСП, то зазначити, що результат негативний.

У графі 22 записують цифрами число, місяць та рік видачі результатів бактеріоскопії.

У графі 23 ставиться підпис спеціаліста, який проводив бактеріоскопію.

У графах 24 та 25 вказують результат культурального дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо на живильному середовищі:

немає росту *M. tuberculosis*, то зазначається термін: «негативний»;

виросли 1–19 колоній *M. tuberculosis*, то вказують точне число колоній *M. tuberculosis*.

виросло від 20 до 100 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «1+».

виросло 100–200 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «2+».

виросло 200–500 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «3+».

виросло більше 500 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «4+».

Якщо на живильному середовищі проросла банальна мікрофлора, то ставиться «проріст».

У графі 25 записують цифровим способом число, місяць та рік видачі попереднього результату посівів.

У графах 26–34 вказують результати тестів ідентифікації виділеної культури.

У графі 26 відмічають морфологію колоній: R або S.

У графі 27 знаками «–» або «+» відмічають пігментоутворення: «–», якщо кремовий колір, характерний для мікобактерій туберкульозного комплексу, «+», якщо колонії мають інший колір.

У графі 28 відмічають швидкість росту: «П» – повільний, «Ш» – швидкий.

У графі 29 позначають наявність чи відсутність корд-фактора знаками «+» або «–».

У графі 30 знаками «+» або «–» відмічають ріст культури або його відсутність на середовищі із салциловокислим натрієм або з ПНБК.

У графі 31 відмічають знаками «+» або «–» результати ніацинового тесту.

У графі 32 відмічають знаками «+» або «–» результати нітратредуктазного тесту.

У графі 33 відмічають знаками «+» або «–» наявність або відсутність термостабільної каталази.

У графі 34 відмічають знаками «+» або «–» результати ТСН-тесту.

У графі 35 вказують висновок, а саме: виділена культура ідентифікована як: *M. tuberculosis*, інші мікобактерії (необхідно вписати).

У графах 36–40 вказують результати тесту медикаментозної чутливості виділених мікобактерій до ПТП 1-го ряду. Якщо культура є чутливою до певного препарату, вписується літера «Ч», а якщо стійка, – літера «С».

У графі 41 зазначають результати тесту чутливості мікобактерій до ПТП другого ряду та вказуються через кому скорочені назви ПТП 2-го ряду, до яких мікобактерії є стійкими.

У графі 42 вказують цифрами число, місяць та рік видачі остаточних результатів дослідження.

У графі 43 ставиться підпис спеціаліста, який проводив культуральне дослідження.

У графі 44 зазначаються спеціальні примітки (за потреби).

Нумерація досліджень повинна починатися в перший робочий день року і триватиме безперервно протягом усього року. Реєстраційний номер, присвоєний зразку, повинен бути нанесений на контейнер зі зразком і супроводжувати його на всіх етапах бактеріологічного дослідження: на центрифужній пробірці, в якій зразок центрифугують після деконтамінації, на

пробірках з ростовим середовищем, на предметних скельцях, на які наноситься матеріал для мікроскопії перед посівом і для підтвердження належності культури, що виросла, до кислотостійких бактерій (фарбування за Цлем-Нільсеном).

VIII. Молекулярно-генетичні методи діагностики туберкульозу

1. Для детекції МБТ методом ПЛР використовують мокротиння, бронхіальний секрет, плевральну та інші рідини і інші види діагностичного матеріалу.

Для цього з діагностичного матеріалу, в першу чергу, необхідно виділити ДНК. Потім до розчину отриманої ДНК додають реакційний буфер, суміш нуклеозидтрифосфатів, праймери, полімеразу, і проводять ампліфікацію в програмованому термостаті (термоциклері), далі оцінюють результат. Присутність в пробі послідовності-мішені свідчить про наявність *M. tuberculosis* в дослідному зразку.

Необхідно відмітити, що ПЛР не дає відповіді на питання про активність туберкульозного процесу, тому інтерпретувати отриманий результат необхідно з урахуванням клініко-рентгенологічних даних. Метод ПЛР може використовуватися як додатковий діагностичний метод при диференціальній діагностиці в комплексі з іншими методами лабораторної діагностики ТБ і не застосовується в якості скринінгового методу для виявлення хворих на ТБ із-за можливості хибнопозитивних результатів.

2. Визначення медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* молекулярно-генетичними методами GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl.

Використання молекулярно-генетичних методик для виявлення відмінностей в генетичній структурі чутливих і стійких штамів – новий підхід до визначення медикаментозної чутливості мікобактерій. Цей вид досліджень став можливий завдяки визначенню нуклеотидних послідовностей генів, мутації в яких призводять до виникнення резистентності *M. tuberculosis* до ПТП.

Такі методи діагностики МС *M. tuberculosis* демонструють високу чутливість і специфічність, що дозволило Експертній групі ВООЗ рекомендувати широкомасштабне впровадження молекулярно-генетичних методів для діагностики MDR-туберкульозу.

Найбільш ефективними методами діагностики МЧ *M. tuberculosis* визнані молекулярно-генетичні методи, які ґрунтуються на гібридизації з ДНК-зондами (LPA), зокрема, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl і INNO-LiPA Rif TB Assay.

Технологія проведення досліджень з використанням цих методів включає наступні етапи:

виділення ДНК з культур *M. tuberculosis* або безпосередньо з клінічного матеріалу;

ПЛР для ампліфікації фрагментів генів, що асоціюються з медикаментозною стійкістю мікобактерій;

гібридизація ПЛР-продуктів з ДНК-зондами;

візуалізація результатів гібридизації, при якій відбувається детекція мікобактерій комплексу *M. tuberculosis*, а також наявність або відсутність мутацій в дослідних генах.

До складу зондів включаються специфічний зонд для ідентифікації мікобактерій комплексу *M. tuberculosis*, зонди «дикого типу» (без мутацій, WT), а також зонди для детекції мутацій (MUT), що найчастіше зустрічаються. Заміна хоча б одного нуклеотиду в послідовності ДНК-мішені веде до порушення гібридизації із зондом, комплементарним відповідній ділянці ДНК-мішені «дикого типу», але при цьому відбувається гібридизація із зондом, що враховує цю заміну. Таким чином, наявність мутацій визначається по відсутності сигналу одного або декількох зондів «дикого типу», а також по присутності сигналів від одного або декількох «мутантних» зондів. Також можливе виявлення гетерорезистентних штамів мікобактерій, у яких реєструються всі сигнали зондів «дикого типу» і один або декілька сигналів «мутантних» зондів.

Теоретично, резистентність може існувати, не зважаючи на наявність структури не мутантного типу. Можливі причини гетерорезистентності: досліджуваний зразок містить штам, який має гетерорезистентність і ця резистентність викликана мутацією, яка не була виявлена мутаційними зондами, або досліджуваний зразок містить штам немутантного типу і резистентний штам (наприклад, в результаті змішаної інфекції пацієнта), і ця резистентність викликана мутацією, яка не була виявлена мутаційними зондами.

Молекулярно-генетичні методи детекції мультирезистентних *M. tuberculosis* в основному спрямовані на виявлення мутацій, що обумовлюють резистентність *M. tuberculosis* до рифампіцину (який є маркером множинної медикаментозної стійкості мікобактерій, оскільки, відповідно до даних літератури, резистентність до рифампіцину у 80,0–90,0 % штамів *M. tuberculosis* корелює із стійкістю до ізоніазиду), а також до ізоніазиду. Генодіагностика резистентності до R ґрунтована на детекції мутацій, локалізованих у високо консервативній області розміром 81 п.о. гена *groB*, що кодує β -субодиницю РНК-полімерази, оскільки 95,0–98,0 % стійких до R штамів *M. tuberculosis* мають мутації в цьому гені. Для визначення високого рівня стійкості до H досліджують ген *katG*, що кодує каталазу-пероксидазу, для визначення низького рівня стійкості до H вивчають область промотора гена *inhA*, що кодує еноіл-ацил-протеїнредуктазу. На сьогоднішній день на ринку є також діагностичні набори, наприклад, GenoType MTBDRsl, що дозволяють проводити визначення стійкості до Q (*gyrA*), аміноглікозидів/циклопептидів (*rrs*), тобто експрес-детекцію широкої медикаментозної стійкості.

Молекулярно-генетичні тести для визначення МЧ *M. tuberculosis* (за винятком Xpert MTB/RIF) рекомендується використати в обласних лабораторіях.

Xpert MTB/RIF

Новий швидкий і ефективний метод діагностики ТБ – тест GeneXpert MTB/RIF, що дозволяє проводити детекцію *M. tuberculosis* в зразку діагностичного матеріалу і чутливості до R за дві години. Усі стадії тесту повністю автоматизовані. Екстракція, ампліфікація і детекція ДНК здійснюються автоматично в закритому картриджі, що мінімізує можливість крос-контамінації.

Проведення дослідження є двоступінчатим процесом, що включає обробку клінічних зразків і власне ПЛР в режимі реального часу, під час якої відбувається ампліфікація специфічної послідовності гена *groB*, яка потім тестується молекулярними маяками (molecular beacons) на мутації в ділянці, що обумовлює стійкість до R. Рекомендується використання методики Xpert MTB/RIF для швидкого виявлення MDR-туберкульозу в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ і мікроскопічних пунктах в районах з високим рівнем захворюваності на ТБ.

Xpert MTB/RIF ULTRA

На відміну від попередньої версії Xpert MTB/RIF для підвищення чутливості тесту картридж Xpert MTB/RIF Ultra, крім гена *groB*, включає дві різні мультикопійні мішені ампліфікації (IS6110 і IS1081), а також використовується більша реакційна камера (50,0 мкл ПЛР-реакції в ультра проти 25,0 мкл в Xpert MTB/RIF). У нових картриджах Ultra використовується повністю вкладена ПЛР, більш швидке термоцилювання (отримання негативного результату за 65 хв., позитивного – за 77 хв.), а також поліпшені розчини та ферменти.

Xpert MTB/RIF Ultra має межу виявлення 11,8 КУО/мл, тоді як для Xpert MTB/RIF межа виявлення встановлена на рівні 114 КУО/мл, тобто нова система майже в 10 разів більш чутлива.

Для підвищення точності виявлення стійкості до R, у тесті Xpert MTB/RIF Ultra використаний аналіз температури плавлення замість аналізу кривих флуоресценції ПЛР в реальному часі. Для визначення мутацій, що характеризують стійкість до R використовуються чотири зонди, які визначають область гена *groB*.

В тесті Xpert MTB/RIF Ultra для оцінки результату використовуються ті ж напівкількісні категорії, що і в Xpert MTB/RIF аналізі (високий, середній, низький і дуже низький), а також додана нова напівкількісна категорія «одиничні МБТ», яка відповідає найнижчому бактеріальному навантаженню. Результат «МБТ виявлено, одиничні» був доданий для підвищення ефективності виявлення *M. tuberculosis complex*.

Xpert MTB/RIF Ultra не поступається Xpert MTB/RIF аналізу для діагностики МБТ і виявлення стійкості до R і може бути використаний в якості альтернативи останнього.

Xpert MTB/RIF Ultra вимагає програмного забезпечення GeneXpert версії 4.7b або вище.

Xpert MTB/RIF Ultra потрібно використовувати в якості початкового діагностичного тесту для всіх дорослих і дітей з ознаками і симптомами легеневого ТБ, а також в тестуванні позалегенових зразків (спино-мозкова рідина, біоптати лімфатичних вузлів і тканин). Інтерпретація результатів Xpert MTB/RIF Ultra для виявлення *M. tuberculosis complex* є такою ж, як і для Xpert MTB/RIF, за винятком «МБТ виявлено, одиничні». Інтерпретувати «МБТ виявлено, одиничні» потрібно наступним чином:

- для ВІЛ-інфікованих осіб і дітей з підозрою на захворювання на легеневий ТБ, а також і для позалегенових зразків від хворих цієї категорії результат «МБТ виявлено, одиничні» слід розглядати як позитивні результати для використання в клінічних рішеннях і подальших дій щодо пацієнта;

- для осіб без ризику інфікування ВІЛ, які мають початковий позитивний результат «МБТ виявлено, одиничні», необхідно зібрати свіжий зразок і повторно протестувати матеріал. Результат другого тесту Xpert MTB/RIF Ultra використовується для прийняття клінічних рішень і подальших дій щодо пацієнта;

- хоча клінічні симптоми та результати доступних рентгенологічних обстежень завжди слід враховувати при діагностиці ТБ, другого позитивного результату «МБТ виявлено, одиничні» достатньо для постановки діагнозу ТБ легенів для осіб, які мають в анамнезі захворювання на ТБ;

- для усіх інших пацієнтів, які отримали позитивний результат первинного початкового тесту Xpert MTB/RIF Ultra «МБТ виявлено, одиничні» необхідні додаткові дослідження, щоб підтвердити або виключити стійкість до R.

3. Порядок використання молекулярно-генетичних методів у лабораторіях з діагностики туберкульозу. Виявлення *M. tuberculosis complex* у клінічних зразках є основним фактором, який свідчить про специфічну природу захворювання та має вирішальне значення для вибору раціональної схеми лікування та оцінки його ефективності. Для здійснення етіологічної діагностики ТБ в арсеналі лабораторій на сьогоднішній день існує декілька методів: бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний.

