

ПРИКАЗ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

22 марта 2013 г. № 377

Об утверждении Руководства по лабораторной диагностике туберкулеза

На основании [Положения](#) о Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 28 октября 2011 г. № 1446, и для улучшения лабораторной диагностики туберкулеза ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Утвердить Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза (далее - Руководство) согласно [приложению](#).

2. Начальникам управлений здравоохранения облисполкомов, председателю комитета по здравоохранению Мингорисполкома, руководителям организаций здравоохранения республиканского подчинения обеспечить выполнение Руководства согласно приложению.

3. Контроль за исполнением настоящего приказа возложить на начальника Главного управления организации медицинской помощи Министерства здравоохранения Республики Беларусь Рыжко И.Н.

Первый заместитель Министра**Д.Л.Пиневич**

Приложение
к приказу
Министерства
здравоохранения
Республики Беларусь
22.03.2013 № 377

РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Авторы: О.М. Залуцкая, Е.Р. Сагальчик, Л.К. Суркова

Рецензенты: Г. Шкендерс, С. Хоффнер

МИНСК, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

1. ОБОРУДОВАНИЕ ЛАБОРАТОРИИ

1.1. Общие положения

1.2. Основное лабораторное оборудование

2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИЯХ, ПРОВОДЯЩИХ ДИАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛЕЗА

2.1. Общие положения

2.2. Риск инфицирования при выполнении исследований на туберкулез

2.3. Оценка риска

2.4. Классификация лабораторий, проводящих диагностику туберкулеза

2.5. Основные меры биобезопасности в лабораториях с умеренным и высоким риском ТБ

2.6. Мероприятия, проводимые при авариях во время работы с инфекционным материалом

2.7. Транспортировка инфекционных и потенциально инфекционных материалов

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ

3.1. Общие положения

3.2. Флаконы для сбора материала

3.3. Виды диагностического материала

3.4. Консервация диагностического материала

3.5. Прием и распаковка диагностического материала

4. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ

4.1. Общие положения

4.2. Приготовление мазков

4.3. Фиксация мазков

4.4. Окраска мазков по методу Циля-Нильсена

4.5. Окраска мазков флуорохромными красителями

[4.6.](#) Внутренний контроль качества микроскопического исследования на КУБ

[5.](#) СТАНДАРТНЫЕ МЕТОДЫ РАЗЖИЖЕНИЯ И ДЕКОНТАМИНАЦИИ

[5.1.](#) Общие положения

[5.2.](#) Обработка мокроты

[5.3.](#) Обработка других видов диагностического материала

[5.4.](#) Внутренний контроль качества деконтаминации

[6.](#) ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

[6.1.](#) Общие положения

[6.2.](#) Приготовление яичных сред

[6.3.](#) Внутренний контроль качества при приготовлении питательных сред

[7.](#) ПОСЕВ И ИНКУБАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ОЦЕНКА И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

[7.1.](#) Общие положения

[7.2.](#) Процедура посева

[7.3.](#) Инкубация посевов

[7.4.](#) Оценка и учет результата посева

[7.5.](#) Внутренний контроль качества посева

[8.](#) ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

[8.1.](#) Общие положения

[8.2.](#) Характеристика комплекса *Mycobacterium tuberculosis*

[8.3.](#) Продукция пигмента

[8.4.](#) Биохимические методы идентификации микобактерий

[8.5.](#) Культуральные методы идентификации микобактерий

[8.6.](#) Идентификация микобактерий комплекса *M. tuberculosis* с использованием культуральных и биохимических методов

[8.7.](#) Иммунохроматографическая идентификация комплекса *M. tuberculosis*

[8.8.](#) Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий

[8.9.](#) Хранение выделенных штаммов микобактерий

[9.](#) ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

ТУБЕРКУЛЕЗА

[9.1.](#) Общие положения

[9.2.](#) Выбор ПТЛС для определения лекарственной чувствительности МБТ

[9.3.](#) Критические концентрации ПТЛС

[9.4.](#) Расчет навески ПТЛС

[9.5.](#) Приготовление рабочих растворов ПТЛС

[9.6.](#) Приготовление и хранение среды Левенштейна-Йенсена с ПТЛС

[9.7.](#) Приготовление суспензии микобактерий, ее стандартизация, инокуляция, инкубирование посевов

[9.8.](#) Приготовление стандартов мутности по McFarland

[9.9.](#) Учет, интерпретация и регистрация результатов

[9.10.](#) Внутренний контроль качества при определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

[10.](#) АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

[10.1.](#) Детекция микобактерий

[10.2.](#) Внутренний контроль качества питательной среды для детекции микобактерий с использованием автоматизированной системы

[10.3.](#) Определение лекарственной чувствительности микобактерий с использованием автоматизированной системы

[10.4.](#) Внутренний контроль качества определения лекарственной чувствительности микобактерий с использованием автоматизированной системы

[11.](#) МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

[11.1.](#) Общие положения

[11.2.](#) Принцип ПЦР

[11.3.](#) Детекция МБТ

[11.4.](#) Определение лекарственной чувствительности МБТ

[11.5.](#) Xpert MTB/RIF

[11.6.](#) Алгоритм диагностики лекарственной устойчивости МБТ с использованием молекулярно-генетических методов

[12.](#) КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА, ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА И ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

[12.1.](#) Общие положения

[12.2.](#) Внешняя оценка качества микроскопического исследования на КУБ

[12.3.](#) Внешняя оценка качества культуральных исследований, идентификации микобактерий и детекции МБТ с использованием амплификационных методов

[12.4.](#) Внешняя оценка качества тестирования лекарственной чувствительности МБТ

[13.](#) ИНДИКАТОРЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИЙ, ПРОВОДЯЩИХ ДИАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛЕЗА

[13.1.](#) Общие положения

[13.2.](#) Микроскопическое исследование на КУБ

[13.3.](#) Культуральное исследование на туберкулез

[13.4.](#) Основные индикаторы, используемые для выявления существенных проблем в лаборатории

[Приложение 1.](#) Формы протоколов для внешней оценки качества микроскопического исследования на КУБ

[Приложение 2.](#) Протокол мониторингового визита в бактериологическую лабораторию

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАЛЖ	-	бронхоальвеолярная лаважная жидкость
БББ	-	бокс биологической безопасности
ВЛО	-	высоко ложноотрицательная ошибка
ВЛП	-	высоко ложноположительная ошибка
ВОК	-	внешняя оценка качества
ДМСО	-	диметилсульфоксид
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИП	-	истинно положительный результат
КУБ	-	кислотоустойчивые бактерии
КОЕ	-	колониеобразующая единица
МБТ	-	микобактерии туберкулеза
МЛУ	-	множественная лекарственная устойчивость
НЕРА	-	High Efficiency Particulate Air - высокоэффективная задержка частиц
НЛО	-	низко ложноотрицательная ошибка
НЛП	-	низко ложноположительная ошибка
НТМ	-	нетуберкулезные микобактерии
ООК	-	ошибка определения количества
ОР	-	объем растворителя
ОСЦ	-	относительная сила центрифугирования
ПК	-	поправочный коэффициент
ПНБ	-	пара-нитробензойная кислота
ПТЛС	-	противотуберкулезное лекарственное средство
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция

РРЛ	-	республиканская референс-лаборатория
СИЗ	-	средства индивидуальной защиты
СРЛ	-	супранациональная референс-лаборатория
ТБ	-	туберкулез
ТВИ	-	термовременной индикатор
ТЛЧ	-	тестирование лекарственной чувствительности
УФ	-	ультрафиолет
ШЛУ	-	широкая лекарственная устойчивость
Am	-	амикацин
Sm	-	капреомицин
Cs	-	цикloserин
E	-	этамбутол
Eto	-	этионамид
Fq	-	фторхинолоны
H	-	изониазид
HEPA	-	High Efficiency Particulate Air - высокоэффективная задержка частиц
HD PP	-	полипропилен высокой плотности
Km	-	канамицин
Lfx	-	левофлоксацин
LPA	-	Line Probe Assay, методы, основанные на гибридизации с линейными зондами
MGIT	-	Mycobacteria Growth Indicator Tube
Mfx	-	моксифлоксацин
NALC	-	N-ацетил-l-цистеин
Ofx	-	офлоксацин
PAS	-	ПАСК
Pto	-	протионамид
PZA	-	пиразинамид
R	-	рифампицин
S	-	стрептомицин
ULPA	-	Ultra Low Penetration Air - задержка сверхлегких частиц

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Беларусь в последние годы характеризуется нарастанием распространенности туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (М/ШЛУ-ТБ), что является серьезной угрозой для борьбы с туберкулезом в связи с трудностями в диагностике и лечении М/ШЛУ-ТБ и высокой стоимостью химиотерапии.

Сложность эпидемиологической ситуации обуславливает высокие требования к качеству лабораторной диагностики туберкулеза, стандартизации исследований, использованию современных диагностических технологий (автоматизированные диагностические системы, молекулярно-генетические исследования), обеспечению биологической безопасности персонала лабораторий, проводящих исследования на туберкулез. Укрепление лабораторной службы, развитие кадровых ресурсов, создание

постоянно функционирующей системы внутреннего и внешнего контроля качества и регулярное обучение лабораторного персонала в современных условиях являются настоящей необходимостью.

Данное руководство отражает современные представления о лабораторной диагностике туберкулеза, составлено с учетом мнений ведущих международных экспертов и должно выполняться всеми противотуберкулезными организациями Республики Беларусь.

1. ОБОРУДОВАНИЕ ЛАБОРАТОРИИ

1.1. Общие положения

Лабораторное оборудование должно предотвращать или ограничивать контакт между оператором и инфекционным материалом; должно быть изготовлено из материалов, которые являются непроницаемыми для жидкостей и устойчивыми к коррозии; поверхности должны быть гладкими и не иметь острых краев и неконтролируемо движущихся частей. Оборудование должно быть разработано, изготовлено и установлено так, чтобы обеспечивать свободный доступ, простоту эксплуатации, обслуживания, очистки, обеззараживания и сертификационных испытаний.

Приборы, оборудование и средства измерений, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, должны подвергаться метрологическому контролю в установленные сроки, иметь технические паспорта. На каждый прибор должны быть разработаны правила (инструкции) по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности.

1.2 Основное лабораторное оборудование

1.2.1. Бокс биологической безопасности

Основным оборудованием для обеспечения безопасности работы в бактериологической лаборатории, которая проводит исследования на микобактерии туберкулеза, является бокс биологической безопасности (БББ), поддерживаемый в рабочем состоянии и безотказно функционирующий.

Все работы с потенциально опасным биологическим материалом следует проводить в БББ.

Главный компонент бокса биологической безопасности - современные высокоэффективные фильтры. Существует две основных модели таких фильтров:

- HEPA-фильтры (High Efficiency Particulate Air - высокоэффективная задержка

частиц), обеспечивающие эффективность очистки не менее 99,95 % для частиц размером 0,3 мкм.

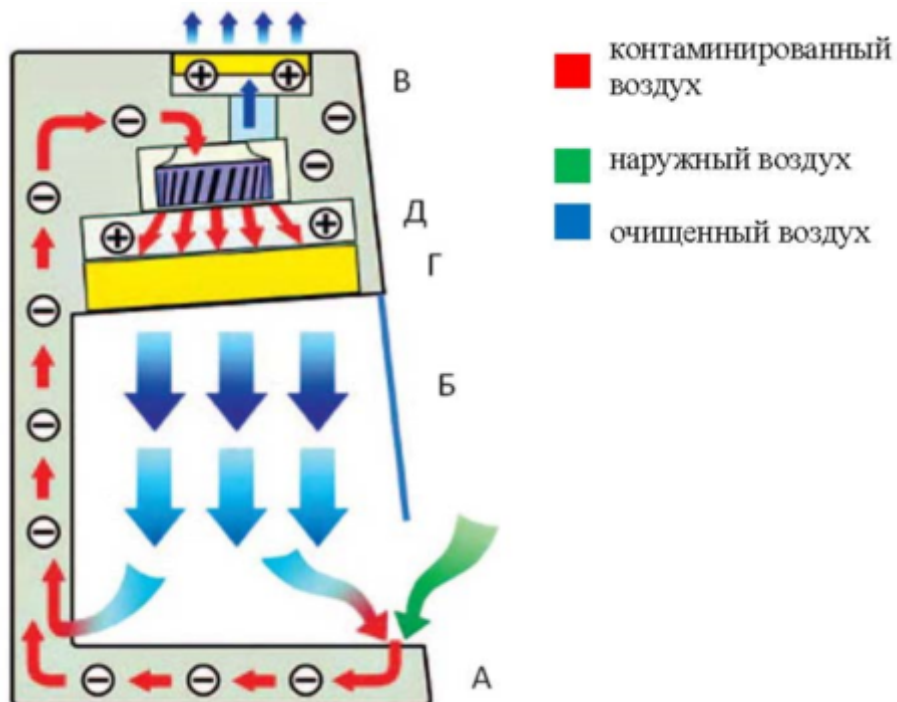
- ULPA-фильтры (Ultra Low Penetration Air - задержка сверхлегких частиц), обеспечивающие эффективность очистки не менее 99,9999 % для частиц размером до 0,12 мкм.