Під етіологічною діагностикою ТБ розуміють виявлення збудника захворювання (деякі методи дозволяють визначити його кількість, що є важливим інформаційним показником, який характеризує ступінь епідемічної небезпеки та тяжкість захворювання), ідентифікацію мікобактерій та визначення профілю резистентності мікобактерій до ПТП.

Традиційні мікробіологічні методи мають багато переваг, але їм притаманна і низка суттєвих недоліків у порівнянні з молекулярно-генетичними методами: культуральні дослідження досить тривалі, а швидкі бактеріоскопічні методи мають низьку чутливість – для виявлення мікобактерій 1,0 мл матеріалу повинен містити не менше 100 тисяч мікробних клітин.

Для швидкої та всебічної лабораторної діагностики ТБ доцільно використовувати увесь комплекс доступних лабораторних методів. Результатом

правильної організації діагностичного процесу є отримання максимальної кількості лабораторної інформації при роботі з єдиною пробю біологічного матеріалу. Для отримання достовірних результатів дослідження необхідно одну пробу біологічного матеріалу досліджувати комплексно, використовуючи увесь арсенал доступних для лабораторії методів – бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний. Цей підхід має використовуватись незалежно від того, яку ПЛР-методику застосовують у лабораторії.

Теоретично, для дослідження молекулярно-генетичними методами може використовуватись різний матеріал. Разом з тим, слід пам'ятати, що молекулярно-генетичні методи є прямими, отже у якості зразка доцільно використовувати матеріал із вхідних воріт або із епітопів, до яких збудник має тропність. При захворюванні на ТБ досить інформативним є правильно зібране мокротиння пацієнта.

При надходженні проби для дослідження необхідно перевірити заповнення супровідних документів та оцінити якість доставленого зразка. Для комплексного дослідження матеріалу потрібно не менше 5,0 мл якісної проби мокротиння.

Проба, яка досліджується, повинна бути деконтамінованою. Слід зазначити, що для молекулярно-генетичних досліджень для розрідження та деконтамінації мокротиння повинен використовуватися метод обробки NALC-NaOH. Цей же метод деконтамінації рекомендований і при застосуванні системи VASTEC MGIT 960. Хід виконання деконтамінації за допомогою NALC-NaOH викладений вище.

Для молекулярно-генетичних досліджень біологічного матеріалу на наявність збудників ТБ можуть використовуватись різні формати ПЛР: класична ПЛР, ПЛР у реальному часі, NESTED або ін., якщо на ринку виробів медичного призначення доступні реагенти для їх виконання, зареєстровані та дозволені до використання у закладах охорони здоров'я України відповідно до чинного нормативно-правового законодавства.

4. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу із застосуванням системи GeneXpert MTB/RIF (GeneXpert MTB/RIF ULTRA)

Лабораторні дослідження біологічного матеріалу повинні проводитися у комплексі: бактеріоскопічні, бактеріологічні та молекулярно-генетичні. Тому, вимоги для зберігання та транспортування зразків є такими, як для проб, що підлягають бактеріологічному дослідженню, тобто при неможливості доставити матеріал негайно, він може зберігатися до 48 годин при температурі $(+4\pm 2) ^\circ\text{C}$ і транспортуватися з дотриманням вказаних температурних умов.

Слід зауважити, що прилад GeneXpert не потребує окремого приміщення. Оскільки прилад GeneXpert є закритою системою і працює тільки з картриджами Xpert, у яких автоматично відбуваються усі етапи ПЛР-дослідження без втручання персоналу. Усі маніпуляції з дослідним матеріалом від виділення ДНК мікроорганізмів до детекції результатів ампліфікації відбуваються у закритому окремому для кожного зразка картриджі. Вимога ДСП 9.9.5.153-2008 поширюється на лабораторії, у яких використовуються

методики, що передбачають виконання окремих етапів ПЛР-дослідження (виділення ДНК, ампліфікація, детекція) персоналом лабораторії за допомогою «відкритих» ПЛР-систем – і щодо обладнання, і щодо реагентів.

Розробник GeneXpert MTB/RIF гарантує коректну роботу системи при дослідженні матеріалу від осіб, які не отримували ППП. Таким чином, метод може бути використаний як скринінговий для виявлення *M. tuberculosis complex* та мутацій у гені *groB*, з яким пов'язують резистентність мікобактерій до R. Така лабораторна інформація дозволить на ранніх етапах діагностики виявити у відповідному матеріалі збудника туберкульозної інфекції та насторожити фтизіатра щодо наявності у *M. tuberculosis* резистентності до ППП 1-го ряду. Разом з тим, слід пам'ятати, що результати тестування у картриджах Xpert MTB/RIF є попередніми і не можуть замінити подальшого бактеріологічного дослідження.

За інструкцією виробника для дослідження у картриджах Xpert MTB/RIF може досліджуватись мокротиння або його осад. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

Для отримання коректного результату дослідження та враховуючи те, що в Україні дослідження з використанням приладів GeneXpert MTB/RIF проводяться в комплексі з посівами на рідке середовище за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960, які встановлені в лабораторіях 3-го рівня, доцільно працювати з осадами мокротиння після проведення їх передпосівної обробки (деконтамінації).

Після оцінки якості доставленого мокротиння (якість проби та заповнення документів) контейнер з матеріалом переносять у ШББ 2 класу і проводять його деконтамінацію з використанням NALC-NaOH відповідно до методики.

Із ресуспендованого осаду однієї проби необхідно зробити наступне:

посіяти 0,5 мл осаду у пробірку з рідким середовищем Мідлбрукка 7Н9 для інкубації в аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960;

посіяти 0,2 мл у пробірку з щільним середовищем Левенштейна-Єнсена і помістити у термостат при температурі 37 °С;

якщо лабораторія за будь-яких причин не може виконати дослідження за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960, необхідно зробити посів на 2 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід здійснювати відповідно до вимог Інструкції з лабораторної діагностики ТБ;

дослідний матеріал слід нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Ціля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;

помістити у чисту пробірку з кришкою, що загвинчується, 0,5 мл деконтамінованого осаду для здійснення попередньої підготовки проби для дослідження у картриджі Xpert MTB/RIF. Відповідно до інструкції виробника картриджів до 0,5 мл осаду слід додати 1,5 мл реактиву для зразків. Енергійно перемішати і залишити для інкубації у штативі у ШББ при кімнатній температурі впродовж 15 хв. За цей проміжок часу необхідно 1–2 рази ретельно

перемішати вміст пробірки. Після експозиції перенести 2,0 мл суміші у картридж Xpert MTB/RIF, помістити його в аналізатор GeneXpert MTB/RIF і запустити відповідну програму виконання тесту.

Якщо не вдалося отримати результат дослідження з цією пробою (Error чи NO Result), необхідно повторити дослідження, використавши збережені залишки матеріалу з цієї ж пробірки.

При відсутності залишків проби або при отриманні результату – «недійсний» (invalid), необхідно повторно зібрати матеріал для дослідження і повторити усю низку маніпуляцій, описаних вище.

Після отримання достовірного результату тестування у картриджі Xpert MTB/RIF, його необхідно занести до Журналу ТБ 04/2 та видати відповідь лікарю-фтизіатру, який направив матеріал.

5. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу з використанням ПІР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами ПТЗ, які мають відповідно обладнані ПІР-лабораторії та влаштовані з дотриманням чинного законодавства, а також мають підготовлений персонал, можуть використовувати ПІР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами для виявлення *M. tuberculosis complex*, ідентифікації збудника захворювання та визначення наявності мутацій у генах, з якими пов'язана резистентність до R та H, а також до препаратів 2-го ряду.

Реагенти GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl виробництва компанії HainLifescience дозволені до використання в Україні відповідно до чинного законодавства, можуть давати коректний достовірний результат з біологічним матеріалом та бактеріальними культурами, які виростили на рідкому або щільному середовищі.

Набір GenoType MTBDRplus дозволяє виявити у пробі присутність ДНК *M. tuberculosis complex*, а також наявність мутацій, асоційованих з резистентністю до R та H. Якщо за результатами тестування матеріалу з наборами GenoType MTBDRplus виявлені мутації у генах, з якими пов'язують резистентність до препаратів 1-го ряду (а саме до рифампіцину та ізоніазиду), тестування може бути продовжене з набором GenoType MTBDRsl.

Дослідження з реагентами GenoType MTBDRsl дають можливість виявити наявність генних мутацій, що відповідають за резистентність *M. tuberculosis complex* до препаратів 2-го ряду – аміноглікозидів, циклічних пептидів, Q.

При проведенні досліджень слід враховувати особливості використання наборів системи GenoType.

Перш за все необхідно пам'ятати, що виробник гарантує якість роботи набору GenoType MTBDRplus при роботі з наступним матеріалом: нативним або індукованим мокротинням (незалежно від результатів бактеріоскопії), бронхоальвеолярним лаважем, плевральними аспіратами, а також культурами, які виділені в рідкому або на щільному середовищах. Для наборів GenoType MTBDRsl виробник пропонує у якості матеріалу для дослідження

використовувати мокротиння з позитивним результатом бактеріоскопії «КСП+» або культурами, які виділені в рідкому або на щільному живильному середовищі. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

При роботі з біологічним матеріалом після проведення його деконтамінації з використанням реактиву NALC-NaOH, отриманий осад має бути ресуспендований в 1,0–1,5 мл фосфатного буферу (більші об'єми фосфатного буфера можуть негативно вплинути на чутливість тесту).

Після обробки та ресуспендування біологічного матеріалу необхідно виконати наступні маніпуляції:

внести 0,5 мл підготовленого матеріалу у пробірку з рідким середовищем Мідлбрукка 7H9 для інкубації в аналізаторі BACTEC MGIT 960;

внести 0,2 мл у пробірку з щільним середовищем Левенштейна-Єнсена і помістити у термостат при температурі 37 °С;

якщо лабораторія за будь-яких причин не може виконати дослідження за допомогою системи BACTEC MGIT 960, необхідно зробити посів на 2 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід здійснювати відповідно до вимог чинної Інструкції з бактеріологічної діагностики ТБ;

одну краплю матеріалу слід нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Ціля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;

0,7 мл деконтамінованого зразка біологічного матеріалу (при використанні автоматичного виділення ДНК на GenoXtract) або 0,5 мл зразка (для виділення ДНК за допомогою реагентів GenoLyse) переносять до пробірки об'ємом 2,0 мл з кришечкою, що загвинчується. Цю пробірку з матеріалом передають у приміщення виділення нуклеїнової кислоти для здійснення ПЛР дослідження відповідно до інструкції виробника реагентів.

Важливо пам'ятати, що для отримання коректного результату необхідно, щоб забраний матеріал був деконтамінований не пізніше 48 годин від моменту забору у пацієнта, при цьому зберігатися він може при температурі $(+4 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Набори реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl можуть бути використані для прискорення отримання лабораторної інформації щодо МЧ виділених *M. tuberculosis complex* до ПТП.

Для виділення ДНК можуть використовуватись «ручна методика» за допомогою реагентів GenoLyse або автоматична – у приладі GenoXtract з набором реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit.

При роботі з культурами, які вирости в рідкому середовищі, необхідно перенести 500 мкл культури у чисту мікропробірку об'ємом 1,5–2,0 мл з кришкою, що загвинчується, і виділити ДНК відповідно до інструкції виробника до набору реагентів GenoLyse. Для виділення ДНК із цих культур за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit необхідно 700,0 мкл рідкої культури помістити в GenoXtract та запустити відповідну програму.

При роботі з культурами, вирощеними на щільному середовищі, необхідно перенести 1–2 колонії у 100 мкл лізуючого буфера, який входить до

складу набору для ручного виділення ДНК GenoLyse, ретельно ресуспендувати їх і отриману завесь мікроорганізмів використовувати для виділення нуклеїнової кислоти відповідно до інструкції виробника. При виділенні ДНК із культур, які вирости на щільному середовищі, за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA Extraction Kit необхідно до 700 мкл деіонізованої води для молекулярної біології внести 1–2 колонії мікроорганізмів, ретельно перемішати на вортексі, помістити у GenoXtract та запустити відповідну програму.

Для контролю якості етапу виділення ДНК необхідно обов'язково з кожною партією досліджуваних проб (10–12 зразків) ставити негативний контроль. У якості якого може бути використана стерильна деіонізована вода, яку вносять у чисту пробірку і здійснюють з нею усі маніпуляції такі, як із зразком.

Подальші етапи дослідження матеріалу у ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами виконують відповідно до інструкцій виробника.

Усі посіви матеріалу на живильні середовища, що були здійснені паралельно при виконанні комплексу досліджень даної проби, повинні бути інкубовані в оптимальних температурних умовах. Культури, що виділені в рідкому та на щільному середовищах підлягають обов'язковій ідентифікації та визначенню профілю резистентності до ПТП. Результати досліджень (бактеріоскопії, ідентифікації, ТМЧ, молекулярно-генетичних досліджень) заносять до журналу ТБ 04/2 та інформують про них фтизіатра для призначення та/або коригування схеми лікування хворого.

6. Формулювання відповіді про результат дослідження у картриджі Xpert MTB/RIF:

при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф+» у бланку висновку вказують – «Виявлені *M. tuberculosis complex* та мутації у гені *groB*, з якими пов'язують резистентність до R»;

при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф–» у бланку висновку вказують – «Виявлені *M. tuberculosis complex*, мутації у гені *groB* не виявлено»;

при отриманні у системі GeneXpert результату «МБТ–» у бланку висновку вказують – «*M. tuberculosis complex* не виявлено»;

при отриманні у системі GeneXpert результату «помилка» або «нема результату» і відсутності достатнього об'єму залишків даної проби, а також при результаті «недійсний» у бланку висновку слід вказати – «Результат підлягає перестановці. Необхідно повторно надати матеріал для дослідження не пізніше 3-х робочих днів від дати видачі даного висновку».

Формулювання відповіді про результат дослідження при використанні наборів для ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами (набори HainLifescience).

При дослідженні матеріалу з використанням набору реагентів GenoType MTBDRplus:

отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому у бланку висновку слід вказати – «Виявлено *M. tuberculosis complex* чутливі до R та H»;

відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика – R або H. Смушка, яка проявилася в зоні гена *groV* свідчить про стійкість досліджуваного штаму до R, смушка в зоні гену *katG* та *inhA* – про стійкість до H. У лабораторному висновку потрібно вказати – «Виявлено *M. tuberculosis complex*, які мають мутації в гені *groV* (та/або *katG* та/або *inhA*), з якими пов'язують стійкість до R (та/або H)».

При дослідженні матеріалу з використанням набору реагентів GenoType MTBDRsl:

отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому у бланку висновку слід вказати – «Виявлено *M. tuberculosis complex* чутливі до Q, амідоглікозидів/циклічних пептидів»;

відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика – Q, амідоглікозидів/циклічних пептидів. Смушка, яка проявилася в зоні гена *gugA* свідчить про стійкість досліджуваного штаму до Q, смушка в зоні гену *rrs* – про стійкість до амідоглікозидів/циклічних пептидів, а в зоні гену *embB* – про стійкість до E. У лабораторному висновку потрібно вказати – «Виявлено *M. tuberculosis complex*, які мають мутації в гені *gugA* (та/або *rrs*, та/або *embB*), з якими пов'язують стійкість до Q (та/або амідоглікозидів/циклічних пептидів, та/або E)».

7. Під дискордантними результатами слід розуміти результати лабораторних досліджень однієї і тієї ж проби досліджуваного матеріалу, отримані різними методами, які суттєво відрізняються або суперечать один одному.

Для мінімізування кількості випадків отримання дискордантних результатів дослідження важливо ретельно аналізувати кожний такий випадок з урахуванням можливих причин їх отримання.

Наявність дискордантних результатів може бути пов'язана з різними чинниками. Якщо молекулярно-генетичними методами виявлено ДНК збудника ТБ, а за допомогою бактеріоскопії із тієї ж проби отримано негативний результат, це може бути пояснено більш високою чутливістю методу ПЛР у порівнянні з бактеріоскопією. Випадки відсутності росту мікобактерій при позитивному результаті ПЛР можуть бути пояснені присутністю в пробі нежиттєздатних бактерій, наприклад, після антибіотикотерапії. Разом з тим, можуть бути випадки, коли методом ПЛР мікобактерії не виявлені, а за допомогою культурального методу отримано ріст мікроорганізмів. Одним із варіантів пояснення може бути присутність у матеріалі НТМБ, які не будуть виявлені молекулярними методами, оскільки праймери підібрані таким чином, що виявляють тільки *M. tuberculosis complex*.

Можуть бути і дискордантні результати щодо чутливості мікроорганізмів до ПТП. Слід пам'ятати, що, наприклад, з геном *groV* пов'язують біля 95,0 %

випадків резистентності до R, до 5,0 % випадків резистентності можуть бути пов'язані з мутаціями в інших локусах геному. Аналогічна ситуація стосується і інших препаратів. Необхідно пам'ятати і той факт, що ПЛР забезпечує скринінг послідовностей нуклеїнових кислот, а не амінокислот. Деякі мутації можуть не призводити до заміни амінокислоти («мутації, що мовчать»), тому результат може не співпадати з результатами фенотипових методів.

Якщо у досліджуваній пробі містяться гетерозиготні штами або суміш *M. tuberculosis complex*, або туберкульозних та НТМБ, то результати, отримані в ПЛР, можуть відрізнятися від результатів бактеріологічних досліджень.

Крім того, слід пам'ятати, що такі результати можуть бути отримані при дослідженні різних зразків (наприклад, перша проба тестувалася бактеріологічними методами, а друга – ПЛР), при неправильному відборі хворих (не інформативним є дослідження матеріалу від осіб, що вживали ПТП).

8. Необхідно пам'ятати, що при роботі з одним матеріалом можуть послідовно відкриватися тільки ті пробірки та картридж, які будуть використані саме для цього матеріалу. Відкривати декілька картриджів одночасно – заборонено!

Для попередження крос-контамінації та внутрішньолабораторного інфікування лабораторних фахівців усі маніпуляції з матеріалом, підозрюваним на вміст біологічних патогенних агентів, слід виконувати з використанням засобів індивідуального захисту у ШББ 2 класу.

ІХ. Забезпечення якості досліджень у мікробіологічній лабораторії з діагностики туберкульозу

1. Внутрішній контроль якості бактеріоскопічних досліджень. Для стандартизації та удосконалення якості роботи лабораторії доцільно використовувати готові (комерційного виготовлення) набори барвників, реактиви, які відповідають вимогам методики, що зареєстровані в Україні та мають сертифікат якості.

Кожна партія приготовлених у лабораторії барвників, а також набори барвників комерційного виготовлення, підлягають контролю якості, який проводиться шляхом фарбування контрольних К (+) та К (-) мазків.

Приготування мазків для бактеріоскопії, перегляд та зберігання

Послідовність приготування та фарбування мазків має бути задокументована і знаходитися на робочому місці.

Кожна лабораторія повинна мати і періодично поповнювати набір контрольних мазків.

Після висушування та фіксації, контрольні мазки зберігають в ємностях для зберігання скелец, відповідно промаркованих «Нефарбовані контрольні мазки (+)», «Нефарбовані контрольні мазки (-)».

Для дотримання методики фарбування, обов'язково використовують таймер.

Позитивний контроль К (+) використовується для контролю якості барвників і дотримання методики фарбування. Негативний контроль К (-) підтверджує, що реагенти, розчини барвників, дистильована вода та імерсійна олія не контаміновані КСП чи артефактами.

Перед переглядом мазків, приготовлених з клінічного матеріалу, досліджують пофарбовані контрольні позитивні та негативні мазки.

Мазки, приготовлені з клінічного матеріалу, пофарбовані за Цлем-Нільсеном, не повинні досліджуватись у разі, якщо:

- у позитивному контрольному мазку К (+) не знайдені КСП;
- у негативному контрольному мазку К (-) знайдені КСП;
- недостатнє знебарвлення фону (рожевий мазок).

При виникненні вищевказаної ситуації, всі реагенти, барвники, дистильовану воду та імерсійну олію замінюють на щойно приготовлені (або новий комерційний набір барвників), ретельно обробляють об'єктиви мікроскопу, а партію мазків не досліджують, а готують нові препарати. Якщо клінічний матеріал не залишився, то повідомляють у клінічні відділення з метою доставки в лабораторію повторних зразків біологічного матеріалу від даних пацієнтів.

У мікроскопічному пункті усі переглянуті мазки, незалежно від результату, підлягають зберіганню. Для цього після закінчення дослідження видаляють залишки імерсійної олії з препарату та поміщають їх у спеціально призначені для цього коробки-контейнери для зберігання переглянутих препаратів у тому самому порядку, в якому їх зареєстровано в лабораторному журналі, та відповідно промарковано. Негативні мазки зберігають впродовж 3-ох міс. для перевірки «наосліп». Позитивні мазки зберігають впродовж 6-ти міс.

В спеціалізованих бактеріологічних лабораторіях ПТЗ зберігають позитивні мазки впродовж шести місяців.

З метою запобігання видачі хибнопозитивного результату, позитивні мазки, перед реєстрацією та видачею до закладу, що направив матеріал, мають бути переглянуті іншим, більш досвідченим спеціалістом лабораторії або завідувачем для колегіального рішення щодо позитивності даного мазка та визначення градації позитивного результату.

Інформацію про результат бактеріоскопічного дослідження направляють лікарю (у відділення) не пізніше 24 годин після отримання біологічного матеріалу. Необхідно мати на увазі, що зібране мокротиння може зберігатись у холодильнику на пункті збирання мокротиння до 5 діб, але повинне бути досліджене протягом доби після доставки його до лабораторії.

Аналіз результатів бактеріоскопічного дослідження

З метою удосконалення якості бактеріоскопічних досліджень, виявлення та усунення недоліків у роботі у конкретній лабораторії, необхідно систематично щоквартально проводити аналіз отриманих результатів, звертаючи увагу на частоту одержання позитивних результатів. Завідувач лабораторією у довільній формі описує результати за квартал, вказуючи частку доставлених неякісних проб мокротиння (слина), частку хворих, виявлених

методом бактеріоскопії, кратність обстеження хворих, тощо. Така інформація зберігається у лабораторії для внутрішньолабораторного контролю бактеріоскопії і своєчасного виявлення проблем.

Аналізуючи частоту одержання позитивних результатів порівнюють загальну кількість досліджених проб від пацієнтів з підозрою на ТБ з кількістю позитивних результатів бактеріоскопії.

Причиною значних відхилень від попередніх показників роботи лабораторії (зменшення або збільшення кількості позитивних результатів) може бути як удосконалення роботи лікувального закладу в цілому щодо виявлення нових випадків ТБ, так і поява недоліків в роботі закладу: неправильний відбір пацієнтів на бактеріоскопічне обстеження, порушення правил збирання і транспортування клінічних зразків до лабораторії, неякісні барвники та реагенти, порушення лабораторних методик, високе навантаження персоналу лабораторії.

Особливу увагу слід звертати на випадки отримання позитивних результатів при дослідженні декількох послідовних мазків. Причиною може бути внутрішньолабораторне забруднення препаратів підчас їх приготування, фарбування або мікроскопії.

3. ВКЯ бактеріологічних (культуральних) досліджень – процес ефективного і систематичного внутрішнього моніторингу всіх маніпуляцій, що проводяться в лабораторії, яка здійснює культуральні дослідження. Контроль якості повинен гарантувати, що результати досліджень в лабораторії є точними, належними і порівняними. Це досягається за допомогою оцінки якості зразків біологічного матеріалу, ретельності їх деконтамінації, правильності виділення і ідентифікації культур, якості реагентів і живильних середовищ та стану ЗВТ і обладнання, а також систематичного аналізу результатів культуральних досліджень і документального підтвердження правильності використання методів.

Якість доставленого біологічного матеріалу

Мокротиння може зберігатися в умовах холодильника до 5 діб після збирання. Якщо такої можливості немає, матеріал можна заморожувати при температурі $(-20)^{\circ}\text{C}$ з наступним однократним розморожуванням. Але слід пам'ятати, що для попередження високого рівня контамінації, матеріал для бактеріологічного дослідження, необхідно якомога швидше доставити в лабораторію.

Якість щільних живильних середовищ

Для приготування яєчних щільних живильних середовищ (Левенштейна-Єнсена, Фінна-II) використовують свіжі курячі яйця (не більше, ніж 7 днів), з цілою, незабрудненою шкаралупою (див. розділ. 7.3).

Температура та час згортання яєчних середовищ підлягають обов'язковому контролю за допомогою повірених максимальних термометрів. Результати контролю вносять у журнал або лист контролю роботи коагулятора, який ведуть у довільній формі, відображаючи інформацію про дату контролю, температуру та тривалість коагуляції за підписом відповідальної особи.

Готове ячне середовище оцінюють візуально: колір, консистенція, наявність забруднення.

За відсутності візуально виявлених дефектів партію приготовлених яєчних середовищ перевіряють на стерильність та на ростові властивості.

Приготовлене ячне середовище зберігають в холодильнику не більше 4 тижнів.

Для отримання якісного середовища і запобігання забруднення його сторонньою мікрофлорою рекомендується виконувати наступні основні правила.

Приміщення, де готують живильні середовища, утримують в максимальній чистоті. Рекомендується регулярно мити підлогу з додаванням дезінфікуючого засобу, а також протирати дезінфектантом обладнання і робочі поверхні. Перед приготуванням середовищ необхідно обробити приміщення УФ-променями.

Розливати середовища слід у ШББ 2 класу. Використовувати тільки стерильний посуд.

Використовувати точно зважені кількості реагентів.

Правильно проводити розведення розчинів: використовувати мірний посуд, доводити об'єм розчину по нижній межі меніска.

Постійно контролювати температуру в згортувачі, не допускаючи перегріву середовищ у ньому.

Суворо дотримуватись правил асептики, обпалювати горло пробірок і колб.

Ретельно обробляти поверхню яєць перед їх розбиванням для приготування яєчної суспензії.

Не піддавати готове середовище дії УФ-променів. Зберігати готові середовища в темному місці, в умовах холодильника.

Рекомендується розливати не менше, ніж по 5,0 см³ середовища.

Проводити контроль якості кожної партії приготованих середовищ.

Контроль стерильності і ростових властивостей живильних середовищ

Контроль стерильності і ростових властивостей живильних середовищ для культивування мікобактерій описаний в розділі 7.3.