Функционирование каждого БББ сертифицируется в соответствии с международным стандартом EN 12469:2000 и спецификациями производителей во время установки, после любого перемещения, ремонта и замены фильтров, кроме того, БББ должны сертифицироваться ежегодно.

Оценка эффективности БББ включает тесты на целостность, утечки в HEPA(ULPA)-фильтрах, скоростные характеристики нисходящего потока, скорость в передней части, показатель отрицательного давления/вентиляции, проверку воздушного потока с помощью дыма, а также проверку сигнализации и соединений. Дополнительно могут тестироваться электропроводка, интенсивность освещения, интенсивность ультрафиолетового излучения, а также уровень шума и вибрации. Все эти тесты должны выполняться квалифицированными специалистами с использованием специального оборудования.

В лабораториях, осуществляющих культуральные исследования на туберкулез, рекомендуется применение БББ класса II типа A2.

БББ II класса оснащены двумя HEPA(ULPA)-фильтрами и обеспечивают защиту рабочей зоны, персонала и окружающей среды. В БББ II класса действуют 2 воздушных потока: фронтальный, втягивающий воздух из помещения, и внутренний вертикальный ниспадающий, обеспечивающий движение воздушного потока над рабочей зоной. Воздух поступает в БББ II класса через переднюю решетку, проходит через входной HEPA(ULPA)-фильтр. Любые аэрозольные частицы, образовавшиеся на рабочей поверхности, захватываются нисходящим потоком воздуха и выводятся через переднюю или заднюю решетки в пространство между входным и выходным фильтром, расположенным в верхней части корпуса, где создается зона повышенного давления. 60-70 % воздуха из зоны повышенного давления рециркулирует в рабочую зону в виде нисходящего потока, 30-40 % воздуха проходит очистку HEPA(ULPA)-фильтром и выходит наружу в помещение лаборатории или за пределы здания через вытяжной зонтик, соединенный с изолированной системой вентиляции лаборатории, но не через общую систему вентиляции здания.



А - передняя решетка, Б - передняя рама, В - выходной НЕРА-фильтр, Г - входной НЕРА-фильтр, Д - зона повышенного давления

Рисунок 1.1 - Схема БББ класса II типа А2

НЕРА(ULPA)-фильтры эффективно очищают выходящий воздух от различных аэрозолей, но они не задерживают химические испарения. Если в ходе работы наряду с биологически опасными агентами используются токсические химические вещества, эти БББ использовать не рекомендуется.

Скорость потока воздуха, поступающего через открытую переднюю часть в БББ II класса, должна быть не менее 0,38 м/сек. При такой скорости постоянство потока воздуха нестабильно и легко может быть нарушено другими потоками воздуха, создаваемыми людьми, проходящими около БББ, окнами, заслонками регулирования подачи воздуха, оборудованием (центрифуги), а также открывающимися и закрывающимися дверьми.

БББ должен быть установлен в месте, удаленном от проходов и разного рода воздушных потоков, от входных дверей и вентиляционных систем (рис. 1.2).



Рисунок 1.2 - Примеры правильной и неправильной расстановки БББ

Расположения А, Е и F выбраны правильно, поскольку в этих зонах нет сквозняка и движения людей рядом с БББ.

Расположения В, С и D выбраны неправильно, поскольку в зоне В возможен сквозняк, а в зонах С и D - сквозняк и движение людей рядом с БББ.

По возможности следует оставить по 30 см свободного пространства сзади и по бокам БББ, чтобы иметь возможность легкого доступа для технического обслуживания. Пространство в 30–35 см над боксом может потребоваться для точного измерения скорости прохождения воздуха через выпускной фильтр и для замены этого фильтра. Запрещается расположение БББ в одном небольшом помещении друг против друга. Запрещается установка кондиционеров и сплит-систем напротив рабочей зоны БББ.

Регулярные проверки (ежеквартальные или чаще, в зависимости от степени запыленности атмосферы) воздушного потока (скорость и направление воздуха) должны производиться с использованием специально предназначенного для этого прибора. Существенное снижение скорости воздушного потока говорит о возможном засорении фильтра и необходимости его замены.

БББ оборудуются одним или двумя видами сигнализации: оконная сигнализация (БББ с подъемными рамами) и сигнализация воздушного потока. Тревожный сигнал оконной сигнализации означает, что оператор установил подъемную раму в неправильное положение. В этом случае следует установить подъемную раму в правильное положение. Сигнализация воздушного потока свидетельствует о прекращении нормального режима потока воздуха в БББ, что представляет собой опасность для оператора или препарата. Если будет подан тревожный сигнал о нарушении воздушного потока, работу следует немедленно прекратить и уведомить руководителя лаборатории. Подробная информация о дальнейших действиях должна

содержаться в инструкции завода-изготовителя. Не допускается отключение дифференциальных манометров или звуковой сигнализации, встроенных в БББ для контроля состояния HEPA-фильтров.

При неправильной эксплуатации БББ (работа с высоко поднятым защитным стеклом и сильно загрязненным HEPA(ULPA)-фильтром) данный вид оборудования теряет свои защитные функции, что может привести к инфицированию персонала.

Необходимо обеспечить бесперебойное электропитание БББ: при отключении электроэнергии в процессе работы инфекционные аэрозольные частицы не будут оседать на HEPA(ULPA)-фильтрах, а будут накапливаться в рабочей зоне и в случае изменения направления потока воздуха (на оператора) создавать значительную опасность для его здоровья. Отключение электропитания БББ в процессе проведения в нем работ должно рассматриваться как аварийная ситуация. Рекомендуется использовать источник бесперебойного питания.

Все ремонтные работы в БББ должны производиться квалифицированным персоналом. О любой неисправности в работе БББ следует сообщать руководителю лаборатории. Начинать работу в БББ можно только после устранения неисправности.

Работа в неисправном БББ категорически запрещена, так как является потенциально опасной для здоровья сотрудников лаборатории.

Оснащение и использование УФ-излучателей в БББ II класса не обязательно.

Обслуживание БББ

В случае любой проблемы или сбоя в работе БББ не должен использоваться до тех пор, пока проблема не будет установлена и устранена.

Ежедневное обслуживание

Необходимо ежедневно осматривать БББ на наличие внешних повреждений.

Каждый раз при использовании БББ следует проводить обработку рабочей поверхности до и после работы с инфекционным материалом.

Еженедельное обслуживание

Проверка стерильности рабочей зоны БББ

Помещают открытую чашку Петри с кровяным агаром, промаркированную с указанием даты и номера БББ, в рабочую зону включенного БББ минимум на 30 мин,

после чего инкубируют ее при 36 ± 1 °С в течение 48 часов. В случае контаминации питательной среды (рост бактерий, грибов) проводят генеральную уборку БББ.

Обработка УФ-ламп

Если БББ оснащен УФ-лампами, следует очистить УФ-лампы марлевым тампоном, смоченным 70 % спиртом. БББ должен быть при этом отключен от электросети. Необходимо всегда надевать перчатки, никогда не следует касаться лампы голыми руками.

Ежемесячное обслуживание

Качественная проверка

Качественную проверку БББ выполняют с использованием источника дыма по всему периметру открытой передней панели БББ. Такая проверка является показателем направления воздушного потока, а не его скорости и проводится для того, чтобы определить:

- направлен ли внутрь поток воздуха по всему периметру открытой передней панели;
- есть ли утечка дыма наружу через уплотнительную прокладку стекла и боковые уплотнители.

Кроме того, в БББ II класса дымовой тест позволяет определить:

- направлен ли поток воздуха в рабочей зоне вниз, без мертвых зон или утечек;
- проходит ли воздух, поступающий снаружи, над рабочей поверхностью.

Измерение воздушного потока

Тесты пользователя ограничены измерением потока воздуха в БББ, которое должно проводиться с помощью анемометра.

Прибор должен быть доведен до комнатной температуры перед обнулением разности потенциалов, потому что измеряется и преобразуется в скорость воздушного потока разница температур между двумя термисторами (один защищенный и один охлаждаемый потоком воздуха).

Воздушный поток в БББ необходимо измерять не менее чем в 5 точках сечения рабочего окна, после чего вычисляется среднее значение. Ни в одном показании прибора расхождения не должны превышать 0,1 м/с. Наличие подобных расхождений свидетельствует о неравномерности потока и турбулентности внутри БББ.

Для определения скорости воздушного потока через большие сечения, как в БББ, должны быть проведены измерения в нескольких точках, расположенных по всей плоскости. Датчик должен быть направлен (в большинстве инструментов есть стрелка)

в соответствии с потоком воздуха. Наконечник датчика во время измерения должен находиться в устойчивом положении.

Измерение в любом месте должно проводиться более 60 секунд.

Среднее значение измерений принимается за среднюю скорость потока воздуха.

Ежеквартальное обслуживание

Генеральная уборка БББ должна проводиться ежеквартально при условии положительного тестирования на стерильность.

1.2.2. Центрифуга

Эффективность и безопасность предпосевной обработки во многом зависят от центрифуг, применяемых для осаждения микобактерий.

В бактериологических лабораториях, проводящих исследования на микобактерии туберкулеза, рекомендуется использовать напольные или настольные центрифуги с охлаждением, с крышкой и ротором, в который помещены герметично закрывающиеся центрифужные стаканы или специальные контейнеры, препятствующие образованию аэрозоля.

Центрифужные стаканы должны иметь адаптеры для центрифужных пробирок объемом 50 мл. Центрифуга должна быть оборудована защитным устройством, которое препятствует открыванию крышки до тех пор, пока не произойдет полная остановка ротора.

Относительная сила центрифугирования (ОСЦ, RCF) – это величина, которая характеризует интенсивность осаждения (седиментации) и зависит от скорости вращения ротора (об/мин) и расстояния от оси вращения до точки, в которой производится измерение этой силы, т.е. для одинаковой скорости вращения ОСЦ различна для роторов разных размеров и типов.

Для характеристики ОСЦ используют величину ускорения g , например 3000 g . Для расчета ОСЦ используют формулу $ОСЦ = 1,12 R_{max} (N : 1000)^2$, где R_{max} – это радиус вращения (расстояние от оси вращения до дна центрифужной пробирки в мм), N (об/мин, грп) – скорость вращения ротора.

Скорость вращения ротора, необходимую для получения требуемой ОСЦ, определяют по формуле

$$N = 1000 \times \sqrt{\frac{ОСЦ}{1,12 R_{max}}}$$

Если величина ОСЦ будет недостаточной, многие микобактерии после центрифугирования останутся в надосадочной жидкости и будут удалены вместе с ней.

Для получения наилучшего результата бактериологического исследования необходимо добиться осаждения 95 % бактериальных клеток, для чего необходимо проводить центрифугирование с ОСЦ 3000 g или больше.

Современные модели центрифуг позволяют выбирать параметры ОСЦ (RCF) или скорость вращения ротора (об/мин, грм).

Определить ОСЦ можно с помощью номограммы (рис. 1.3). Для этого необходимо с помощью линейки совместить значения радиуса (R) и скорости вращения ротора (N) на соответствующих шкалах номограммы и на шкале ОСЦ установить значение g.

Рекомендуется использовать центрифуги с охлаждением. Для снижения нагревания образцов допустимо использование охлажденных деконтаминирующих растворов.

При установке центрифуги необходимо предусмотреть достаточное пространство вокруг нее, чтобы обеспечить нормальный обмен воздуха и снизить вероятность ее перегрева. Центрифуга должна быть установлена на устойчивой строго горизонтальной поверхности. Центрифуги должны устанавливаться на таком уровне, чтобы оператор мог видеть внутреннюю часть камеры и правильно установить центрифужные стаканы.

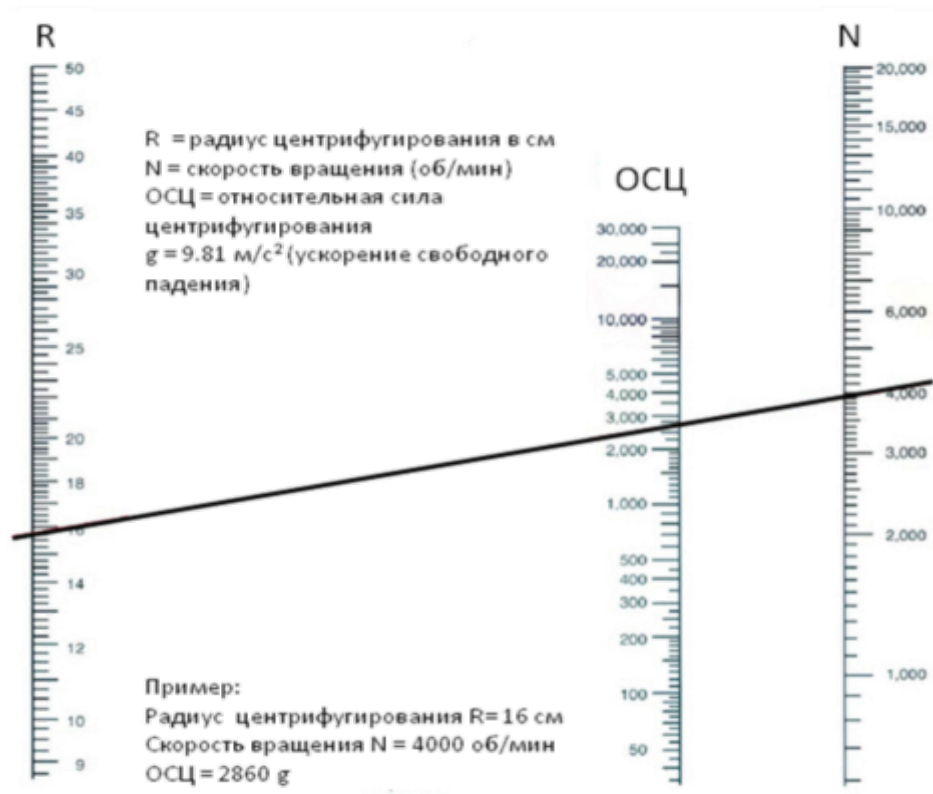


Рисунок 1.3 – Номограмма, выражающая зависимость ОСЦ от скорости вращения и радиуса ротора

Обслуживание центрифуги

Установка

Начальная установка, калибровка и сертификация должна проводиться сервисным инженером в соответствии со спецификацией производителя.