Можливі причини приготування неякісного середовища:

неякісні вихідні реагенти;

невідповідний термін придатності реагентів;

невідповідна якість яєць;

недотримання температурного режиму згортання середовища;

неякісна стерилізація посуду;

якість кришок для пробірок (нещільне прилягання до пробірки);

порушення температури культивування в термостаті.

Чутливість живильного середовища перевіряється аналізом співвідношень:

– позитивна мікроскопія від хворого супроводжується негативним результатом культурального дослідження (допускається до 2,0 %);

позитивна мікроскопія (3+) супроводжується ростом поодиноких (10–20) колоній (допускається 1,0–2,0 %).

Контроль якості кров'яного агару

Як усі мікробіологічні середовища, кров'яний агар, виготовлений у лабораторних умовах, підлягає контролю якості. У кожній новій серії приготованого середовища 1,0–3,0 % чашок (в залежності від розміру партії) перевіряють на стерильність і ростові властивості. Для контролю ростових властивостей використовуються контрольні штами *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* (референс-штами)*.

*Примітка. Для зберігання у замороженому стані контрольних штамів *E. coli* та *S. aureus* приготувати густу суспензію культури у триптиказо-соєвому або живильному бульйоні з гліцерином (15,0 %) і розлитому по 1,5 мл у підписані кріопробірки. Заморозити і зберігати при $(-70) ^\circ\text{C}$.

Приготувати суспензію колоній із щільного бактеріологічного середовища у стерильному ізотонічному розчині або стерильній дистильованій воді щільністю 0,5 McFarland (може бути використана розморожена суспензія, що є у наявності, і розведена до тієї ж щільності).

Зробити 100-кратне розведення, додаючи 10,0 мкл суспензії до 1,0 мл стерильного ізотонічного розчину або стерильної дистильованої води. Добре перемішати. Отримали розведення 10^{-2} .

Зробити ще одне 100-кратне розведення, помістивши 10,0 мкл із пробірки з розведенням 10^{-2} в 1,0 мл стерильного ізотонічного розчину або дистильованої води. Посіяти на чашку 100 мкл отриманого розведення 10^{-4} і розподілити по поверхні кров'яного агару для отримання ізольованих колоній.

Помістити в термостат на 48 годин при температурі $35-37 ^\circ\text{C}$.

Паку ж кількість незасіяних чашок з кров'яним агаром помістити в термостат на 48 годин при температурі $35-37 ^\circ\text{C}$ для перевірки на стерильність.

Задовільними вважають такі результати: відсутність росту на незасіяних чашках і типовий ріст бактерій у чашках з посівами.

Результати контролю внести у Журнал контролю якості середовищ.

4. Кожну нову партію реагентів (бульйон Мідлбука 7Н9, ростова добавка MGIT 960 Supplement) перевіряють на якість при отриманні (вхідний контроль) та періодично (при збільшенні кількості проростів) перед використанням. Контролюють термін придатності, проводять візуальний огляд пробірок на цілісність та наявність забруднень. Для роботи використовують лише цілі пробірки з прозорим бульйоном без сторонніх домішок з достатнім терміном придатності.

Для перевірки ростових властивостей рідкого середовища рекомендується використовувати контрольні штами: *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. fortuitum* ATCC 6841.

Підготовка суспензії культури:

використовують 10–15 добові культури вищевказаних штамів, вирощені на середовищі Левенштейна-Єнсена;

за допомогою стерильного аплікатора, зняти з поверхні середовища всі колонії не допускаючи знімання середовища;

обережно перенести зняту культуру в пробірку з кришкою, що герметично загвинчується, яка містить 4,0 мл стерильного бульйону Міддлбрука 7Н9 (пробірка А);

приготувати суспензію, ретельно струшуючи пробірку з культурою на струшувачі-вортексі протягом 1–2 хв. (мутність більше 1,0 McF);

залишити суспензію на 20 хв. для осадження великих часток;

за допомогою стерильної одноразової піпетки перенести надосадову рідину в стерильну скляну пробірку з кришкою, що герметично загвинчується (пробірка В);

залишити суспензію на 15 хв. при кімнатній температурі;

за допомогою стерильної одноразової піпетки перенести надосадову рідину в стерильну скляну пробірку з кришкою, що герметично загвинчується (пробірка С);

довести мутність суспензії в пробірці С до 0,5 McF, додаючи бульйон Міддлбрука або ізотонічний розчин хлориду натрію, добре перемішати. Це робоча суспензія для проведення контролю якості, яку можна розлити по 1,0–2,0 мл у кріопробірки та заморозити до (-70°C). Заморожена суспензія може використовуватись впродовж 6 міс. Не допускати повторного заморожування робочої суспензії.

Якщо суспензія була заморожена, її розморожують та використовують для контролю якості. Розморожена суспензія повторному заморожуванню не підлягає. Невикористані залишки мають бути знешкоджені.

Приготування розведень:

Замість стерильної дистильованої води можна використовувати стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію.

розвести робочу суспензію (0,5 McF), щойно приготовлену або розморожену, у співвідношенні 1:5 (до 1,0 мл суспензії додати 4,0 мл стерильної дистильованої води), ретельно перемішати (пробірка 1);

розвести ще два рази у співвідношенні 1:10, додаючи 0,5 мл суспензії із пробірки 1 в 4,5 мл стерильної дистильованої води (пробірка 2). Ретельно перемішати і знову додати 0,5 мл із пробірки 2 до 4,5 мл стерильної дистильованої води. Ретельно перемішати. Остаточне розведення 1:500 (пробірка 3). Це останнє розведення *M. tuberculosis*, яке використовується для проведення контролю якості.

Розведення для *M. fortuitum* та *M. kansasii* готують аналогічно, крім того для *M. fortuitum* необхідно додатково приготувати розведення із пробірки 3 у співвідношенні 1:10. Взяти 0,5 мл суспензії із пробірки 3 і додати 4,5 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішати. Остаточне розведення 1:5000 (пробірка 4). Для проведення контролю якості використовують вміст пробірки 4.

Для *M. kansasii* розвести вміст пробірки 4 ще раз у співвідношенні 1:10 додаючи 0,5 мл із пробірки 4 до 4,5 мл стерильної дистильованої води, ретельно

перемішати. Остаточне розведення 1:50000 (пробірка 5). Для проведення контролю якості використовують вміст пробірки 5.

Посів та інкубація:

додати в шість пробірок MGIT росту добавку Growth Supplement та суміш антибіотиків PANTA у відповідності до методики;

засіяти у дві промарковані пробірки MGIT по 0,5 мл суспензії *M. tuberculosis* H₃₇Rv із пробірки 3. Таким же чином засіяти у дві пробірки по 0,5 мл суспензії *M. fortuitum* із пробірки 4 та у дві пробірки суспензії *M. kansasii* із пробірки 5. Ретельно перемішати;

помістити засіяні пробірки в апарат ВАСТЕС MGIT 960. Після отримання позитивної індикації на апараті дістати пробірки. Оцінити дані після закінчення терміну, необхідного для отримання позитивного результату.

Очікувані результати:

M. tuberculosis – позитивна флуоресценція в пробірках через 6–10 днів;

M. fortuitum – позитивна флуоресценція в пробірках через 7–11 днів;

M. kansasii – позитивна флуоресценція в пробірках через 1–3 дні.

Якщо ріст в зазначені терміни не отриманий, дослідження з контролю якості повторюють. Якщо вдруге результати з контролю якості залишаються незадовільними, необхідно перевірити життєздатність суспензії, вік культури (якщо вона була заморожена) та інші процедури. Якщо всі параметри відповідають установленим специфікаціям, а результат тестування незадовільний, слід звернутися до сервісної служби компанії BD Diagnostic System.

Заходи безпеки:

усі процедури здійснюють у ШББ 2-го класу;

усі матеріали перед використанням повинні бути простерилізовані шляхом автоклавування;

усі процедури виконують з дотриманням вимог безпеки праці та протиепідемічного режиму.

5. Якість усіх реагентів, які використовуються для роботи в системі ВАСТЕС MGIT 960, підлягає періодичному контролю, у тому числі NALC-NaOH та буфер. Для покращення контролю за контамінацією, дуже важливо включати негативний контроль до партії клінічних зразків. Цю процедуру необхідно проводити в залежності від обсягів роботи, але не рідше, ніж 1 раз на тиждень. Періодично можна включати позитивний контроль для перевірки швидкості росту мікроорганізмів.

Позитивний та негативний контролі

Для негативного контролю використовують 5,0 мл фосфатного буфера, для позитивного – 5,0 мл суспензії *M. tuberculosis* H₃₇Rv 0,5 McF, розведеної у співвідношенні 1:500. Провести передпосівну обробку негативної та позитивної контрольних проб разом з клінічними зразками, використовуючи однаковий метод обробки. Засіяти осад в підготовлені пробірки MGIT та інкубувати так, як і клінічні зразки.

Позитивний контроль повинен дати ріст, час детекції повинен бути в межах встановленого терміну для кожного тесту (ці параметри встановлюються після отримання декількох результатів тестування позитивного контролю).

Негативний контроль не повинен давати росту в межах повного періоду інкубації. Якщо негативний контроль дає флуоресценцію, треба перевірити його на наявність контамінації бактеріями. У разі підтвердження контамінації, перевіряють усі процедури та реагенти з метою виявити джерело забруднення.

Необхідний облік:

– реєструють номери партій усіх витратних матеріалів до апарату BASTEC MGIT;

аналізують дані: по кожній партії оброблених зразків, по кількості посівів, по персоналу, який виконував ці процедури, за часом появи флуоресценції, за результатами бактеріоскопії культур, за рівнем контамінації, тощо;

порівнюють результати досліджень на BASTEC MGIT з результатами, отриманими на щільних середовищах.

6. Внутрішній контроль якості передпосівної обробки біологічного матеріалу. Більшість зразків біологічного матеріалу, до початку дослідження, піддають спеціальній обробці, необхідній для розрідження проби та її деконтамінації з метою знищення небажаної мікрофлори.

Процес гомогенізації і деконтамінації повинен чітко контролюватися. У випадку неправильного його виконання, більшість мікобактерій загинуть, або, навпаки, буде занадто багато проростів іншими бактеріями. Тому лабораторії повинні відслідковувати результати процедури за допомогою ведення обліку рівня контамінації посівів. Як правило, частота контамінації (кількість проростів) в лабораторіях, що проводять мікробіологічні дослідження проб, при культивуванні мокротиння на щільних яєчних середовищах, становить до 3,0 %, але не більше 5,0 %.

Внутрішній контроль якості розчинів для деконтамінації.

Для контролю якості розчинів деконтамінантів та дотримання процедури передпосівної обробки паралельно з обробкою зразків біологічного матеріалу пацієнтів застосовують одну з наступних методик (див. розділ 6.3):

Посів мокротиння, обробленого щойно приготовленим розчином для деконтамінації, на кров'яний агар та середовище Левенштейна-Єнсена.

Методика:

стандартний зразок мокротиння ділять на дві порції, одна з яких не обробляється, а інша проходить передпосівну обробку відповідно до затвердженої методики одним із щойно приготовлених розчинів деконтамінанту, який застосовується в лабораторії;

на одну чашку Петрі з кров'яним агаром засівають 2–4 краплі необробленого деконтамінантом мокротиння, на другу – 2–4 краплі мокротиння після деконтамінації;

на дві пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена засівають по 0,2 мл обробленого і необробленого деконтамінантом мокротиння;

інкубують в термостаті при температурі 37 °С.

Оцінка результатів (оцінюють комплексно за ростом на обох середовищах):

ріст на кров'яному агарі оцінюють через 24 години: наявність рясного росту на чашці з посівом мокротиння, яке не оброблялось деконтамінантом та відсутність росту після обробки;

на середовищі Левенштейна-Єнсена: відсутність проросту в пробірці, де матеріал оброблявся та проріст посіву мокротиння, яке не проходило передпосівну обробку.

Якщо результати відповідають вказаним, то вважають, що деконтамінація проведена якісно і дані розчини для деконтамінації якісні.

Посів суспензії культури *M. fortuitum* 1 McF на кров'яний агар після обробки щойно приготовленим розчином для деконтамінації.

Методика:

приготувати суспензію культури *M. fortuitum*, довести мутність до 1 McF;

3,0 мл суспензії обробити щойно приготовленим розчином одного із деконтамінантів відповідно до методики його застосування;

на одну чашку Петрі з кров'яним агаром засіяти 2–4 краплі суспензії *M. fortuitum* 1 McF, необробленої деконтамінантом, на другу – 2–4 краплі суспензії *M. fortuitum* 1 McF після деконтамінації;

інкубувати в термостаті при температурі 37 °С протягом доби.

Оцінка результатів: через 24 години на чашці Петрі з кров'яним агаром де засіяна суспензія *M. fortuitum* 1 McF після обробки деконтамінантом ріст чистої культури (мономорфний ріст) *M. fortuitum* не менше 70,0–80,0 % від росту без обробки.

Посів штаму *M. tuberculosis* H₃₇Rv на середовище Левенштейна-Єнсена після обробки щойно приготовленим розчином для деконтамінації.

Методика:

приготувати бактеріальну суспензію густиною 1 McF штаму *M. tuberculosis* H₃₇Rv;

одну частину суспензії по 0,2 мл засіяти на 3 паралельних пробірки з щойно приготовленим середовищем Левенштейна-Єнсена, решту – обробити розчином для деконтамінації, відцентрифугувати та по 0,2 мл засіяти на інші 3 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена;

інкубувати в термостаті при температурі 37 °С.