Ежедневное обслуживание

Ежедневно после работы следует обрабатывать гнезда ротора и внутреннюю поверхность центрифуги дезинфицирующим раствором.

Центрифуга не должна использоваться, если внутренняя часть нагрета, если имеют место необычные шумы или вибрация или если обнаружены повреждение или коррозия частей центрифуги. В этих случаях необходимо вызвать сервисного инженера. Большинство вибраций происходит из-за неправильного уравнивания центрифуги и может быть устранено точным уравниванием центрифугируемых объемов.

Ежемесячное обслуживание

Ежемесячно следует обрабатывать место размещения центрифуги, роторную камеру, роторы и принадлежности ротора с использованием нейтрального моющего

агента.

При наличии в комплекте силиконовой смазки следует ежемесячно смазывать место сцепления ротора с центрифужными стаканами.

Ежегодное обслуживание

Обслуживание центрифуги должно проводиться ежегодно сервисным инженером.

1.2.3. Термостат

Инкубацию посевов производят при температуре 35–37 °С. Существуют лабораторные термостаты различных размеров. Как правило, лучше всего приобрести самую большую модель, какую можно без проблем разместить в лаборатории и на какую имеются средства. В термостатах с маленьким объемом при открывании дверцы происходят резкие колебания температуры воздуха. Для обеспечения правильной циркуляции воздуха внутри термостата следует не перегружать его и использовать не сплошные, а решетчатые полки. Следует поддерживать постоянную температуру, избегая ненужного открывания термостата.

В лабораториях, выполняющих значительное количество культуральных исследований, целесообразно использовать термостатную комнату. К нагревательному элементу термостатной комнаты должен быть подключен чувствительный датчик. Рекомендуется иметь два датчика: один на 37 °С – для стабильного поддержания необходимой рабочей температуры, и второй (запасной) на 39 °С – для предупреждения перегрева помещения и гибели культур в случае выхода из строя первого датчика.

Нецелесообразно использовать деревянные полки и перегородки. При высокой влажности воздуха на них могут расти плесневые грибы. Более предпочтительны металлические или пластиковые полки. Между полками и стенами помещения следует оставить зазоры для обеспечения хорошей циркуляции воздуха.

Обслуживание термостата

Ежедневные проверки температуры выполняют с использованием термометров. Рекомендуется использовать термометры с фиксацией минимальной, актуальной и максимальной температур, чтобы убедиться, что внутренняя температура в термостате постоянная и составляет 36 ± 1 °С. Периодическая поверка термометров проводится при эксплуатации и хранении один раз в год. Показания проверяют ежедневно при первом открывании термостата, записывают в журнале. Если термостат имеет индикатор температуры, то эти показания также фиксируют в журнале.

Ремонтные работы должны выполняться квалифицированным специалистом.

Калибровка

Температура термометра или встроенного датчика должна быть откалибрована:

- перед использованием;
- после обнаружения и исправления изменений температуры;
- после сбоя питания;
- после дезинфекции.

Процесс калибровки

Убедитесь, что дверь закрыта и что термостат включен. Установите необходимую температуру с помощью регулятора температуры и оставьте термостат для работы в течение 1 часа. Поместите термометр в центре термостата на удалении от нагревательного элемента. Измерьте показания термометра через 30 минут, если температура не 36 ± 1 °C, проведите необходимую настройку. Повторяйте эту процедуру через каждые 30 минут, пока не будет достигнута нужная температура. Продолжайте снимать показания до получения двух последовательных результатов измерения температуры 36 ± 1 °C с интервалом 30 минут. Запишите показания в журнале контроля температуры термостата. Термостат готов к использованию только после калибровки температуры.

1.2.4. Микроскоп

Для исследования мазков, окрашенных по методу Циля-Нильсена, следует использовать световой бинокулярный микроскоп с объективом (100x) с масляной иммерсией и окуляром (10x) (общее увеличение 1000x).

Для флуоресцентной микроскопии применяются специальные оптические устройства и микроскопы, частью которых является источник ультрафиолетовых лучей (светодиоды (LED), галогеновая или ртутная лампа), система фильтров к нему и специальные объективы.

Обслуживание микроскопа

Ежедневное обслуживание

Современные микроскопы не нуждаются в специальном обслуживании, но при их использовании требуется тщательный уход, регулярная чистка, защита от пыли и грибов.

Каждый день перед использованием следует проверять микроскоп на наличие сломанных или поврежденных частей и убедиться, что линзы, зеркала и другие светопроводящие поверхности чистые.

Проверяют линзы на присутствие грязи или песчинок; они могут легко поцарапаться, если их протирать, не сдув предварительно пыль и песчинки. Сначала сдувают или смахивают кисточкой песчинки с поверхности линзы, затем протирают линзы чистой сухой салфеткой для линз. Если после этого не удастся получить ясное изображение, моют линзы салфеткой для линз, смоченной моющей жидкостью,

предоставляемой изготовителем, или смесью этилового эфира и спирта в соотношении 80/20, или 70 % спиртом.

Лучше не снимать окуляры или объективы, а чистить только их внешние поверхности. Для надлежащей очистки нижних линз конденсор следует снимать. Устанавливая конденсор, следует убедиться, что предметные стекла при перемещении не царапают его верхнюю поверхность, когда конденсор поднят в максимальное положение.

В конце каждого дня удаляют иммерсионное масло с объектива 100x, используя салфетку для линз.

Если микроскоп не хранится в коробке, накрывают его полностью пластиковым чехлом.

Ежемесячное обслуживание

Сначала сдувают или смахивают кисточкой песчинки с линз перед чисткой микроскопа. Затем моют линзы салфеткой для линз, смоченной в чистящей жидкости (не ксилол). Снимают держатель стекол с механического столика и моют его таким же образом. Протирают корпус микроскопа мягкой салфеткой, смоченной водой.

Делают отметку об обслуживании микроскопа в журнале.

Ежеквартальное обслуживание

В условиях повышенной влажности (более 60 %) микроскопу может повредить рост грибов, который появляется почти исключительно на призмах в бинокулярной трубке, приводя к мутности и затемнению поля зрения. Следует проверять микроскоп на наличие роста грибов периодически и каждый раз, когда поле зрения становится мутным. Для этого следует включить источник света микроскопа, установить объектив 10x, снять окуляры и посмотреть в бинокулярную трубку.

Удалять рост грибов должен обученный специалист. Бинокулярная трубка должна быть открыта, но призмы должны оставаться на месте, как установлено производителем, поскольку их снятие испортит микроскоп.

Ежегодное обслуживание

Полный осмотр и обслуживание компетентным сервисным инженером.

Обнаружение неисправностей

Можно починить неисправный микроскоп, заменяя сменные части (объективы, окуляры, лампы, предохранители). Если таким образом устранить неисправность не получается, следует привлечь к ремонту компетентного специалиста. Никогда не следует пытаться демонтировать любую часть микроскопа для ремонта.

Регистрируют обнаруженные неисправности и корректирующие действия в

журнале.

Важно убедиться, что гнезда окуляров и объективов никогда не остаются открытыми в течение более нескольких минут. Если линза неисправна, закрывают гнездо предоставленной производителем заглушкой или липкой лентой, иначе в него может попасть пыль, что приведет к помутнению остальных объективов.

В таблице 1.1 приводятся часто встречающиеся неисправности световых микроскопов и пути их устранения.

Таблица 1.1 - Неисправности микроскопов и пути их устранения

Проблема	Причина	Пути устранения
Поле зрения слишком тусклое	Слишком низко опущен конденсор	Поднять конденсор
	Ирисовая диафрагма конденсора закрыта	Открыть диафрагму
Темные пятна в поле зрения, которые перемещаются при повороте окуляра	Поверхность окуляра поцарапана	Заменить окуляр
	Окуляр грязный	Почистить окуляр
При работе с объективом высокого разрешения изображение нечеткое	Предметное стекло расположено мазком вниз	Перевернуть предметное стекло
	Пузырек воздуха в иммерсионном масле	Быстро сдвинуть линзу 100x из стороны в сторону
	Грязь на объективе	Почистить объектив
	Иммерсионное масло слишком вязкое	Использовать более жидкое иммерсионное масло
При работе с объективом низкого разрешения изображение нечеткое	Иммерсионное масло на линзе	Почистить объектив
	Слой пыли на верхней поверхности объектива	Почистить объектив

Если поле зрения остается мутным и нечетким, следует рассмотреть следующие возможные причины:

- массивный рост гриба на линзах или призмах из-за хранения в условиях высокой влажности;

- попадание иммерсионного масла между линзами объектива (результат использования низкокачественного масла, например, кедрового, или неправильного употребления ксилола). В этом случае объектив следует заменить;

- повреждение объектива в результате небрежной фокусировки и опускания объектива, грубой смены предметных стекол.

Флуоресцентный микроскоп требует осторожного обращения с точек зрения оптики и механики. Сотрудники лаборатории должны быть знакомы с общими механическими и оптическими принципами его устройства.

При использовании микроскопов, в которых источником УФ лучей является галогеновая или ртутная лампа, следует иметь в виду, что лампы разных производителей имеют различные сроки эксплуатации. Важно проверять срок эксплуатации каждой лампы, чтобы не превышать его, и своевременно заменять лампу. Замена ламп должна проводиться компетентным специалистом.

1.2.5. Автоматический свертыватель

При приготовлении яичных сред используется специальное оборудование, позволяющее точно дозировать количество тепла для обеспечения коагуляции белка.

Аппарат для свертывания питательных сред должен обеспечивать нагревание до температуры 80–85 °С и поддержание такой температуры в течение 45 минут. Современные свертыватели имеют автоматическую регулировку температуры и оснащены внутренним вентилятором. Внутренние полки, на которых в наклонном положении размещаются пробирки, должны быть изготовлены из решетчатого материала, чтобы не препятствовать циркуляции горячего воздуха. Свертыватель должен иметь плотно закрывающуюся дверцу, которая обеспечивает поддержание внутри необходимой температуры. В качестве свертывателей возможно использование сухожаровых шкафов с принудительной вентиляцией, а также инсписсаторов.

1.2.6. Весы

Для лабораторий, проводящих бактериологическое исследование на туберкулез, необходимы лабораторные весы (желательно электронные) с точностью взвешивания не менее 0,01 г и возможностью взвешивания не менее 100 г для взвешивания реактивов при приготовлении солевых растворов питательных сред.

Лаборатории, проводящие исследования на лекарственную чувствительность МБТ (лаборатории III уровня), дополнительно должны быть оснащены электронными весами с точностью взвешивания не менее 0,0001 г (аналитического класса точности) для взвешивания химически чистых веществ противотуберкулезных лекарственных средств (ПТЛС).

Весы должны быть установлены на устойчивой горизонтальной поверхности вдали от возможных источников вибрации и движения воздуха. Весы следует оберегать от пыли, загрязнений и влаги, для чего после работы их следует закрывать чехлами. Весы должны проходить ежегодную поверку.

Правила взвешивания:

- взвешивайте навески с учетом чувствительности весов;
- взвешивайте навески на специальном контейнере (на бумаге или фольге);
- для каждого взвешивания используйте индивидуальный контейнер (или отдельный кусочек бумаги, фольги);
- шпатель после взвешивания каждого реагента следует протирать, чтобы не

допустить загрязнения реактивов, предпочтительно использовать индивидуальные шпатели для каждого реагента;

- учтите вес контейнера (бумаги для взвешивания) до начала взвешивания вещества;

- обеспечьте полный перенос взвешенного вещества в сосуд для приготовления растворов;

- не переносите вещество из контейнера (бумаги) обратно в банку с веществом. В случае избыточного количества взвешенного вещества сделайте перерасчет объема растворителя.

Обслуживание весов

Ежедневное обслуживание

Взвешивая груз известной массы (калибровочные гири), ежемесячно проверяют его соответствие весу, определяемому по данным взвешивания.

Ежегодное обслуживание

Калибровка весов должна проводиться ежегодно или после любого ремонта или повторного размещения квалифицированным специалистом по обслуживанию.

Ремонт весов должен проводиться квалифицированным специалистом.

1.2.7. Автоматизированная система для детекции микобактерий туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности

Лаборатории III уровня оснащаются автоматизированной системой для детекции микобактерий туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности, которая позволяет выявлять в клинических образцах большинство штаммов микобактерий туберкулеза в среднем в течение 14 дней и определять лекарственную чувствительность МБТ в течение 4-14 дней.

Применение автоматизированной системы (ВАСТЕС MGIT 960) обеспечивает высокую воспроизводимость результатов и позволяет стандартизовать исследования.

Выполнять исследования с использованием автоматизированной системы следует в соответствии с инструкциями производителя.

Обслуживание автоматизированной системы

Ежедневное обслуживание

Ежедневная проверка включает проверку наличия бумаги в принтере, проверку работы индикаторных ламп и температуры инкубатора.

Для проверки температуры инкубаторов прибора предназначены три термометра в специальных пробирках, а также встроенные датчики температуры с индикацией на экране. Рекомендуется проверять температуру измерительных модулей утром при первом открытии измерительных модулей. Если это не удалось, выбирают время, когда измерительные модули оставались закрытыми в течение нескольких часов. Для предотвращения попытки тестирования пробирки с термометром как обычной пробы необходимо заблокировать измерительную ячейку от использования. Если показания термометров, находящихся внутри измерительных модулей, составляют $37\text{ }^{\circ}\text{C} + 1/-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, контроллер инкубатора и нагреватели работают в необходимом режиме.

Ежемесячное обслуживание

Ежемесячно заменяют или чистят воздушные фильтры на передней панели прибора. Если в окружающей среде очень много пыли, фильтры чистят чаще. Несвоевременная чистка или замена фильтров может привести к недопустимому повышению температуры внутри прибора, что может повлечь гибель тестируемого материала и повреждение электронного оборудования. Фильтры промывают дезинфектантом с микобактерицидным действием, затем водой, помещают на бумажное полотенце и дают высохнуть.

Периодическое обслуживание

Замена калибраторов

Пробирки с калибраторами, которые находятся в измерительных ячейках с левой стороны каждого измерительного модуля, необходимо заменять до истечения срока годности. Во время замены меняют все пробирки с калибраторами данного модуля. Замена калибраторов состоит из физической замены калибраторов и информирования системы о проведенной замене и проводится в соответствии с инструкцией производителя.

Любое обслуживание или ремонт автоматизированной системы должны выполняться только уполномоченными представителями компании-производителя.

1.2.8. Автоклав

В бактериологических лабораториях, проводящих исследования на туберкулез, основным и наиболее эффективным средством стерилизации лабораторных инструментов, стеклянной посуды, растворов и сред, а также биологического материала, включая культуры микобактерий, является автоклавирование, которое представляет собой нагрев объектов до высокой температуры под давлением выше атмосферного.

Автоклавы должны быть расположены вдали от основной рабочей зоны лаборатории, поскольку они могут создавать шум, высокую температуру и выпускать пар. Автоклавы, которые используются для обеззараживания инфекционного материала, должны иметь выпускной воздушный клапан, оснащенный бактериальным фильтром. Автоклавируемый стерильный фильтр должен состоять из картриджа с

мембраной размером пор 0,2 мкм и быть заключенным в герметичный корпус. Фильтр должен быть легко заменяем. Фильтр автоматически стерилизуется в течение каждого процесса стерилизации.

Стерилизацию объектов, инфицированных микобактериями туберкулеза, проводят с использованием режима автоклавирования 121 °С 15 минут.

Существенное влияние на эффективность стерилизации паром оказывает наличие в камере воздуха, так как его присутствие изменяет взаимоотношения между давлением и температурой. Например, температура насыщенного пара при 1 атм. составляет 121 °С, но только в том случае, если предварительно весь воздух был удален из автоклава. Если же будет удалена только половина воздуха, температура паровоздушной смеси составит всего лишь 112 °С. Кроме того, наличие воздуха между помещенными в автоклав предметами будет препятствовать проникновению пара в эти пространства. Весь воздух, находящийся в автоклаве, до начала процесса стерилизации паром должен быть удален, поэтому подлежащий стерилизации материал не следует слишком плотно упаковывать. Между контейнерами следует оставить как можно больше свободного места и ни в коем случае нельзя герметично закрывать флаконы крышками. Специальные автоклавируемые пакеты открывать перед стерилизацией не нужно, так как насыщенный пар свободно проникает внутрь, однако их не следует завязывать герметично. Перед автоклавированием в них можно налить немного воды, чтобы обеспечить образование пара.

Сосуды с жидкостями автоклавируют отдельно от твердых инфекционных отходов.

Обслуживание автоклава

Эксплуатация и обслуживание автоклава проводится в соответствии с инструкциями производителя. Режимы стерилизации и убивки выбираются согласно рекомендациям производителя конкретной модели автоклава. Самостоятельное принудительное увеличение времени или температуры стерилизации может привести к поломке оборудования и возникновению аварийной ситуации.

Автоклавы подлежат обязательному ежегодному техническому освидетельствованию представителями уполномоченных инженерных организаций, манометры автоклавов – ежегодной проверке.

Сотрудники лаборатории допускаются к работе с автоклавами после окончания специальных курсов и должны проходить курсы повышения квалификации каждые 5 лет.

Контроль работы автоклава

При режимах стерилизации жидкостей в автоклавах, оборудованных внешними термодатчиками, должен проводиться дополнительный температурный контроль.

Работу автоклава следует контролировать с использованием физических, химических и биологических методов.

Физический контроль

Физический контроль включает оценку параметров работы стерилизационного оборудования таймерами, датчиками температуры, давления и относительной влажности и др. Проводится при проведении каждого цикла стерилизации. Проверку температурного режима осуществляют с помощью максимальных термометров, которые помещают в контрольные точки стерилизатора.

Химический контроль

Принцип действия химических индикаторов основан на изменении агрегатного состояния индикаторного вещества и (или) цвета индикаторной краски при действии определенных параметров стерилизации, строго специфичных для каждого типа индикаторов в зависимости от метода и режима стерилизации. Химические индикаторы в паровом стерилизаторе размещают в каждой обеззараживаемой емкости и два - в самой камере, в воздушных стерилизаторах - от 5 до 15 в зависимости от емкости камеры.

Вместо химических тестов могут быть использованы термовременные индикаторы (ТВИ), контролирующие при воздушной стерилизации температуру (160 °С и 180 °С) и время стерилизации, а при паровой стерилизации - температуру (121 °С и 132 °С), время стерилизации и наличие пара. Индикаторы представляют собой полосы шириной 2-3 см, отрываемые от бумажной ленты с нанесенным на нее индикаторным слоем, цвет которого необратимо меняется только при соблюдении режимов стерилизации. Проводится ежедневно при проведении каждого цикла стерилизации. Следует помнить, что ленты для сухожаровых шкафов не пригодны для контроля стерилизации в автоклавах. На индикаторных полосках до помещения в стерилизатор обязательно указывается дата стерилизации.

Биологический контроль

Даже если возможен мониторинг работы автоклава посредством распечатки протокола автоклавирования (температура и давление), после каждых 40 часов использования автоклава следует использовать биологический индикатор в соответствии с инструкциями производителя. Результаты контроля с использованием биологического индикатора должны регистрироваться в журнале и храниться не менее 1 года.

1.2.9. Морозильник

Ежедневное обслуживание

Выполняют ежедневные проверки температуры. Записывают показания в журнале.

Проверяют компрессор на наличие любых необычных звуков.

Ежемесячное обслуживание

Очищают фильтры и экраны вентиляторной системы.

Каждые шесть месяцев

Размораживают и очищают морозильную камеру, как описано ниже. Это можно делать более часто, если необходимо, если толщина льда на внутренней стенке достигает 5-6 мм.

Ремонт должен производиться только квалифицированным специалистом.

Размораживание

Определяют необходимый объем свободного пространства в другой морозильной камере для хранения материалов при проведении размораживания. Следует убедиться, что материалы, хранящиеся в морозильной камере, четко маркированы, перенесите их в другую морозильную камеру.

Выключают морозильник и отключают его от электросети. Открывают дверь морозильной камеры и оставляют ее открытой. Устанавливают контейнер, чтобы собирать тающий лед. Никогда не следует использовать острые предметы, чтобы скалывать лед. Растаявший лед удаляют губкой.

Мытье

Моют внутреннюю поверхность морозильной камеры дезинфицирующим раствором, а наружную поверхность морозильной камеры моющим раствором и вытирают насухо мягкой тканью. Подключают морозильную камеру к основному источнику питания и включают его. Заполняют морозильную камеру, когда температура достигнет $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Проверяют изменения в содержимом морозильника и делают необходимые записи в журнале.

1.2.10. Ультрафиолетовый (УФ) облучатель

Ультрафиолетовые установки изготавливаются в виде открытых бактерицидных облучателей, в виде экранированных облучателей, а также в виде закрытых облучателей с принудительной циркуляцией воздуха. Выраженный бактерицидный эффект УФ облучения в отношении микобактерий зарегистрирован для длины волны 254 нм. Эффективность использования УФ-рециркуляторов закрытого типа в инфекционно опасных зонах лаборатории в настоящее время не доказана.

Следует иметь в виду, что УФ облучение эффективно для обеззараживания воздуха, в связи с чем его следует применять в случае аварии вне БББ, и менее эффективно для обеззараживания поверхностей, поскольку обеззараживаются только

те поверхности в помещении, на которые падают прямые УФ лучи.

Эффективность прямого облучения обратно пропорциональна квадрату расстояния до объекта. Расчет расположения и установки УФ-облучателей должен проводиться квалифицированным специалистом-инженером.

Влажность помещений является критическим параметром при использовании УФ-облучателей, а также обеззараживающих и фильтрующих приборов, действующих на основе электростатических взаимодействий (HEPA-фильтры) или иных электромагнитных принципов. УФ-облучение наиболее эффективно при общей влажности воздуха 60-65 %, увеличение влажности воздуха до 95 % снижает его эффективность. В связи с этим влажную гигиеническую уборку помещений не следует совмещать с УФ облучением; дезинфекция воздуха и поверхностей помещений с помощью УФ излучения должна проводиться после просушки помещений.

Обслуживание УФ-облучателя

Еженедельное обслуживание

Только излучатели с абсолютно чистой, свободной от пыли поверхностью способны эффективно обеззараживать воздух и поверхности помещения. По этой причине очистку бактерицидных облучателей следует производить после отключения от сети марлевым тампоном, смоченным 70 % этиловым спиртом, с последующим просушиванием сухой ветошью. Использование для очистки бактерицидных ламп воды, растворов мыла или других моющих средств недопустимо.

Периодическое обслуживание

Для оценки эффективности ультрафиолетовой бактерицидной лампы измеряют уровень облученности на расстоянии 1 метр от открытой части лампы с помощью УФ-радиометра. При снижении уровня облученности ниже 100 мкВт/см^2 на расстоянии 1 метр от открытой части облучателя лампу необходимо заменить. Если отсутствует возможность измерения уровня облученности, бактерицидные лампы, отработавшие гарантийный срок службы, должны заменяться новыми. При уровне облученности 100 мкВт/см^2 и выше эксплуатация лампы может продолжаться и после гарантийного срока службы.

Интенсивность ультрафиолетового излучения бактерицидных ламп, установленных в БББ, и его соответствие нормам следует проверять во время повторной сертификации БББ.

2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИЯХ, ПРОВОДЯЩИХ ДИАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛЕЗА

2.1. Общие положения

Инфицирование микобактериями туберкулеза (МБТ) происходит в основном аэрогенным путем. Инфекционные частицы попадают в воздух лабораторий в результате проведения процедур, сопровождающихся образованием аэрозолей. Крупные капли аэрозоля (диаметром более 5 мкм) рассеиваются в пределах одного метра от источника, быстро оседают из воздуха, инфицируя кожу, одежду и рабочие поверхности в помещении. После высыхания влажных капель, находящихся в аэрозоле, образуются мельчайшие частицы (капельные ядра) диаметром от 1 до 5 мкм. В каждой из них может быть от одной до нескольких жизнеспособных микобактерий туберкулеза. Такие мельчайшие аэрозольные частицы могут находиться в воздухе в течение длительного времени. При вдыхании они попадают в альвеолы легких, где могут вызвать инфекционный процесс. Таким образом, возбудитель ТБ распространяется аэрогенным путем, а не воздушно-капельным, как было принято считать ранее. Дозы бактерий, обуславливающие инфицирование человека ТБ, малы: 1-10 бактерий, которые могут содержаться в 1-3 аэрозольных частицах.

Большинство случаев инфицирования в лаборатории, выполняющей исследования на ТБ, происходит из-за недооценки опасности образования инфекционных аэрозолей, содержащих МБТ, которые образуются при выполнении многих микробиологических методик.

Пациенты с туберкулезом все чаще оказываются инфицированы ВИЧ и гепатитом, и диагностические материалы от них, такие как мокрота с кровью, кровь и спинномозговая жидкость, могут содержать вирусы. В связи с этим необходимо также принимать во внимание возможность инфицирования сотрудников лаборатории не только туберкулезом, но и другими инфекционными заболеваниями.