Оцінка результатів: порівняти інтенсивність росту. Ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена штаму *M. tuberculosis* H₃₇Rv після обробки деконтамінантом не менше 70,0–80,0 % від росту без обробки.

Результати проведених тестів заносяться до Журналу контролю якості розчинів для деконтамінації, який ведеться у довільній формі:

назва деконтамінанту (вказати %);

дата приготування розчину;

кількість (л) приготовленого розчину;

матеріал, який береться для контролю (мокротиння, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* H₃₇Rv);

об'єкт, що контролюється (чашки з кров'яним агаром, пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена);

результат контролю якості деконтамінанту: придатний чи не придатний.

Контроль якості розчинів деконтамінантів та дотримання процедури передпосівної обробки біологічного матеріалу необхідно проводити з кожною новою партією приготовленого розчину для деконтамінації, але не рідше, ніж 1 раз на тиждень.

Для попередження проростів розчини деконтамінантів слід розливати по 10,0 мл та додавати окремо до кожної проби біологічного матеріалу.

Аналіз проростів

З метою контролю якості розчинів для деконтамінації та дотримання методики передпосівної обробки біологічного матеріалу аналіз проростів проводиться щомісячно у звіті про роботу лабораторії.

Відсоток проростів розраховується як відношення числа пробірок, що заросли, до усіх засіяних пробірок, в нормі повинен бути для посівів на щільні середовища у межах 3,0–5,0 %. Цей показник повинен систематично аналізуватись (щомісячно, поквартально, за рік) з метою коригування процесу приготування деконтамінантів та процедури передпосівної обробки.

Показник нижче 3,0 % вказує на:

- високу концентрацію розчину деконтамінанту;
- занадто тривалу експозицію з деконтамінантом;
- занадто високу концентрацію малахітового зеленого в яєчному середовищі (високий % малахітового зеленого затримує ріст мікобактерій).

Показник вище 3,0 % вказує на:

- незадовільні умови транспортування та зберігання біологічного матеріалу;

- занадто тривалий період від збирання біологічного матеріалу до посіву;
- занадто низьку концентрацію розчину деконтамінанту;
- короткий час контакту матеріалу з деконтамінантом;
- проблеми при приготуванні середовища: нестерильні розчини, порушення режиму автоклавування та ін.;

наявність забруднення у лабораторії. В цьому випадку необхідно провести додаткову санобробку приміщень та обладнання лабораторії.

У разі виявлення проростів, обумовлених нижчими грибами, необхідно перевірити температуру культивування мікроорганізмів.

Результати оцінки частки проростів – менш трудомісткий процес, ніж щоденний контроль якості з використанням контрольних штамів, проте він не дозволяє проводити оперативний контроль і виправлення недоліків деконтамінації відразу після їх виявлення, оскільки проводиться 1 раз на місяць. При цьому результати значної кількості зразків від пацієнтів можуть виявитися помилковими (хибнонегативними).

7. Внутрішній контроль якості ідентифікації виділених культур імунохроматографічними смужками. При кожній новій поставці наборів імунохроматографічних смужок здійснюють вхідний контроль з використанням тест-штамів позитивного та негативного контролю (див. розділ 8.5).

Кожну партію досліджень культур, виділених з діагностичного матеріалу також супроводжують контролем.

У якості позитивного контролю використовують культуру *M. tuberculosis* H₃₇Rv, вирощену на рідкому середовищі, у якості негативного контролю може бути використана культура НТМБ, вирощена на рідкому середовищі, або незасіяне рідке середовище. Важливим показником тесту є внутрішній контроль.

Якість набору імунохроматографічних смужок або тестування досліджуваних культур вважають якісним, якщо отримані наступні результати:

відслідковується чітка лінія внутрішнього контролю;

позитивний контроль (*M. tuberculosis* H₃₇Rv) повинен показати позитивний результат;

негативний контроль (НТМБ або незасіяний бульйон) повинен показати негативний результат.

Якщо якийсь контрольний результат неприйнятний, то результати тестування не видаються. Необхідно провести повторні дослідження з новим (субкультивованим на рідкому середовищі) контрольним штамом. Якщо результати контролю будуть очікуваними, слід повторити тестування виділених культур.

7. Контроль якості ТМЧ має проводитись систематично.

Мінімальні вимоги: перевіряти кожен нову партію реагентів та кожен партію приготовленого середовища з ПТП, використовувати лише чисті субстанції ПТП. Кожна партія приготовленого щільного живильного середовища повинна бути перевірена на стерильність (інкубація у термостаті). Для кожної партії середовища при тестуванні на чутливість клінічних зразків необхідно одночасно провести тест на чутливість контрольного штаму *M. tuberculosis* H₃₇Rv, і штаму *M. tuberculosis* стійкого до препаратів 1-го ряду.

Якщо середовище з препаратами приготоване правильно, то МЧ контрольних культур (чутливого та стійкого) буде незмінною.

Якщо результати контролю якості партії реагентів та живильних середовищ незадовільні, всі результати, отримані під час роботи з цією партією необхідно повністю переглянути, а дослідження повторити.

8. Перший раз посіви переглядають через 24 години, коли щільно загвинчують кришки для попередження висихання живильного середовища. Через 48 годин посіви переглядають для контролю відсутності росту супутньої мікрофлори. Надалі посіви переглядають кожного тижня.

Якщо під час щотижневого перегляду посівів виявлено ріст контамінантів по всій поверхні живильного середовища або відбулося розрідження чи знебарвлення живильного середовища, такі пробірки видаляють з термостата та знешкоджують автоклавуванням. Деякі контамінанти із речовин, які входять до

складу живильного середовища, здатні в результаті метаболізму утворювати кислоту, яка знижує рівень рН середовища та звільняє частину зв'язаного яєчним білком барвника (на це вказує поява темно-зеленого кольору середовища). Посіви з частково контамінованою поверхнею живильного середовища необхідно продовжувати інкубувати. Якщо проріст середовища з'явився пізно, не виключається можливість наявності там росту мікобактерій. В таких випадках рекомендується приготувати мазки з поверхні середовища для дослідження на КСБ. Якщо при бактеріоскопії виявлені КСП, необхідно провести повторну деконтамінацію матеріалу із такої пробірки та провести повторний посів.

Результат «Проріст» видається у випадку, коли заросли всі паралельно засіяні пробірки з даного зразка біологічного матеріалу. У разі, коли є хоча б одна пробірка з посівом, на якій можна врахувати результат, відповідь «Проріст» не видається.

Ріст *M. tuberculosis* на щільному середовищі з'являється в середньому на 3–6 тижнів. Якщо отримано ріст культури, то, після попередньої ідентифікації (швидкість та температура росту, пігментоутворення, морфологія колоній, бактеріоскопія на КСП та ін.), результати заносять до Форми ТБ 0ба та направляють лікарю-фтизіатру як попереднє повідомлення про отримання росту культури, яка за морфологічними ознаками схожа на мікобактерії, але остаточний результат може бути наданий після проведення повної ідентифікації та визначення ТМЧ до ПТП.

Результат посіву на щільне середовище повинен відображати не тільки якісну характеристику (позитивний чи негативний), але і кількісну оцінку (число колоній), відповідно до вимог чинних нормативних документів.

Більшість посівів дає ріст *M. tuberculosis* на щільному середовищі впродовж 2-ох місяців. Тому інкубують посіви до 2,5 місяців. При відсутності росту впродовж 10 тижнів посів вважають негативним, пробірки видаляють і знешкоджують шляхом автоклавування.

9. З метою підвищення якості бактеріологічного дослідження, виявлення та усунення недоліків у роботі, необхідно систематично 1 раз на квартал аналізувати отримані результати, щоб мати уяву про частоту одержання позитивних результатів, співвідношення результатів бактеріоскопічного та культурального досліджень, додатковий внесок культурального дослідження до бактеріоскопічного. Якщо при цьому будуть виявлені значні відхилення від середнього показника, необхідно визначити причину цього.

Щоквартально результати досліджень матеріалу від хворих на легеневий туберкульоз аналізують за наступними показниками, які розраховують від усіх досліджених проб:

культура(+)	відсоток від усіх досліджених
Із них:	
мікроскопія (+), культура(+)	складають більшість
мікроскопія (-), культура(+)	20,0–40,0 %

мікроскопія (+), культура (-)	до 1,0 % при ТБ у хворих, які не отримували ПТП
мікроскопія (+), культура (проріст)	3,0 %
мікроскопія (-), культура (-)	відсутні

При наявності значних відхилень від стандартного співвідношення, вказаного вище, необхідно з'ясувати причину, яка може залежати від правильності організації роботи в лабораторії та від недоліків на долабораторному етапі.

Необхідно враховувати, що в різних населених пунктах та в різних медичних закладах це співвідношення може значно відрізнятись, тому необхідно, в кожному конкретному випадку, визначити середнє співвідношення для певної лабораторії та аналізувати причини будь-якого відхилення від нього.

10. При здійсненні ВКЯ молекулярно-генетичних досліджень важливо дотримуватись вимог до кожного етапу організації таких досліджень.

Планувальні рішення та оздоблення приміщення лабораторії (відділу) ПЛР-досліджень мають відповідати вимогам чинних нормативних документів. Особливо це важливо для лабораторій, які використовують методику гібридизації з типоспецифічними зондами. Невиконання вимог до організації ПЛР-лабораторії може призводити до отримання хибних результатів.

Обладнання для молекулярно-генетичних досліджень також має бути зареєстроване та дозволене до використання в Україні в установленому порядку. Воно вимагає сервісного обслуговування, а окремі прилади калібрування та метрологічної повірки або атестації.

Витратні пластикові матеріали повинні використовуватися тільки з маркуванням «вільні від РНК-аз та ДНК-аз», наконечники до дозаторів – тільки з аерозольним фільтром.

Переносити будь-яке обладнання та витратні матеріали із одного робочого приміщення в інше категорично заборонено!

Забезпечення кожного приміщення окремим набором обладнання та витратних матеріалів значно знижує ризик переносу контамінантів. Робочі приміщення, обладнання та всі предмети, котрих зазвичай торкаються руками (у тому числі дверні ручки, телефони, ручки холодильників та морозильних камер, тощо) повинні регулярно очищатись з використанням відповідних миючих засобів та методів.

Ризик зараження суттєво можна знизити шляхом ретельної утилізації відходів.

Вимоги щодо сервісного обслуговування та метрологічної повірки (атестації) викладені у Додатку 4.

Для контролю лабораторних процедур необхідно ретельно аналізувати отримані результати – експоненціальний ріст накопичення флуоресцентного сигналу, отримання профілів при гібридизації, якість проходження контрольних зразків (позитивного, негативного, внутрішніх). Усі протоколи дослідження мають бути роздрукованими і зберігатись так, як інші робочі

журнали у лабораторії. Крім паперових носіїв, копії протоколів виконаних досліджень накопичуються і архівуються в електронному вигляді.

При виникненні підозри на контамінацію у лабораторії використовувати референс-зразки та перевірені негативні зразки.

Для своєчасного виявлення контамінації у лабораторії необхідно систематично контролювати стан поверхонь та обладнання відповідно до чинних нормативних документів. У разі виявлення контамінації слід негайно припинити дослідження та вжити заходів з ліквідації такого становища. До роботи можна стати тільки після отримання відповідних результатів контрольних тестів якості здійсненої деконтамінації. Результати таких досліджень заносять до Журналу реєстрації контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновими кислотами, який ведуть у довільній формі.

11. Технологія з використанням картриджів Xpert MTB/RIF передбачає проведення двох видів внутрішнього контролю кожного дослідження:

Контроль екстракції та ампліфікації ДНК проби, а також можливого пригнічення ПЛР.

Контроль якості зондів. Цей контроль здійснюється автоматично до початку ПЛР і дозволяє оцінити регідrataцію реагентів, наповнення ПЛР пробірки, її цілісність, стабільність барвника та гасителя.

Контроль екстракції на ампліфікації необхідний для гарантії правильності проведення тесту містить висушені спори *B. globigii* і включений до кожного картриджу, що забезпечує верифікацію адекватності аналізу матеріалу на *M. tuberculosis*. Даний тест може підтвердити, що відбувся лізис *M. tuberculosis* (при їх наявності), і що аналіз проведений адекватно. Крім того, цей контроль виявляє інгібіцію ПЛР у реальному часі. Результат аналізу цього контролю повинен бути позитивним при отриманому негативному результаті дослідження матеріалу і може бути негативним або позитивним при позитивному результаті тестування клінічного матеріалу. Тест вважається пройденим, якщо результат задовольняє вказані валідовані критерії. Негативний результат дослідження не можна вважати достовірним при негативному результаті тестування цього контролю.

Контроль якості зондів. Перед початком ПЛР прилад GeneXpert Dx вимірює інтенсивність вихідного рівня флуоресценції проби для оцінки регідrataції реагентів, наповнення пробірки, чистоти проби і стабільності барвника. Цей тест вважається пройденим, якщо результат задовольняє валідовані критерії.

Програмне забезпечення приладу дозволяє здійснювати моніторинг за результатами проходження названих внутрішніх контролів. Крім того, прилад дає змогу визначати інші помилки, що виникають у ході виконання дослідження і про усі помилки прилад сповіщає оператора. Всю цю інформацію, слід аналізувати та вживати заходів для зменшення кількості помилок.