2.2. Риск инфицирования при выполнении исследований на туберкулез

2.2.1. Риск вдыхания инфекционных частиц

В большинстве случаев вдыхание инфекционных частиц сотрудниками лабораторий, выполняющих исследования на ТБ, может произойти в результате образования инфекционного аэрозоля, содержащего МБТ, когда жидкость слишком быстро переливается, пипетируется или разбрызгивается. Аэрозоли образуются в бактериологических лабораториях при выполнении следующих манипуляций:

- открывание баночек с мокротой, что особенно опасно в тех случаях, когда мокрота затекла и высохла между крышкой и стенкой плевательницы, или если мокроту взбалтывали перед открыванием плевательницы;

- приготовление мазков на предметных стеклах;

- фиксирование над горелкой невысохших влажных мазков, что приводит к вскипанию и разбрызгиванию частичек материала;

- добавление раствора для деkontаминации мокроты;
- центрифугирование;
- пипетирование;
- работа с бактериологической лопаткой и петлей;
- гомогенизация кусочков органов и тканей.

Следует иметь в виду, что вероятность образования инфекционного аэрозоля и связанный с этим риск при работе с нативной мокротой значительно ниже, чем при работе с жидкой культурой, что обусловлено вязкостью мокроты.

2.2.2. Риск заглатывания инфекционных частиц

Заглатывание инфекционного материала, содержащего микобактерии туберкулеза, может произойти в результате прямой его аспирации, например, если работник осуществляет пипетирование ртом или если работник облизывает пальцы или какие-либо предметы, контаминированные микобактериями туберкулеза при контакте с загрязненными поверхностями. Ни в коем случае нельзя пипетировать ртом, лизать этикетки или брать в рот кончик карандаша или авторучки.

2.2.3. Риск инокуляции или попадания на слизистые инфицированных частиц

Случайные уколы иглой – частое происшествие в лаборатории, поэтому никогда не следует использовать иглы вместо пипеток. Можно легко порезать руки контаминированным стеклом, поэтому никогда нельзя касаться пальцами битой лабораторной посуды. Следует максимально стремиться к замене стеклянной лабораторной посуды на пластиковую везде, где только возможно. Разбитую стеклянную посуду следует собирать с помощью щетки и совка, большие куски нужно брать пинцетом. Осколки стеклянной посуды должны быть соответствующим образом продезинфицированы перед выбрасыванием.

2.3. Оценка риска

В основе практики биобезопасности лабораторий, выполняющих исследования на ТБ, лежит оценка рисков.

Опасность – это все, что потенциально может причинить вред, независимо от того, насколько высока вероятность этого. Опасностью может быть ситуация (например, пожар или взрыв), деятельность (например, пипетирование) или материал (например, аэрозоли, содержащие микобактерии). Риск – это сочетание вероятности того, что конкретная опасность будет встречаться, и последствия события, связанного с этой конкретной опасностью. Факторы, которые следует принимать во внимание при оценке рисков в лаборатории, выполняющей исследования на ТБ, включают:

- бактериальную нагрузку образцов мокроты и культур микобактерий, а также жизнеспособность МБТ;

- путь передачи туберкулеза;
- вероятность создания инфекционных аэрозолей при выполнении лабораторных процедур;
- количество манипуляций, которые потенциально могут генерировать аэрозоли, для каждого метода;
- нагрузка на лабораторию и отдельных сотрудников;
- расположение лаборатории;
- эпидемиология ТБ, популяция пациентов, обслуживаемых лабораторией;
- уровень опыта и компетенции сотрудников лаборатории;
- здоровье сотрудников лаборатории (особенно ВИЧ-статус).

Кроме того, следует принимать во внимание способность сотрудников лаборатории контролировать риски, которая зависит от компетенции, знаний и опыта сотрудников лаборатории; функционирование оборудования, обеспечивающего биобезопасность; устройство лаборатории, а также наличие и надлежащее использование соответствующих стандартных операционных процедур.

На основе информации, выявленной в процессе оценки рисков, определяются требования к помещениям лаборатории, выбираются необходимое лабораторное оборудование, соответствующие средства индивидуальной защиты (СИЗ), которые включаются в стандартные операционные процедуры для каждой процедуры, выполняемой в лаборатории.

Процедура оценки риска включает следующие этапы:

1. Определение возможных опасностей (например, высокий удельный вес М/ШЛУ штаммов микобактерий в лаборатории требует установления более серьезных мер предосторожности).
2. Определение того, кому может быть причинен вред и какой (потенциальный вред может зависеть от состояния здоровья сотрудника лаборатории).
3. Оценка рисков и принятие решений о необходимых мерах предосторожности (оценка помещений лаборатории, функционирования оборудования, обеспечивающего биобезопасность, уровня компетентности сотрудников в вопросах биобезопасности).
4. Запись выводов и их внедрение (результаты оценки риска и необходимых мер предосторожности должны быть включены в стандартные операционные процедуры).
5. Периодический пересмотр и обновление оценки риска и мер предосторожности.

2.4. Классификация лабораторий, проводящих диагностику туберкулеза

Лаборатории, проводящие исследования на туберкулез, можно разделить на три основных уровня в зависимости от выполняемых исследований и связанных с ними рисков (главным образом с образованием инфекционного аэрозоля):

- низкий риск ТБ - лаборатории, выполняющие микроскопические исследования на КУБ и/или исследования Хpert MTB/RIF (лаборатории I уровня);

- умеренный риск ТБ - лаборатории, выполняющие посев на питательные среды (лаборатории II уровня) и/или исследования методом LPA образцов диагностического материала (мокрота);

- высокий риск ТБ - лаборатории, выполняющие идентификацию культур МБТ, тестирование лекарственной чувствительности (ТЛЧ) и/или исследования методом LPA культур микобактерий (лаборатории III уровня).

Таблица 2.1 - Требования к обеспечению безопасности в лабораториях, проводящих исследования на ТБ

	Лаборатории с низким риском ТБ	Лаборатории с умеренным риском ТБ	Лаборатории с высоким риском ТБ
Размещение и вход в лабораторию	Рабочая зона лаборатории отделена от мест нахождения людей	Лаборатория располагается в отдельном помещении (здании) или в изолированной части здания	Лаборатория располагается в отдельном помещении (здании) или в изолированной части здания. В лаборатории должен быть тамбур-шлюз при переходе из чистой зоны в контаминированную, который должен обеспечивать разделение чистой и грязной рабочей одежды. Двери шлюза могут быть самозакрывающимися и блокироваться так, что одновременно может быть открыта только одна дверь. Должны быть установлены стеклянные панели, чтобы обеспечить обзор рабочей зоны лаборатории
Вентиляция	Достаточно естественной вентиляции (открытые окна и двери) или механической вентиляции, обеспечивающей движение воздуха от лаборанта через рабочую зону за пределы лаборатории	Автономная приточно-вытяжная вентиляция, обеспечивающая однонаправленный поток воздуха и 6-12 смен воздуха в час. Окна лаборатории всегда должны быть закрыты	Автономная приточно-вытяжная вентиляция, обеспечивающая однонаправленный поток воздуха и 6-12 смен воздуха в час. Окна лаборатории всегда должны быть закрыты

БББ	Не обязательно, но желательно для лабораторий, выполняющих значительную часть исследований для пациентов с ТБ с бактериовыделением	Обязательно для всех манипуляций, связанных с образованием аэрозолей	Обязательно для всех манипуляций, связанных с образованием аэрозолей
Автоклав для деkontаминации инфекционного материала	Не обязательно, но желательно для лабораторий, выполняющих значительную часть исследований для пациентов с ТБ с бактериовыделением	Обязательно	Обязательно
Вытяжной шкаф для окрашивания мазков	Обязательно	Обязательно	Обязательно
Раковина для мытья рук персонала с локтевым или автоматическим краном, мылом и диспенсером для бумажных полотенец	Обязательно	Обязательно во всех помещениях лаборатории	Обязательно во всех помещениях лаборатории
Лабораторный халат с застежкой сзади, длинными рукавами и эластичными широкими манжетами (не менее 30 мм)	Обязательно	Обязательно	Обязательно
Респиратор FFP2 или FFP3	Не обязательно	Обязательно	Обязательно
Хирургическая маска	Не используется	Не используется	Не используется
Латексные, виниловые или нитриловые перчатки	Обязательно	Обязательно	Обязательно

2.5. Основные меры биобезопасности в лабораториях с умеренным и высоким риском ТБ

Работа с микобактериями туберкулеза (МБТ) может проводиться только в лабораториях, имеющих условия для соблюдения требований безопасности.

Во всех лабораториях, проводящих диагностику туберкулеза, независимо от вида выполняемых исследований, должны применяться меры по минимизации рисков, затрагивающие кодекс практики, оборудование, помещения и планировку лаборатории, наблюдение за состоянием здоровья, обучение, обращение с отходами.

В каждой лаборатории должны быть разработаны детальные инструкции по обеспечению безопасности во время выполнения лабораторных процедур, учитывающие национальные рекомендации, а также существующие в данной лаборатории риск инфицирования сотрудников и возможность загрязнения окружающей среды.

За безопасность работы в лаборатории отвечают все ее сотрудники.

Каждый сотрудник несет ответственность за свою собственную безопасность и за безопасность своих коллег. Сотрудники должны выполнять свою работу безопасным образом и сообщать о всех небезопасных действиях, условиях или происшествиях руководителю.

На дверях лаборатории должен быть международный символ биологической опасности и предупредительная надпись «Биологическая опасность» (рис. 2.1). В лаборатории должна функционировать система ограничения входа, исключающая доступ посторонних лиц, в том числе детей, в рабочую зону лаборатории.



Рисунок 2.1 – Международный символ биологической опасности

Помещения лаборатории должны использоваться по своему прямому назначению, в них запрещается проводить работы, не связанные с выполнением служебных обязанностей.

Сбор образцов мокроты для исследования не должен проводиться в помещениях лаборатории. Для сбора мокроты предпочтительно использование одноразовых пластиковых контейнеров для образцов с завинчивающимися крышками. Они должны быть прочными и не иметь протечек при правильно установленной крышке. Никакой материал не должен оставаться на наружной поверхности контейнера. Контейнер должен быть надлежащим образом промаркирован. Бланки направления на проведение исследования не должны оборачиваться вокруг контейнеров с диагностическим материалом, а должны доставляться в полиэтиленовом пакете отдельно от контейнеров.

Персонал должен быть проинформирован о потенциальных опасностях и должен пройти обучение безопасным методам работы, которым необходимо следовать, чтобы избежать или свести к минимуму риск инфицирования.

Руководитель лаборатории должен убедиться, что все сотрудники ознакомлены с соответствующими нормативными документами, что удостоверяется их подписью.

Инструкции по биологической безопасности всегда должны быть доступны в лаборатории. Стандартные операционные процедуры должны включать подробности оценки рисков и необходимые меры предосторожности.

2.5.1. Требования к устройству лаборатории, планировке и внутренней отделке помещений

В лабораториях планировочно выделяют функционально чистую и потенциально контаминированную зону.
--

В чистой зоне располагаются помещения для персонала, для хранения верхней одежды и личных вещей, для проведения подготовительных работ, подсобные помещения; душ, туалет. В контаминированной зоне располагаются помещения для работы с инфекционным материалом. Расположение помещений контаминированной зоны должно обеспечивать технологическую поточность движения исследуемого материала. В рабочей зоне лаборатории нельзя хранить продукты или напитки, есть, пить, курить, пользоваться косметикой, обрабатывать контактные линзы, пользоваться мобильными телефонами.

Помещения, где проводится работа с диагностическим материалом и культурами микобактерий, должны быть оборудованы бактерицидными облучателями направленного действия (потолочными или настенными). В лабораториях, оснащенных системой вентиляции с эффективным обменом (6-12 смен воздуха в час) воздуха, установка облучателей не обязательна.

Стены, потолки и полы должны быть гладкими и легко моющимися. Полы не должны быть скользкими. Рабочие поверхности должны быть непроницаемыми для воды и устойчивы к химическим веществам и дезинфицирующим средствам, обычно используемым в лаборатории, они также должны быть устойчивыми к умеренному нагреванию. Двери лаборатории должны иметь стеклянные окна и быть самозакрывающимися.

Освещение должно быть достаточным для всех видов деятельности. В лаборатории нельзя использовать шторы.

Лабораторная мебель должна быть прочной, должна быть изготовлена из материалов светлых тонов, рабочие поверхности столов должны быть покрыты химически устойчивым материалом. Внутренние и наружные поверхности мебели не должны иметь щелей и пазов, затрудняющих обработку дезинфицирующими средствами. Зазоры между фиксированной мебелью (столы, столешницы и др.) и

стенами должны быть обработаны силиконом, устойчивым к химическим воздействиям. Открытые пространства между и под столами, шкафами и оборудованием должны быть доступны для мытья и дезинфекции.

Металлические предметы должны быть изготовлены из сплава, устойчивого к коррозии. Полки в термальных комнатах должны быть сделаны из материала, устойчивого к действию дезинфектантов.

Помещения лаборатории должны быть аккуратными, чистыми и свободными от материалов и оборудования, которое не используется для выполнения рутинной работы. Оборудование и материалы, которые не используются или не работают, должны быть удалены из рабочей зоны.

Складские помещения должны быть достаточными для хранения реагентов и расходных материалов, которые используются в настоящее время. За пределами рабочей зоны должно быть выделено дополнительное пространство для длительного хранения расходных материалов.

В лаборатории должна быть выделена отдельная площадь для безопасной подготовки, обработки и хранения кислот, красителей и растворителей.

Лаборатория должна быть обеспечена надежной системой электроснабжения.