12. Для отримання достовірних результатів дослідження необхідно використовувати тільки зареєстровані та допущені до використання в Україні в установленому порядку обладнання, набори реагентів та витратні матеріали.

ПЛР з детекцією методом гібридизації з типоспецифічними зондами (лінійний зонд-аналіз) має високі ризики щодо контамінації реагентів, проб, витратних матеріалів, тому необхідно суворо дотримуватись вимог щодо організації роботи молекулярно-генетичними методами, викладених у чинних нормативних документах, а також інструкцій виробника наборів реагентів.

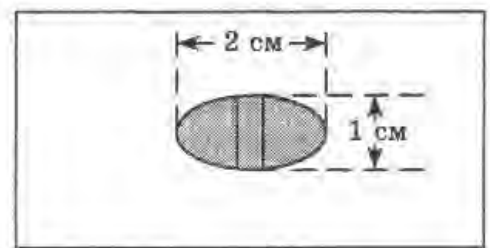
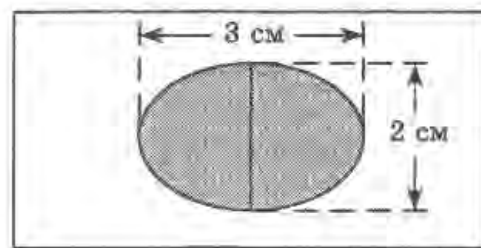
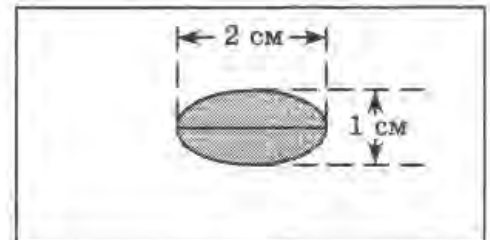
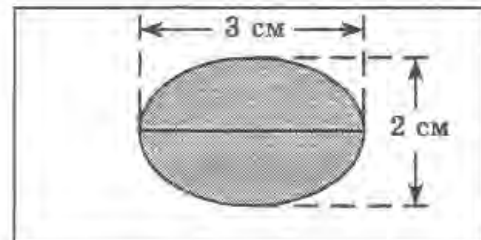
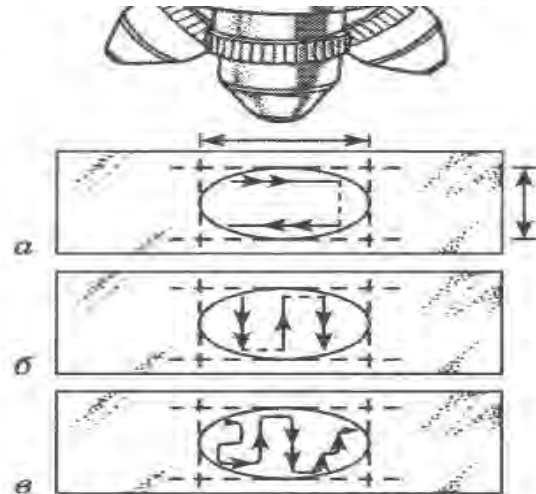
Крім того, використання позитивних та негативних контролів для кожної постановки, внутрішніх контролів для кожної проби та ретельний аналіз отриманих результатів дозволить уникнути хибних результатів та своєчасно виявити і ліквідувати проблеми у лабораторії. Гарантією достовірних результатів дослідження є отримання передбачуваного очікуваного результату тестування контролів.

Якщо дослідження контрольних мішеней дали несподівані результати, видати валідний результат про дослідження клінічного матеріалу неможливо, необхідно повторити дослідження.

**Генеральний директор
Директорату громадського
здоров'я**

А. Скіпальський

Перегляд мазка при мікроскопічному дослідженні

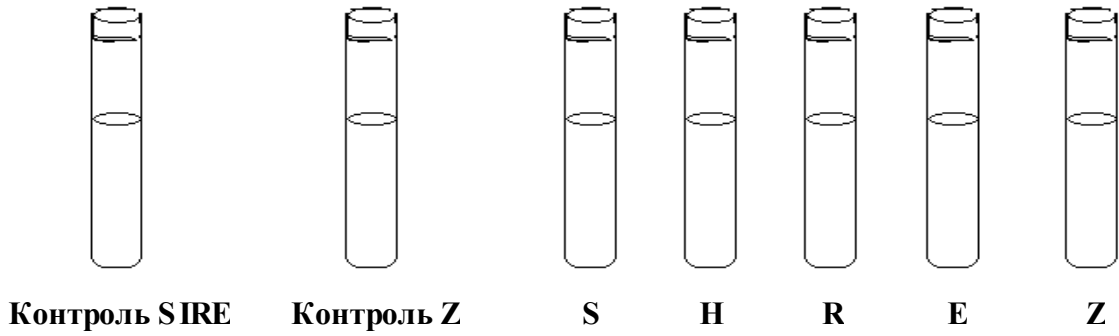


Г

Д

а, б – правильно; в – неправильно. г – одна горизонтальна лінія (3,0 см) = 150 п/з; одна вертикальна (2,0 см) = 100 п/з; д – одна горизонтальна лінія (2,0 см) = 100 п/з; дві вертикальні (по 1,0 см) = 100 п/з.

Маркування пробірок для постановки ТМЧ мікобактерій до препаратів 1-го ряду

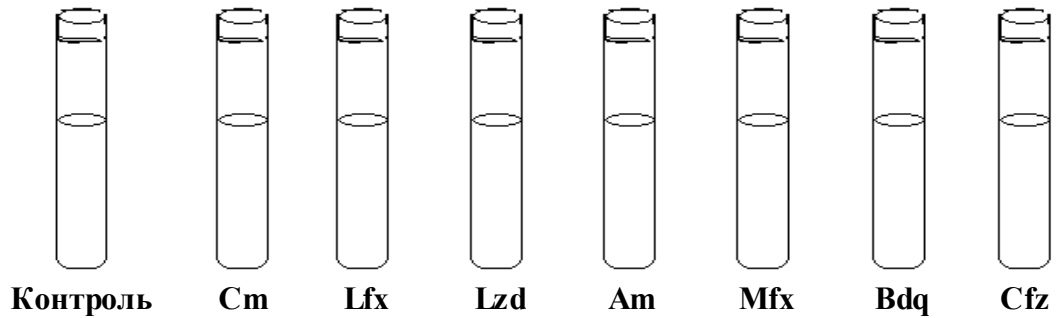


Додавання добавок, що збагачують середовище, у пробірки

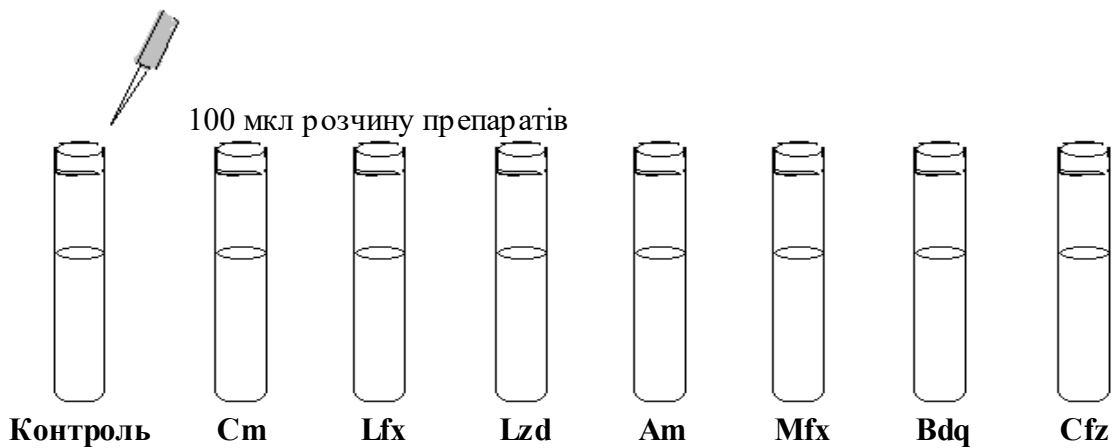


Додаток 3

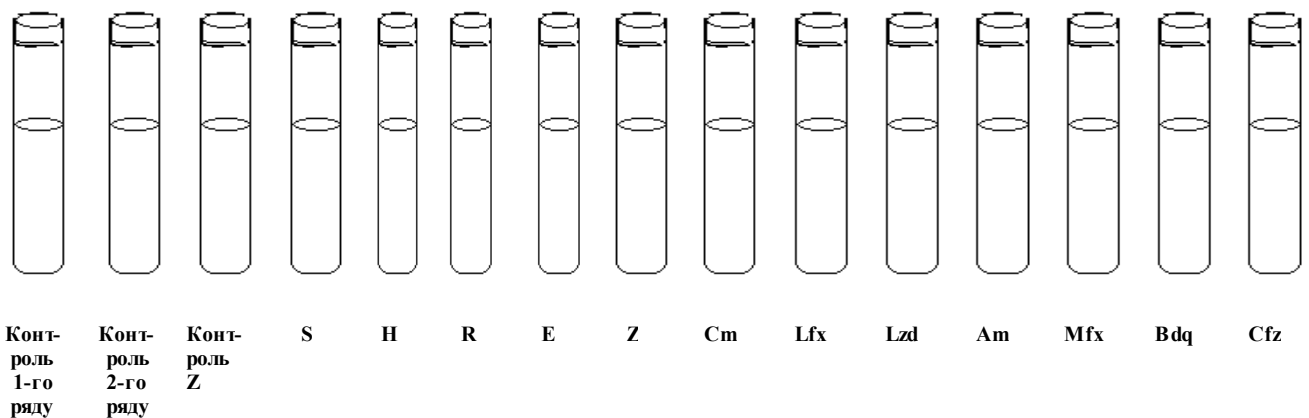
Маркування пробірок для постановки ТМЧ мікобактерій до препаратів 2-го ряду



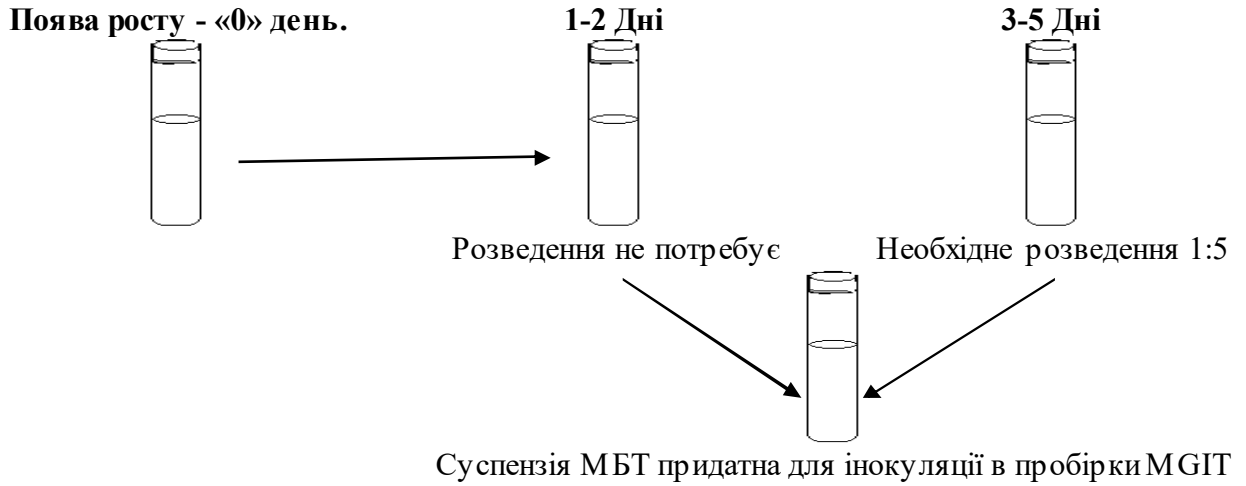
Додавання препаратів 2-го ряду у пробірки MGIT для ТМЧ



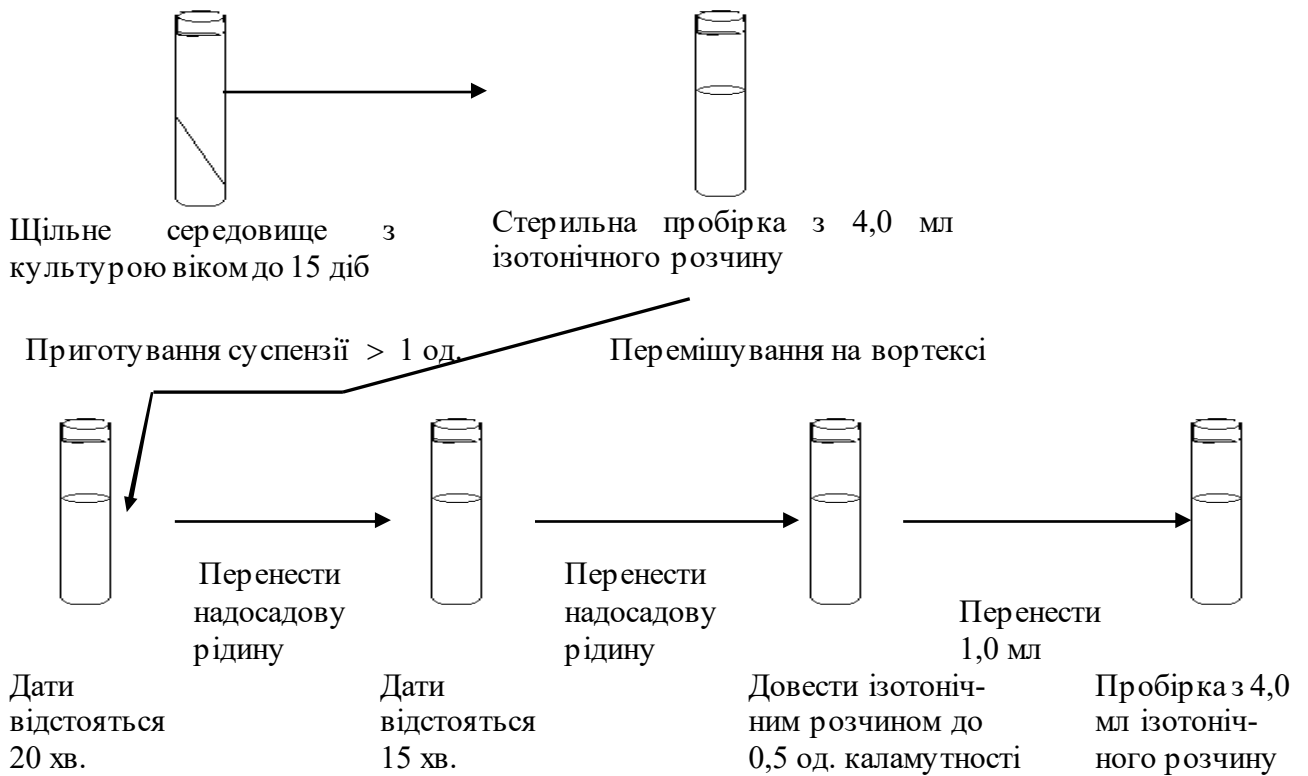
Маркування пробірок для постановки ТМЧ мікобактерій до препаратів 1-го та 2-го ряду



Приготування суспензії МБТ для проведення ТМЧ



Приготування суспензії мікобактерій з щільного живильного середовища для посіву на ТМЧ в системі MGIT



Бактеріологічна ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій

До НТМБ належать всі культури, що дали ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм або на середовищі з ПНБК, і підлягають ідентифікації до виду.

Первинна ідентифікація заснована на морфологічних і фенотипічних властивостях мікобактерій. Знання видової належності мікобактерій визначає подальшу тактику лікаря. Наприклад, однократне виділення з діагностичного матеріалу потенційно-патогенних мікобактерій вимагає повторного бактеріологічного обстеження хворого. Часті знахідки сапрофітних мікобактерій, широко поширених у природі, у матеріалі від хворих, особливо *M. goodnae*, можуть вказувати на контамінацію матеріалу при заборі, на забруднення водопровідної або дистильованої води.

Остаточна ідентифікація заснована на поглибленому вивченні біохімічних властивостей і культуральних потреб мікобактерій.

Первинна ідентифікація НТМБ

Первинна ідентифікація заснована на таких ознаках, як:

- швидкість росту;
- здатність до утворення пігменту;
- здатність до росту при різних температурах.

Для виявлення цих ознак не потрібно спеціального обладнання і реактивів, тому їх можна вивчати в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ. Рекомендується мати додатковий термостат з температурою 45 °С.

Швидкість росту

Швидкість росту мікобактерій – це час, необхідний для формування видимих зрілих колоній на щільному середовищі.

Мікобактерії, які формують такі колонії протягом 7 днів, називаються **швидкозростаючими**. До групи швидкозростаючих мікобактерій належать *M. fortuitum* і *M. chelonae*, для повного росту яких потрібно не більше 5 діб. Однак, при виділенні з патологічного матеріалу швидкозростаючі мікобактерії можуть мати більш тривалий період росту.

Мікобактерії, яким для формування колоній необхідний більш тривалий період часу, називаються **повільнозростаючими**. До них належать *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* та ін. В той же час, надлишок посівного матеріалу може бути причиною швидкої появи росту повільнозростаючих мікобактерій. Крім того, облік швидкості росту необхідно проводити з часу утворення

сформованих колоній, а не за появою ініціального росту. Швидкість росту мікобактерій оцінюють за швидкістю росту субкультури.

Методика виконання:

0,1 мл суспензії досліджуваної культури у стандартному розведенні засівають на середовище Левенштейна-Єнсена, інкубують при температурі 37 °С. Спостереження за культурою перші 5–7 діб щоденне, далі – щотижня, до моменту появи сформованих колоній.

За швидкістю росту культури можна спостерігати при визначенні чутливості мікобактерій до ПТП. Враховувати результати чутливості швидкозростаючих мікобактерій до ПТП можна через 5–7 діб, повільнозростаючих – через 21 добу.

Визначення здатності до росту при різних температурах

Методика виконання:

1. Приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5.
2. Розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду).
3. Засіяти по 0,2 мл суспензії у 4 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена.
4. Інкубувати засіяні пробірки при 22, 28, 37 і 45 °С.

Майже усі види НТМБ добре ростуть при 22 °С. При температурі 45 °С ростуть 86,0 % культур *M. avium* і всі культури *M. xenopi*.

Здатність продукувати пігмент

Колонії НТМБ можуть мати забарвлення від кремового до інтенсивного жовто-помаранчевого. У залежності від забарвлення колоній і здатності утворення пігменту під дією світла НТМБ розподіляються на 3 групи.

1. Фотохромогенні мікобактерії. Продукують жовтий пігмент тільки під дією світла, у темряві вони мають кремовий колір. Типовим представником цієї групи є *M. kansasii*.

2. Скотохромогенні мікобактерії. Продукують пігмент від інтенсивно жовтого до помаранчевого кольору при рості як при світлі, так і в темряві. До них належать *M. gordonae* і *M. xenopi*.

3. Нехромогенні мікобактерії. Не утворюють пігмент, їх колонії мають тільки білуваті або кремові відтінки. У цю групу входять *M. avium*, *M. malmoense*, *M. terrae complex* та ін. Серед них зустрічаються культури, які змінюють забарвлення у процесі старіння або при несприятливих умовах росту (22 °С).

Визначення фотохромогенних властивостей мікобактерій

Методика виконання:

1. Приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5.
 2. Розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду).
 3. Засіяти по 0,2 мл суспензії у 2 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена. Загорнути обидві пробірки в алюмінієву фольгу (для захисту від дії світла в термостаті).
 4. Інкубувати при температурі 37 °С.
 5. Через 8–10 діб з'являється ініціальний ріст культури. Взяти одну з пробірок, звільнити від фольги і помістити на 2 години під яскраве сонячне або електричне світло. Після закінчення дії світла пробірку маркують написом «світло» і продовжити інкубацію в термостаті при температурі 37 °С.
 6. Через 1–2 доби перевіряють забарвлення культури. Якщо під впливом світла культура в пробірці «світло» набула жовтого забарвлення, а в контрольній пробірці залишилася кремовою, то це фотохромогенна культура.
- На підставі застосування найпростіших бактеріологічних методів, що дозволяють виявити специфічні ознаки НТМБ, а також використовуючи вже описані вище саліцилатний тест і визначення нітратредуктази, можна провести первинну ідентифікацію мікобактерій (табл. 21).

Таблиця 21 – Характеристика видів нетуберкульозних мікобактерій, що найчастіше зустрічаються у клінічному матеріалі

Види мікобактерій	Швидкість росту	Пігментація колоній	Ріст при температурі		Відновлення нітратів	Деградація саліцилату натрію
			22 °С	45 °С		
<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	П	Н	+	+	–	–
<i>M. xenopi</i>	П	С	–	+	–	–
<i>M. kansasii</i>	П	Ф	+	–	+	–
<i>M. malmoense</i>	П	Н	+	–	–	–
<i>M. scrofulaceum</i>	П	С	+	–	+	–
<i>M. gordonae</i>	П	С	+	–	–	–
<i>M. terrae complex</i>	П	Н	+	–	+	–
<i>M. fortuitum</i>	Ш	Н	+	–	+	+
<i>M. chelonae</i>	Ш	Н	+	–	–	+
<i>M. flavescens</i>	Ш	С	+	–	+	–

Примітка. П – повільнозростаючі, Ш – швидкозростаючі, С – скотохромогенні, Ф – фотохромогенні, Н – нехромогенні.

Так, якщо швидкозростаюча мікобактерія має позитивний результат щодо деградації саліциловокислого натрію, то це може бути *M. fortuitum* або *M. chelonae*.

Слід визначити наявність нітратредуктази: позитивна реакція у *M. fortuitum*, негативна – у *M. chelonae*.

За здатністю росту при 45 °С можна розрізнити *M. avium* (росте) і не ростуть представники *M. terrae complex*.

Таким чином, на підставі знання кількох властивостей мікобактерій можна провести первинну ідентифікацію. Для остаточної ідентифікації виділені культури направляють в лабораторії вищого рівня.

Остаточна ідентифікація

Остаточна ідентифікація із застосуванням складних біохімічних досліджень проводиться у лабораторіях III рівня. Ідентифікація проводиться на підставі визначення активності ферментів (амідази, арилсульфатази, каталази), толерантності до різних хімічних агентів, здатності до гідролізу Твіну 80, відновлення нітратів і телуриту калію, засвоєння заліза, росту на середовищі з хлоридом натрію.

Результати первинних досліджень мікобактерій дозволяють вибрати біохімічні тести, необхідні для остаточної ідентифікації НТМБ (схеми А, В, С, Д).