2.5.2. Лабораторные методы

Все лабораторные процедуры должны выполняться таким образом, чтобы предотвратить или свести к минимуму образование аэрозолей и капель.
--

Диагностический материал для бактериологического исследования должен поступать в лабораторию через отдельный вход или окно. Разгрузка транспортного контейнера должна проводиться в БББ с соблюдением мер предосторожности. Необходимо обрабатывать протирающим дезинфицирующим раствором контейнеры с диагностическим материалом и транспортный контейнер (после разгрузки).

Запрещается прерывать выполнение сотрудниками любых видов работ с биологическим материалом. Перед началом работы с инфекционным материалом следует снять кольца, часы, браслеты.

При приготовлении мазков предпочтительнее использование деревянных палочек или одноразовых петель, а не многоразовых петель, которые необходимо стерилизовать в пламени. Многоразовые петли перед прожиганием должны быть очищены с использованием песка со спиртом. При приготовлении мазка следует двигать петлю или палочку медленно и плавно, чтобы избежать создания аэрозоля. Мазки нельзя фиксировать, пока они не высушены на воздухе.

При пипетировании необходимо пользоваться только пластиковыми пастеровскими пипетками или автоматическими устройствами (дозаторами); пипетирование ртом строго запрещено. Следует вносить в пробирки только кончик одноразовой пипетки, а не всю пипетку целиком.

При правильной технике работы с пастеровской пипеткой следует сдвинуть широкий конец пипетки настолько, чтобы набрать жидкости немного больше требуемого уровня, затем извлечь конец пипетки из жидкости, слегка сжать широкий конец пипетки, чтобы в ней остался нужный объем, и после этого расслабить пальцы. При этом в пипетке останется нужный объем жидкости, который можно перенести в другой сосуд, не утомляя пальцы и не рискуя потерять часть содержимого. Для удаления жидкости из пипетки следует аккуратно сжать широкий конец пипетки, а затем так же аккуратно освободить его. Нельзя форсировать слив жидкости из пипеток. При резком сжатии широкого конца часть жидкости останется в пипетке, кроме того, при обратном токе воздуха появляются пузырьки, которые лопаются, образуя аэрозоль биологически опасного материала.

Никогда не следует выдувать воздух из пипетки через жидкость, содержащую инфекционные агенты. Инфекционные материалы не следует смешивать попеременным всасыванием и сливом через пипетку.

При добавлении реагентов к потенциально инфекционным жидкостям следует аккуратно сливать жидкость из пипетки по внутренней стенке контейнера или пробирки. При удалении жидкости следует убедиться, что пробирка расположена наклонно, так чтобы жидкость стекала по стенке пробирки или контейнера, чтобы минимизировать всплески.

Запрещается переливание инфицированных жидкостей из сосуда в сосуд через край. Переливание допустимо только с использованием воронки при удалении надсадочной жидкости в процессе деконтаминации материала.

В емкость для слива жидких инфекционных отходов перед использованием необходимо добавить дезинфицирующее средство с микобактерицидным (туберкулоцидным) действием. В целях биобезопасности для слива инфекционных отходов рекомендуется использовать небольшие емкости (объемом 500-1500 мл). Рекомендуется добавлять в емкость для слива такое количество концентрата дезинфицирующего средства, чтобы при заполнении емкости в супернатанте создавалась его туберкулоцидная концентрация (в соответствии с информацией, указанной на этикетке или в сертификате дезинфицирующего средства).

Например, в лабораторию поступило 65 образцов, то есть после обработки и центрифугирования будет удалено $65 \times 50 \text{ мл} = 3250 \text{ мл}$ супернатанта. В лаборатории используется дезинфицирующее средство N, туберкулоцидная концентрация которого составляет 4 %. Слив супернатанта производится в емкости объемом 1 л. Для достижения бактерицидной концентрации дезинфицирующего средства N в супернатанте в 3 емкости для слива нужно налить по 40 мл (4 % от 1000 мл) и в одну емкость - 10 мл (4 % от 250 мл) дезинфицирующего средства N.

Необходимо пользоваться одноразовыми пластиковыми бактериологическими петлями или металлическими лопатками. Желательно иметь в лаборатории количество лопаток, соответствующее среднему количеству исследований за несколько рабочих дней, чтобы использовать индивидуальную лопатку для каждой пробы с последующим ее обеззараживанием автоклавированием. Следует работать очень аккуратно, избегая энергичных и резких движений.

При работе с автоматизированной системой перед установкой пробирок в измерительный модуль следует убедиться в том, что пробирки целы, крышки пробирок плотно завинчены. Перед закрытием измерительного модуля следует убедиться, что пробирки аккуратно и полностью вставлены в измерительные ячейки.

Рабочие поверхности должны быть подвергнуты деkontаминации после любого разлива потенциально инфекционного материала и в конце каждого сеанса работы.

Не следует хранить стекла с мазками мокроты и микропрепаратами МБТ завернутыми в бумагу или в картонных коробках. Контейнеры для хранения предметных стекол должны быть изготовлены из материала, устойчивого к действию дезинфектантов.

Нельзя брать в рот никакие материалы или инструменты, находящиеся в лаборатории. Все этикетки, используемые в лаборатории, должны быть самоклеящимися.

Письменные документы, которые могут выноситься за пределы контаминированной зоны лаборатории, должны быть защищены от контаминации.

Вынос оборудования, лабораторной и хозяйственной посуды, реактивов, инструментов и т.п. из контаминированной зоны лаборатории производят после дезинфекции.

2.5.3. Работа с лабораторным оборудованием

Бокс биологической безопасности

Сотрудники лаборатории должны быть обучены правилам работы в БББ.

Операторам необходимо тщательно следить за поддержанием постоянства поступающего через открытую переднюю часть бокса потока воздуха во время передвижения рук внутрь бокса и из него. БББ можно использовать, только если он находится в исправном состоянии.

Рабочие поверхности, внутренние стенки и внутреннюю поверхность окна БББ нужно обрабатывать дезинфицирующими растворами перед началом и в конце работы или при загрязнении. Перед началом работы контролируют интенсивность потока

воздуха в БББ.

При работе в БББ следует использовать средства индивидуальной защиты. Бокс следует включать за 5–15 минут до начала работы, а после окончания работы необходимо оставить его включенным на 15 минут после обработки для удаления контаминированного воздуха.

Следует свести к минимуму перемещения позади оператора.

Передняя заборная решетка БББ класса II не должна перекрываться бумагой, оборудованием или иными предметами. Внутри БББ никогда не следует помещать документы.

В БББ следует помещать только те материалы и оборудование, которые непосредственно нужны для работы; все запасные материалы и реагенты (например, дополнительное количество питательных сред) следует размещать вне БББ. Лишние предметы, находящиеся в БББ, могут вызывать нарушение правильного тока воздуха, что приведет к появлению турбулентности, перекрестному заражению и вдыханию зараженного аэрозоля лабораторным работником.

Прежде чем внести в БББ какие-либо материалы, следует обработать их наружные поверхности дезинфицирующим раствором.

Все материалы и оборудование, при работе с которым может образовываться аэрозоль (например, вортекс, миксеры, микроцентрифуги), размещают как можно дальше от фронтальной части, но не блокируя заднюю решетку. Все массивные предметы (автоклавируемые контейнеры для слива биоматериала, автоклавируемые пластиковые мешки и др.) располагают с одной стороны от оператора.

Оборудование и материалы размещают таким образом, чтобы предупредить перемещение загрязненного материала над чистым. Для этого рабочую поверхность БББ условно делят на три зоны (слева направо для правой):

- чистую, где размещают стерильные расходные материалы;
- рабочую, где размещают диагностический материал или культуры микробактерий;
- контаминированную, где размещают контейнеры для отработанной лабораторной посуды (рис. 2.2).

Для исключения перекрестной контаминации чистые материалы всегда следует держать на расстоянии не менее 12 см от места образования аэрозолей.

На рабочую поверхность (но не на переднюю или заднюю решетку) помещают полотенце из абсорбирующего материала (целлюлозные салфетки) и заливают его дезинфектантом. Это упростит обработку БББ и предотвратит разбрызгивание пролитой жидкости и образование аэрозоля. После работы полотенце сворачивают и помещают в пластиковый мешок для последующего автоклавирования.

Перед началом работы после внесения рук в БББ делают небольшую паузу (60 секунд) для удаления контаминирующих микроорганизмов, находящихся внутри БББ на различных поверхностях, а также на руках, и восстановления воздушного потока.

Следует аккуратно проводить все микробиологические манипуляции, чтобы предупредить разбрызгивание материала и образование аэрозолей.

Все манипуляции выполняют на расстоянии по крайней мере 10 см от передней решетки БББ. Во время работы слегка поднимают руки, чтобы воздух из комнаты мог свободно поступать в БББ через переднюю решетку. Руки следует передвигать медленно и перпендикулярно плоскости открытой передней части. Во время работы не следует выбрасывать материалы, требующие дезинфекции, за пределы БББ, располагать контейнер с использованными пипетками за пределами БББ. Подобная практика создает завихрения воздушного потока, подвергает риску инфицирования лаборанта и нарушает стерильность материала, с которым он работает. Количество передвижений через открытую переднюю часть следует свести к минимуму, для чего следует все необходимые предметы разместить в БББ до начала работы.

Не следует держать открытые пробирки или флаконы в вертикальном положении, их следует как можно быстрее закрывать крышками или пробками.

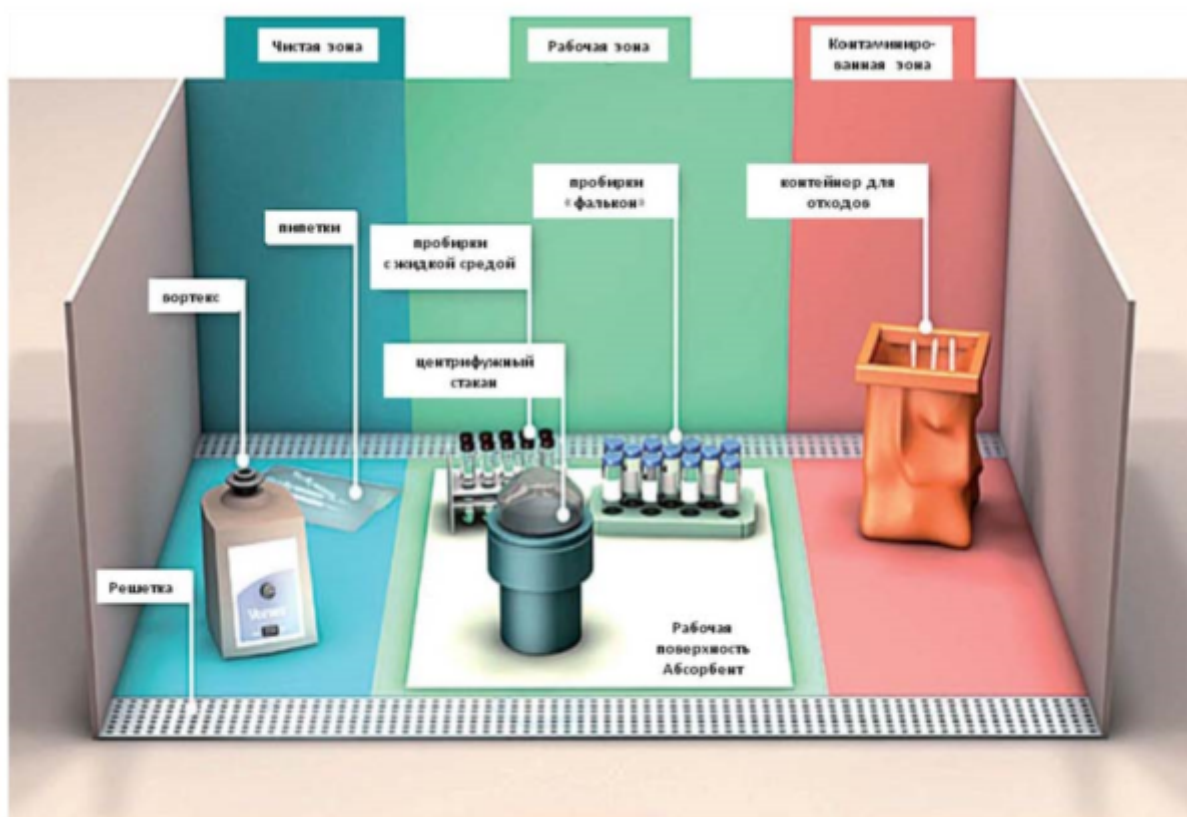


Рисунок 2.2 – Организация рабочей поверхности БББ

Не следует использовать в БББ большое открытое пламя. Это создает турбулентность, которая нарушает приток воздуха в рабочую зону БББ. Для работы в ламинарном шкафу рекомендуется применять специальные бунзеновские горелки с сенсорным или педальным управлением, их использование должно быть кратковременным (до 5-7 сек). Работу в БББ 2 класса можно проводить без использования горелок. Использование спиртовок в БББ запрещено.

Отработанный материал сразу помещают в специальные автоклавируемые мешки или контейнеры, находящиеся внутри БББ, которые следует автоклавировать сразу после завершения работы.

Прежде чем доставать из БББ какие-либо материалы, следует обработать все наружные поверхности дезинфицирующим раствором.