Схема А

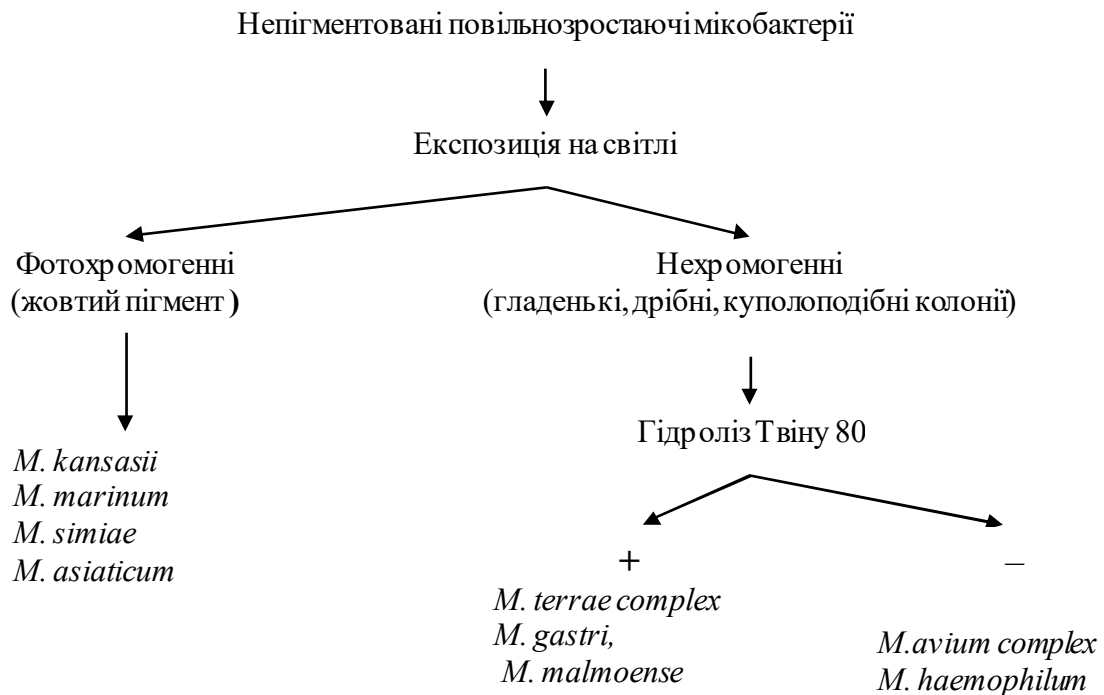


Схема В

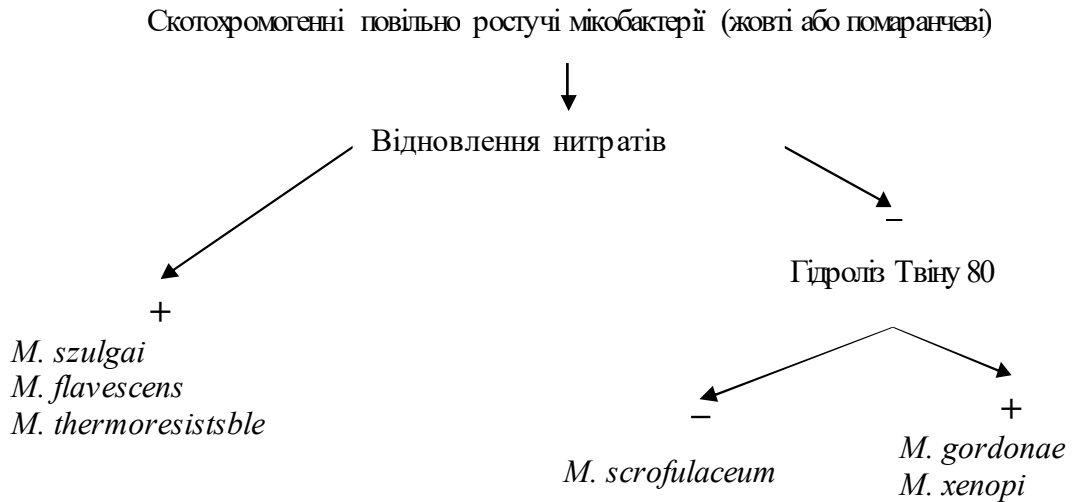


Схема С

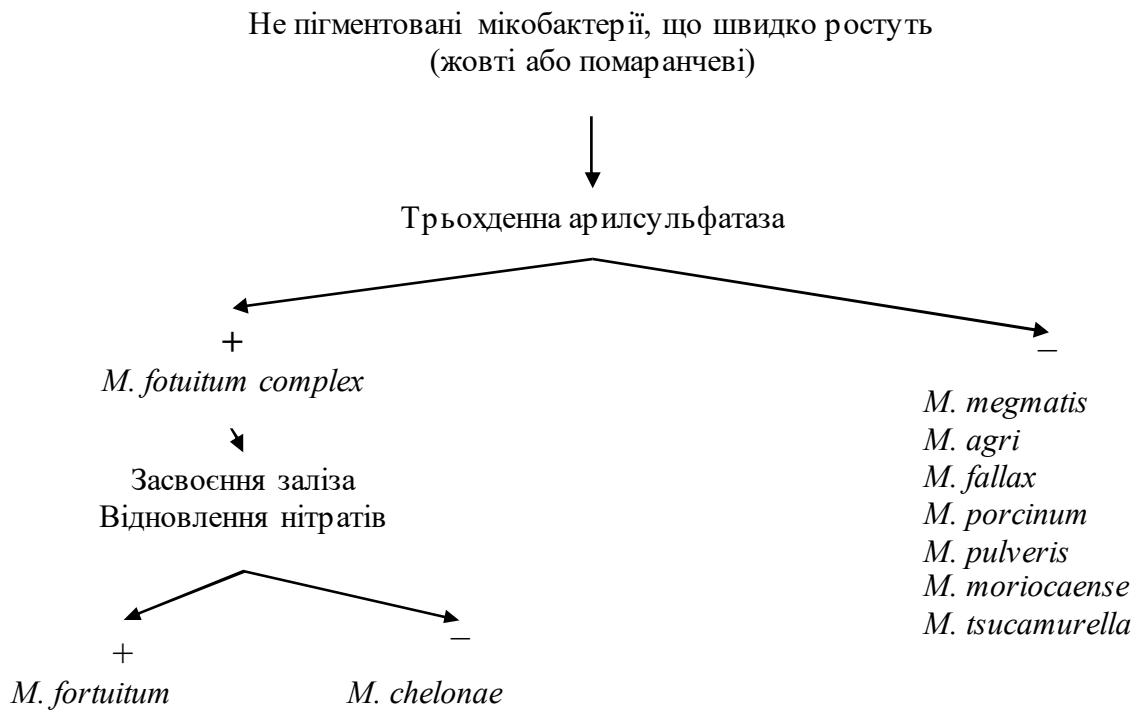


Схема Д

саліцилового натрію	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-
Каталаза 68 °С	+	±	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+
Гідроліз Твіну 80	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl	-	-	-	-	-	±	-	+	В	-	+	В

Примітка. П – повільнозростаючі, Ш – швидкозростаючі, Н – нехромогенні, С – скотохромогенні, Ф – фотохромогенні, В – варіює.

Додаток 6

Видова ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій за допомогою молекулярно-генетичного методу

Тест GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) заснований на технології DNA-STRIP, який дозволяє ідентифікувати наступні види мікобактерій: *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, комплекс *M. tuberculosis* та *M. xenopi*.

Процедура проведення тесту складається з трьох етапів:

– виділення ДНК з культур, що вирости на щільному або рідкому поживному середовищі);

– мультиплексна ампліфікація з біотинильованими праймерами;

– реверс-гібридизація.

Гібридизація включає наступні етапи:

– хімічна денатурація продуктів ампліфікації

– гібридизація одноланцюгових ампліконів, які помічені біотином, на мембранозв'язаних зондах

– ретельна промивка

– додавання кон'югату стрептавідину/лужної фосфатази (реакція забарвлення).

Виділення ДНК

Вихідним матеріалом для тесту можуть бути бактерії, які виростили на щільному живильному середовищі (напр. Левенштейна-Єнсена) або на рідкому середовищі (наприклад, в системі ВАСТЕС).

Тест не підходить для детекції мікобактерій з прямого матеріалу пацієнтів!

1. а). при роботі з бактеріями, які виростили на щільному середовищі необхідно зняти колонії аплікатором і перенести їх в 300 мкл деіонізованої води в пробірку з кришкою, що загвинчується;

б). при роботі з бактеріями, які виростили в рідкому середовищі необхідно відібрати 1 мл, центрифугувати протягом 15 хв. при 10000 g в центрифугі з аерозоль-непроникним ротором. Супернатант злити, а осад з бактеріями ресуспендувати на вортексі в 300 мкл деіонізованої води в пробірці з кришкою, що загвинчується.

2. Інкубувати пробірки з бактеріями на водяній бані 20 хв. при 95 °С.

3. Обробити пробу в ультразвуковій бані протягом 15 хв.

4. Центрифугувати пробу на максимальній швидкості 5 хв., та використовувати для ПЛР 5,0 мкл супернатанту. Якщо передбачається більш тривале зберігання, розчин ДНК необхідно перенести в нову пробірку.

Можна використовувати інші методи виділення ДНК, які дозволяють отримати із бактерій ДНК для ампліфікації.

Ампліфікація

Готувати ампліфікаційну суміш (по 45,0 мкл) слід в чистій від ДНК кімнаті. Зразки ДНК слід вносити в пробірки із сумішшю також в окремому приміщенні.

Мікс на одну пробірку:

– 35,0 мкл PNM;

– 5,0 мкл 10-кратного полімеразного буфера для інкубації;

– X мкл розчину MgCl₂;

– 1–2 одиниці термостабільної ДНК-полімерази;

– У мкл води для доведення об'єму до 45,0 мкл;

– Додати 5,0 мкл розчину ДНК (20,0–100 нг ДНК) для отримання кінцевого об'єму 50,0 мкл.

В залежності від системи фермент/буфер, що використовується, оптимальна концентрація MgCl₂ може коливатися між 1,5 та 2,5 мМ. Зверніть увагу, що деякі інкубаційні буфери вже містять MgCl₂.

При використанні HotStar ДНК-полімерази від Qiagen на один зразок необхідно наступні кількості реагентів:

– 35,0 мкл PNM;

– 5,0 мкл 10-кратного ПЛР буфера для HotStar Tag (містить 15 мМ MgCl₂);

– 2,0 мкл 25 мМ розчину MgCl₂;

- 0,2 мкл (1,0 Од) HotStar Tag;
- 3,0 мкл води (для молекулярно-біологічних досліджень);
- 5,0 мкл розчину ДНК.

Кінцева концентрація $MgCl_2$ в цій ампліфікаційній суміші складає 2,5 мМ.

Визначити кількість зразків для ампліфікації (кількість дослідних проб + контрольні зразки). Проба контролю контамінації (негативний контроль) містить 5,0 мкл води замість розчину ДНК. Підготувати мастер-мікс, що містить всі реагенти, за винятком розчину ДНК, і добре перемішати (*не на вортексі!*).

Аліквотувати по 45 мкл в кожен підготовлену ПЛР-пробірку.

Програма ампліфікації:

15 хв. 95 °С 1 цикл

30 сек. 95 °С } 10 циклів
2 хв. 58 °С }

25 сек. 95 °С }
40 сек. 53 °С } 20 циклів
40 сек. 70 °С }

8 хв. 70 °С 1 цикл

Продукти ампліфікації можуть зберігатися при температурі від +8 до +20 °С.

Гібридизація

Підготовка

Попередньо нагрійте водяну баню з шейкером/TwinCubator до 45 °С, максимально допустиме відхилення від заданої температури $\pm 1^\circ\text{C}$. Попередньо підігрійте розчин НУВ та STR до 37–45 °С перед використанням. Реагенти мають бути вільні від осаду. Нагрійте всі інші реагенти, за виключенням CON-C та SUB-C, до кімнатної температури. За допомогою відповідного дозуючого приладдя, розчиніть концентрат кон'югату (CON-C, помаранчевий) та концентрат субстрату (SUB-C, жовтий) у співвідношенні 1:100 у відповідних буферах (CON-C у CON-D та SUB-C у SUB-D) у потрібній кількості. Добре перемішайте та доведіть до кімнатної температури. Із розрахунку на кожен смужку: додайте 10 мкл концентрату до 1 мл відповідного буферу. Розводьте CON-C перед кожним використанням. Розчинений SUB-D стабільний протягом 4-х тижнів за умов зберігання при кімнатній температурі в захищеному від світла місці.

1. Розлийте по 20,0 мкл розчину для денатурації (DEN, блакитного кольору) в куток кожної лунки

2. Додайте 20,0 мкл продукту ампліфікації, перемішати піпетуванням та інкубувати 5,0 хв. при кімнатній температурі.

Тим часом, заберіть смужку з пробірки за допомогою пінцету та помітьте його олівцем на зворотному боці в забарвленому місці. При роботі зі смужками завжди використовувати рукавички.

3. Обережно додайте до кожної лунки 1,0 мл попередньо нагрітого Буферу для гібридизації (НУВ, зелений). Обережно перемішуйте лоток до отримання гомогенного забарвлення.

Будьте обережні, щоб не пролити розчин в сусідні лунки.

4. Помістіть смужки в лунки.

Смужки мають бути повністю занурені в розчин та розміщені лицьовою стороною (може бути розрізнена за кольоровим маркером у на нижньому краї) вгору. Перегорніть стрічку, що зайняла хибне положення при зануренні за допомогою пінцету. Обережно промивайте пінцет після кожної операції для запобігання забруднення. Це правило має бути обов'язкове для всіх наступних кроків.

5. Помістіть плашку на вібруючу водяну баню для перемішування/ TwinCubator та інкубуйте 30 хв. при 45 °С.

Доведіть частоту вібрації у водяній бані до необхідного для досягнення постійного та ретельного перемішування. Для досягнення адекватної передачі тепла, плашка має бути занурена у воду щонайменше на третину товщини.

6. Повністю видаліть Буфер для гібридизації .

Наприклад, використовуючи пастерівські піпетки, що під'єднані до вакуумного насосу.

7. Додайте 1,0 мл буферу для жорсткої відмивки (STR, червоний) до кожної лунки та інкубуйте 15 хв. при 45 °С у водяній бані з шейкером/ TwinCubator.

8. Працюйте при кімнатній температурі у всіх наступних кроках

Повністю видаліть буфер для жорсткої відмивки.

Вилийте відмиваючий буфер в широкий контейнер та видаліть всі остаточні рідини шляхом перегортання плашки та обережним промокуванням її адсорбуючим папером. Ця процедура застосовується для всіх інших стадій промивання.

9. Промийте кожну смужку один раз з 1,0 мл Відмиваючого розчину (RIN) на вібруючій платформі/ TwinCubator (випийте RIN після інкубації).

10. Додайте 1,0 мл розчиненого кон'югату (дивіться вище) до кожної смужки та інкубуйте 30 хв. на вібруючій платформі/ TwinCubator.

11. Видаліть розчин та промийте кожну смужку двічі протягом 1 хв. у Відмиваючому розчині та 1 хв. в дистильованій воді (тобто за допомогою струї з пластикової пляшки) на вібруючій платформі/ TwinCubator (видаляйте розчин кожний раз).

Переконайтесь, що видалені будь-які залишки води після останнього промивання.

12. Додайте 1,0 мл розведеного субстрату (дивіться вище) до кожної смужки та інкубуйте в захищених від світла умовах без вібрації.

В залежності від умов тестування (кімнатної температури), час інкубації субстрату може змінюватись від 3-х до 15 хв. Збільшений час інкубації субстрату призведе до збільшення фонового сигналу та може вплинути на інтерпретацію результатів.

13. Зупиніть реакцію швидким подвійним відмиванням дистильованою водою

14. За допомогою пінцету дістаньте смужки з плашки та висушіть їх між двох шарів адсорбуючого паперу.

Оцінка та інтерпретація результатів

Смужки необхідно наклеїти на бланк-шаблон і зберігати в захищеному від світла місці. Еталон для оцінки додається до набору.

**Мінімальний набір тест-штамів для контролю якості
живильних середовищ та лабораторних процедур
(в залежності від видів досліджень, на які атестована лабораторія)**

Назва тест-штаму	Призначення	Примітки
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv ATCC 27294	Для контролю: <ul style="list-style-type: none"> • ростових властивостей середовища Левенштейна-Єнсена, бульйону Міддлбука 7Н9; • якості деконтамінації; • культуральних та біохімічних тестів ідентифікації. 	Позитивний контроль
	• ростових властивостей Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм або ПНБК	Негативний контроль
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	Для контролю ростових властивостей бульйону Міддлбука 7Н9	Позитивний контроль
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	Для контролю ростових властивостей бульйону Міддлбука 7Н9, якості деконтамінації	Позитивний контроль
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Для контролю ростових властивостей кров'яного агару	Позитивний контроль
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Для контролю ростових властивостей кров'яного агару	Негативний контроль