Лампы ультрафиолетового света в БББ не обязательны. Если же они используются, то их следует еженедельно обрабатывать тампоном, смоченным 70 % этанолом.

Каждый раз перед заменой фильтра, при ремонте и техобслуживании БББ обязательно дезинфицируют. Для деконтаминации боксов биологической безопасности классов I и II существует специальное оборудование, которое автоматически производит, обеспечивает циркуляцию и нейтрализует газообразный формальдегид.

Деконтаминацию и замену фильтра осуществляет сертифицированный специалист. После замены фильтра проводится тестирование эффективности работы БББ с использованием специального оборудования.
--

Центрифуга

Во время процесса центрифугирования могут образовываться аэрозоли, поэтому при работе с центрифугой должны строго соблюдаться меры безопасности.

Во время работы центрифуги крышка должна быть плотно закрыта. Рекомендуется использование широкого непористого уплотнителя. Крышка не должна быть открыта, пока ротор полностью не остановился. Следует использовать роторы с защитными крышками для каждого центрифужного стакана. Крышки центрифужных пробирок и стаканов должны быть закрыты до начала центрифугирования. Загрузка и разгрузка центрифужных стаканов проводится только внутри БББ. Микроцентрифуга, используемая для экстракции ДНК, должна иметь ротор с закрывающейся крышкой. Загрузка и разгрузка микроцентрифуги проводится внутри БББ.

Стаканы центрифуги перед началом работы должны быть хорошо уравновешены. Если это не сделано, может возникнуть сильная вибрация, которая приведет к износу опор и разрушению ротора. Если проводится исследование одной пробы, то с диаметрально противоположной стороны ротора должна быть помещена аналогичная

центрифужная пробирка с дистиллированной водой или 70 % этанолом, имеющая такой же вес. Не следует применять для уравнивания солевые или гипохлоритные растворы, так как они вызывают коррозию металлов. Недопустимо уравнивать пробирки, добавляя воду в образцы диагностического материала.

Под воздействием центробежной силы стеклянные пробирки могут разрушаться. При этом происходит разбрызгивание жидкости и образование аэрозоля. Поэтому при обработке потенциально инфекционного материала необходимо использовать пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками. При использовании центрифуги 3000g рекомендуется использовать центрифужные пробирки, изготовленные из полипропилена высокой плотности (PP HD). Нельзя центрифугировать или встряхивать открытые пробирки, а также пробирки, закрытые резиновыми, ватно-марлевыми пробками или пробками из прессованной целлюлозы.

После центрифугирования или встряхивания пробирки оставляют внутри БББ до открывания как минимум на 10 минут, чтобы дать возможность образовавшемуся аэрозолю осесть.

После работы поверхности центрифуги, ротор, центрифужные стаканы и адаптеры обрабатывают 70 % этанолом или другим дезинфицирующим средством.

2.5.4. Средства индивидуальной защиты

Защитную одежду (рабочий костюм) необходимо носить в течение всего времени работы в лаборатории. Рабочая одежда и обувь должны быть индивидуальными, соответствовать размерам сотрудников. В лаборатории следует носить обувь с закрытым носком.

Во время работы в контаминированной зоне лаборатории поверх рабочего костюма надевают лабораторный халат с застежкой сзади, длинными рукавами и эластичными широкими манжетами (не менее 30 мм).

Чистая и использованная защитная одежда должна храниться отдельно от личной одежды в разных зонах лаборатории, чистая – в шкафах, использованная – на вешалках.

Смена рабочей одежды должна проводиться по мере загрязнения, но не реже 1 раза в неделю. Запрещается стирать лабораторную одежду дома.

При выполнении процедур, связанных с непосредственным или возможным контактом с мокротой, кровью и другими биологическими жидкостями и другими потенциально инфекционными материалами, следует использовать латексные, виниловые или нитриловые перчатки. В лаборатории должен быть достаточный запас перчаток. Одноразовые перчатки не следует мыть или использовать повторно, их следует удалять вместе с инфицированными лабораторными отходами. Перчатки следует натягивать на манжеты рукавов, а не оставлять под ними. Перчатки следует снимать и тщательно мыть руки после работы с инфекционными материалами и перед уходом из инфекционной зоны лаборатории.

Снятие перчаток:

- держа одну перчатку за манжету, тянут ее с руки так, чтобы вывернуть наизнанку, большая часть загрязнений при этом остается внутри;

- держат использованную перчатку в руке, на которую еще надета перчатка. Аккуратно просовывают пальцы под манжету руки в перчатке, стараясь не прикасаться к поверхности загрязненной перчатки. Тянут перчатку с руки так, чтобы вывернуть наизнанку и сформировать мешок из использованных перчаток с загрязнением внутри;

- утилизируют перчатки.

Регулярное мытье рук позволяет предотвращать заражение многими видами инфекций, в том числе передающихся с кровью.

Персонал должен мыть руки после любого явного загрязнения, после завершения работы с инфекционным материалом, уборки рабочего места и помещений лаборатории и прежде чем покинуть рабочую зону. Следует тщательно намыливать руки с мылом в течение по крайней мере 15 секунд (Европейский стандарт обработки EN-1500), промывать их в чистой воде и высушивать с помощью чистой бумажной салфетки. Предпочтительными являются локтевые или автоматические краны (смесители). Если в лаборатории таких кранов нет, следует использовать бумажные салфетки для закрывания крана, чтобы предотвратить загрязнение чистых рук.

В качестве средств индивидуальной респираторной защиты применяют различного вида респираторы, плотно облегающие рот и нос и обеспечивающие фильтрацию частиц аэрозолей 1 мкм и более со степенью фильтрации не менее 95 % (FFP2 респиратор (стандарт EN149:2001 FFP2) или FFP3 респираторы (стандарт EN149:2001 FFP3)).

Сотрудники лаборатории должны быть обучены правилам пользования респиратором.

Респираторы хранят завернутыми в бумагу или тканевую салфетку в чистом сухом месте или в картонных коробках, но не в пластиковых пакетах, удерживающих влагу, поскольку они должны быть сухими и не иметь складок от перегибов. Время эффективной работы невосстанавливаемых респираторов во многом определяется степенью загрязненности и влажности воздуха и обычно составляет не более 50 часов. Респираторы должны проверяться перед каждым использованием, чтобы убедиться, что в них нет никаких отверстий, кроме проколов вокруг скобы, а также других повреждений (увеличение отверстий вокруг основных проколов считается повреждением). Следует проверять также ремни и клапаны. Поврежденные респираторы должны быть уничтожены и заменены немедленно. Респираторы не следует носить за пределами лаборатории.

Надевание респиратора:

- респиратор кладут в ладонь так, чтобы носовой зажим находился у кончиков пальцев, а тесемки свободно свисали вниз;
- респиратор размещают носовым зажимом вверх так, чтобы нижний край респиратора находился под подбородком;
- тянут верхнюю тесемку на голову и размещают ее на теменной области;
- тянут нижнюю тесемку на голову и размещают ее на затылочной области ниже ушей;
- обеими руками прижимают носовой зажим к носу, нажимая внутрь и вниз с обеих сторон носового зажима; сдавливание носового зажима одной рукой может привести к неправильному размещению и снижению эффективности респиратора, поэтому всегда следует использовать две руки.

После того, как респиратор надет, нельзя прикасаться к его передней части. Сотрудники не должны сдвигать респиратор под подбородок или на голову.

Снятие респиратора:

- перед снятием респиратора снимают перчатки и тщательно моют руки;
- снимают респиратор за тесемки, не следует прикасаться к передней части респиратора.

Респираторы могут быть использованы повторно (но только одним и тем же лицом) до загрязнения, промокания или утраты формы, пока не создают значительного сопротивления дыханию. Эффективность респираторов снижается при увлажнении и загрязнении.

Респираторы не подлежат обеззараживанию теплом, дезинфицирующими растворами, спиртом или другими растворителями, ультрафиолетом или иным ионизирующим или радикал-образующим излучением. Их запрещается обрабатывать термически, помещать в зоне работающего бактерицидного облучателя, сгибать для ношения в рабочей одежде или хранения, передавать в пользование другим лицам.

Респираторы подлежат тестированию и сертификации.

Для правильного выбора размера респиратора и правильного его надевания перед первым применением индивидуального респиратора требуется проведение качественного теста на герметичность (плотность прилегания), в последующем тесты на герметичность (фит-тест) проводятся не реже одного раза в год у каждого сотрудника, при смене типа респиратора и при изменениях анатомии лица (шрамы, косметическая хирургия, выраженные изменения массы тела и др.).

2.5.5. Обращение с отходами лабораторий

Все отходы лабораторий противотуберкулезных организаций относятся к классу В (чрезвычайно опасные отходы лечебно-профилактических учреждений). Все контаминированные материалы, диагностические образцы и культуры микобактерий должны быть обеззаражены перед удалением из лаборатории или мытьем для повторного использования.

На каждом рабочем месте должны быть небьющиеся контейнеры для отходов (например, пластиковые или одноразовые контейнеры (пакеты)). Многооборотные контейнеры следует деконтаминировать и мыть перед последующим использованием.

Разбитые или использованные предметные стекла собирают в прочные контейнеры с крышками для острых предметов. Когда контейнер наполняется на 3/4, его подвергают автоклавированию.

Автоклавирование

Для стерилизации растворов или стеклянной посуды (чистые материалы) и обеззараживания инфекционного материала должны использоваться отдельные автоклавы.

Автоклавированию подлежат следующие материалы:

- инструменты, посуда, питательные среды, растворы;
- образцы диагностического материала, надсадочная жидкость, полученная в ходе предпосевной обработки материала, пробирки с посевами, культуры микобактерий;
- использованные предметные стекла;
- все инфекционные и потенциально инфекционные материалы лаборатории с умеренным и высоким риском ТБ.

Дезинфекция

Для проведения дезинфекции в лаборатории, проводящей исследования на ТБ, рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, содержащие фенол, хлор или спирты. Дезинфицирующие средства должны использоваться в соответствии с инструкциями производителей; необходимо строго соблюдать процентное содержание дезинфицирующего средства и время экспозиции, указанные в инструкции по применению, избегая образования пузырьков воздуха.

Фенол следует использовать в концентрации 5 % в водном растворе. При вдыхании или попадании на кожу фенол может вызывать раздражение кожи, глаз и слизистых оболочек. При заглатывании фенол оказывает токсическое действие. Из-за своей токсичности и запаха, как правило, вместо фенола используются его производные. Растворы фенола используются для дезинфекции оборудования и предметов

одноразового пользования перед удалением.

Хлор широко используется для дезинфекции. Раствор гипохлорита натрия (бытовой отбеливатель) содержит хлор в концентрации 50 г/л, и поэтому должен быть разбавлен водой в соотношении 1:50 или 1:10 для получения конечной концентрации 1 г/л или 5 г/л. Хлорсодержащие дезинфицирующие средства должны храниться в хорошо проветриваемом, темном месте. При хороших условиях хранения раствор 50 г/л может храниться в течение 3 месяцев, растворы в концентрации 1 г/л или 5 г/л должны готовиться ежедневно. Растворы хлора используются в качестве дезинфицирующих средств общего назначения и для замачивания загрязненных материалов, не содержащих металла, поскольку сильная щелочная реакция вызывает коррозию металла.

Спирты (этанол (денатурированный этиловый спирт, денатурат) или изопропанол) используются в 70 % растворе. Спирты являются летучими и легковоспламеняющимися и не должны использоваться вблизи открытого огня. Растворы должны храниться в плотно закрытых емкостях, чтобы избежать испарения. Флаконы со спиртосодержащими растворами должны быть четко обозначены, поскольку они не автоклавируются. 70 % растворы спиртов используются для дезинфекции рабочих поверхностей лабораторных столов и БББ для рутинной деконтаминации. Основным преимуществом водных растворов спиртов является то, что они не оставляют никаких следов на обработанных предметах. Обработка 70 % этанолом или изопропиловым спиртом с последующим тщательным мытьем с мылом и водой является эффективной при загрязнении рук.

В последние годы в продаже появилось большое количество новых современных дезинфицирующих средств, не содержащих хлор и другие токсичные вещества. Однако следует помнить, что не все они оказывают туберкулоцидное действие, поэтому перед применением каких-либо новых дезинфицирующих средств необходимо тщательно изучить инструкцию.

Не следует ошибочно полагать, что дезинфицирующие средства, пригодные для уничтожения других микроорганизмов, в равной мере будут эффективны и в отношении микобактерий.
--

При работе с микобактериями не следует использовать «антисептики с приятным запахом».

Все необходимые средства и растворы для проведения дезинфекции должны постоянно находиться в лаборатории в достаточном количестве. После приготовления рабочего раствора дезинфицирующего средства на емкости указывают его наименование, концентрацию, дату изготовления раствора и срок хранения. Растворы дезинфицирующих средств не следует хранить в разбавленном виде долгое время, так как это снижает их активность. Желательно ежедневно готовить необходимое количество свежих растворов дезинфицирующих средств.

2.6. Мероприятия, проводимые при авариях во время работы с инфекционным материалом

2.6.1. Общие положения

Аварией называют все случаи нарушения правил безопасности при работе с биологическим материалом, обуславливающие возможность заражения персонала, реальную или потенциальную опасность распространения инфекции.

Необходимо понимать, что аварии в лаборатории могут происходить, в связи с этим в каждой лаборатории до возникновения аварии должен быть разработан план действий для устранения ее потенциально опасных последствий.

В лаборатории должна постоянно проводиться оценка выполняемых лабораторных манипуляций с целью поиска путей сведения к минимуму подобных ситуаций, должны быть разработаны стандартные операционные процедуры для действий в случаях аварий и проливов. Обучение сотрудников должно проводиться по крайней мере ежегодно для того, чтобы обеспечить автоматизм действий персонала в случае аварии. При разработке стандартных операционных процедур должны быть учтены:

- определение зон высокого риска;
- определение лиц, подвергающихся риску;
- определение процедур в соответствии с уровнем риска;
- определение ответственных лиц и их обязанности;
- место наблюдения и лечения лиц, подвергшихся воздействию инцидента;
- обеспечение средств, необходимых для ликвидации последствий инцидента (защитная одежда, дезинфицирующие средства, контейнеры для устранения проливов жидкости, оборудование и расходные материалы для деконтаминации).

Никакой инцидент бактериологической лаборатории нельзя рассматривать как незначительный, в каждом случае необходима оценка ситуации для выработки надлежащих действий.

2.6.2. Набор для аварийных ситуаций

В лаборатории должно быть подготовлено 2 набора для аварийных ситуаций, один из которых должен находиться в контаминированной зоне, второй – за ее пределами.

Состав набора:

- раствор гипохлорита в непрозрачном флаконе (следует учитывать срок годности

раствора, в случае пролива большого объема жидкости можно приготовить свежий раствор);

- респиратор FFP3 (1 коробка);
- перчатки (1 коробка);
- одноразовый лабораторный халат (4-6 шт.);
- совок и щетка;
- бумажные полотенца или ветошь;
- мыло;
- контейнер для острых отходов;
- одноразовые автоклавируемые мешки;
- защитные очки (2 шт.);
- табличка с надписью, запрещающей вход в помещение после аварии.

2.6.3. Действия в случае образования аэрозоля вне БББ

Разлив инфекционного материала вне БББ является наиболее частым происшествием в лаборатории. Руководитель лаборатории должен быть немедленно проинформирован об инциденте, в течение 1 часа персонал не должен входить в лабораторию. За это время аэрозоль будет удален через систему вентиляции в лаборатории, и наиболее тяжелые частицы аэрозоля осядут. Должна быть вывешена табличка с надписью, запрещающей вход в помещение.

Порядок действий в случае образования аэрозоля вне БББ:

1. Надевают перчатки, защитный лабораторный халат и респиратор.
2. Повторно входят в зону аварии.
3. Накрывают пролив бумажными полотенцами или ветошью.
4. Обильно заливают бумажные полотенца и прилежащую зону дезинфицирующим средством (5 % раствор гипохлорита).
5. Наливать дезинфицирующее средство следует концентрическими кругами, начиная с внешней зоны пролившегося материала и постепенно продвигаясь к центру.
6. Оставляют дезинфицирующий раствор на месте происшествия на требуемое время экспозиции. Если на месте аварии есть разбитое стекло или другие острые предметы, собирают их с помощью щетки и совка или куска плотного картона и помещают в прочный контейнер.

7. Все загрязненные мелкие предметы, инструменты и материалы собирают в контейнер для обеззараживания автоклавированием.

8. Моют и дезинфицируют место пролива.

Сотрудники, подвергшиеся воздействию инцидента, должны быть направлены к врачу. Делают запись в журнале регистрации аварии, отмечая дату, время, место, характер аварии, фамилию, имя и отчество лиц, находившихся непосредственно в зоне ее воздействия, а также проведенные мероприятия.

2.6.4. Действия в случае образования аэрозоля внутри БББ

В случае пролива инфекционного материала внутри БББ его не выключают, немедленно начинают уборку.

Порядок действий в случае образования аэрозоля внутри БББ:

1. Накрывают пролив бумажными полотенцами или ветошью, обильно заливают бумажные полотенца и прилежащую зону дезинфицирующим средством.

2. Наливать дезинфицирующее средство следует концентрическими кругами, начиная с внешней зоны пролившегося материала и постепенно продвигаясь к центру.

3. Если стенки БББ были забрызганы, их следует немедленно очистить бумажными салфетками, обильно смоченными дезинфицирующим средством.

4. Оставляют дезинфицирующий раствор на месте происшествия на 30-60 минут.

5. Если на месте аварии есть разбитое стекло или другие острые предметы, аккуратно собирают их и помещают в прочный контейнер.

6. Любое оборудование или многоразовый материал (например, центрифужные стаканы), которые были забрызганы, очищают бумажными салфетками, обильно смоченными дезинфицирующим средством.

7. Перед использованием следует тщательно проверить электрическое оборудование, целостность выключателей и заземления.

8. Все загрязненные мелкие предметы, инструменты и материалы собирают в контейнер для обеззараживания автоклавированием.

2.6.5. Действия в случае аварии во время работы с центрифужой

Центрифужные стаканы следует загружать и разгружать в БББ. Если протечка случилась во время центрифугирования, разбитую пробирку следует немедленно поместить в контейнер для острых отходов для обеззараживания автоклавированием. Центрифужный стакан замачивают в дезинфицирующем средстве или автоклавируют. Для деконтаминации центрифужных стаканов не следует использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства, поскольку они вызывают коррозию.

2.7. Транспортировка инфекционных и потенциально инфекционных материалов

Общим требованием по безопасной транспортировке биологического материала является необходимость надежной упаковки для предупреждения его вытекания при ударах, повышении давления и в других ситуациях.

Для транспортировки контейнеров с образцами мокроты для предотвращения случайной протечки или проливания следует использовать вторичный контейнер с штативом внутри, плотно закрывающейся крышкой и удобной ручкой, в который помещают контейнеры с образцами биоматериала. Контейнеры для транспортировки инфицированного материала должны быть изготовлены из прочного антикоррозийного материала или пластика, устойчивого к действию дезинфицирующих средств. Дно контейнера должно быть выстлано мягким адсорбирующим материалом в количестве, достаточном для поглощения всего жидкого материала в случае его утечки. Контейнеры следует деконтаминировать после использования. Водитель машины, доставляющий диагностические пробы, должен быть обучен правилам обращения с инфекционным материалом.

При транспортировке контейнеры должны храниться в наиболее холодном месте и должны быть защищены от солнечных лучей. Рекомендуется использовать охлаждающие элементы, которые поставляются в комплекте к транспортным коробкам.

Бланки направлений на лабораторное исследование должны находиться отдельно от флаконов с материалом в чистом конверте или полиэтиленовом пакете и передаваться непосредственно в руки водителю автотранспорта, а затем медицинскому работнику, принимающему материал.

Мазки для микроскопического исследования транспортируются в специальных планшетах или боксах. Для предохранения от перекрестной контаминации они не должны соприкасаться друг с другом.

При поступлении материала, не отвечающего вышеуказанным требованиям, а также при отсутствии направления и/или маркировки (этикетки) на флаконе с материалом он подлежит уничтожению с обязательным извещением об этом организации здравоохранения, направившей материал для исследования.

Транспортировка инфекционных материалов по почте или авиатранспортом должна соответствовать принятым ООН Типовым правилам перевозки опасных грузов. Содержащиеся в них рекомендации разработаны Комитетом экспертов Организации Объединенных Наций по перевозке опасных грузов (КЭПОГ), в них изложен порядок правильного использования упаковочного материала, а также другие требования к погрузочно-разгрузочным операциям.

Система тройной упаковки, которая применяется для транспортировки инфекционных и потенциально инфекционных материалов, состоит из трех слоев: первичный контейнер, вторичная упаковка и внешняя упаковка.

Первичный контейнер, в котором находится образец, должен быть герметичным и иметь маркировку, указывающую на его содержимое. Он должен быть завернут в достаточное количество абсорбирующего материала, способного поглотить всю жидкость в случае повреждения контейнера или утечки.

Вторичная водонепроницаемая упаковка используется для защиты первичного контейнера (контейнеров). Несколько обернутых первичных контейнеров могут быть помещены в одну вторичную упаковку.

Третий слой служит для защиты вторичной упаковки от физического повреждения во время перевозки.

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ

3.1. Общие положения

Эффективность лабораторного исследования в значительной степени зависит от правильности сбора диагностического материала.

Для получения оптимальных результатов при исследовании диагностического материала необходимо соблюдать следующие условия:

- сбор материала необходимо производить до начала химиотерапии, так как даже несколько дней применения лекарственной терапии может быть достаточно для того, чтобы убить значительное количество микобактерий или снизить их жизнеспособность и исказить результаты исследования;

- материал для исследования должен собираться рано утром;

- при исследовании мокроты желательно собрать 2-3 пробы утренней мокроты в течение 2-3 последовательных дней. Это существенно повышает результативность исследования;

- собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию; в случае невозможности немедленной доставки материал сохраняется в холодильнике при 2-8 °C не более 72 часов;

- при перевозке материала необходимо особенно тщательно следить за сохранностью флаконов и правильностью их маркировки.

При отсутствии возможности доставки образцов мокроты для бактериоскопического исследования можно приготовить и доставить в лабораторию зафиксированные мазки.

3.2. Флаконы для сбора материала

К флаконам для сбора диагностического материала предъявляются следующие основные требования:

- флакон должен быть изготовлен из полипропилена (PP) высокой плотности (HD) и выдерживать центрифугирование при 3000g;
- флакон должен иметь широкое горлышко (не менее 28 мм), чтобы пациенту было удобно собирать мокроту, не загрязняя наружной поверхности флакона;
- емкость флакона должна составлять около 50 мл;
- крышка должна быть плотно завинчивающейся, чтобы предотвратить вытекание потенциально опасного материала в процессе транспортировки;
- флакон должен иметь коническое дно, что позволяет проводить центрифугирование материала, не перенося его в другую пробирку;
- флакон должен иметь градуировку с указанием объема в мл;
- флакон должен иметь поле для маркировки.

3.3. Виды диагностического материала

Поскольку наиболее частой формой туберкулезного поражения является туберкулез органов дыхания, основным материалом исследования составляют мокрота; индуцированная мокрота, полученная после аэрозольной ингаляции; бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ); материал, получаемый при бронхоскопии, транстрахеальной и внутрилегочной биопсии; аспират из трахеи и бронхов; ларингеальные мазки; экссудаты; мазки из торакальных ран; промывные воды желудка (преимущественно у детей).

3.3.1. Мокрота

В целях обеспечения мер безопасности при откашливании мокроты и предупреждения инфицирования потенциально заразными аэрозолями медицинского персонала сбор мокроты должен производиться в специально оборудованной комнате (кабине) для сбора мокроты, оснащенной бактерицидной ультрафиолетовой лампой, с хорошей вентиляцией, под непосредственным контролем медицинского персонала с обязательным проведением инструктажа о правилах сбора мокроты.

Медицинский работник должен находиться вне помещения, где проводится сбор мокроты, наблюдая за сбором мокроты через стеклянное окно в двери кабины. Если условия этого не позволяют, то сбор мокроты проводят вне помещения (на открытом воздухе) под контролем медицинского работника. Собранные образцы мокроты от

одного пациента не объединяют в одном флаконе, а направляют в лабораторию с указанием сведений о пациенте для каждой пробы.

Достаточный объем исследуемой порции мокроты составляет 3-5 мл, однако допустимо исследование и меньших по объему порций. Качественным материалом является слизистая или слизисто-гнойная мокрота, которая может содержать включения белесоватого, желтого, серого или бурого цвета.

Лаборатория не должна проводить исследования на туберкулез некачественно собранного диагностического материала (слюна и пр.).

Пробы некачественного материала отбраковываются, о чем уведомляется врач, направивший материал на исследование.

3.3.2. Индуцированная мокрота

Исследование этого материала проводится в случае невозможности самостоятельного сбора мокроты пациентом. Для аэрозольных ингаляций пользуются портативными или стационарными аэрозольными ингаляторами.

Индуцированная, т.е. полученная при аэрозольных ингаляциях, мокрота напоминает по внешнему виду и консистенции слюну. Во избежание выбраковки материала в бланке направления и на флаконе с материалом должна быть обязательная маркировка, указывающая на то, что материал получен после аэрозольной ингаляции.

3.3.3. Промывные воды желудка

Промывные воды желудка исследуют преимущественно у детей младшего возраста, которые плохо откашливают мокроту и часто проглатывают ее.

Во избежание смешивания проглоченной мокроты с пищей промывные воды желудка следует брать натощак. Последний прием пищи должен быть не менее чем за 12 часов до взятия промывных вод желудка.

Перед сбором материала пациенту дают выпить 100-150 мл стерильной дистиллированной воды. Полученный материал нейтрализуют добавлением 100 мг натрия бикарбоната, немедленно доставляют в лабораторию и подвергают обработке, чтобы исключить повреждающее действие на микобактерии содержащихся в материале желудочных ферментов.

3.3.4. Другие пробы

При внелегочных формах процесса можно выделить 2 группы диагностических материалов:

1. асептически полученный материал, обычно свободный от загрязняющей сопутствующей микрофлоры;

2. заведомо загрязненный материал из открытых очагов поражения, в отношении которого заранее известно, что он контаминирован сопутствующей микробной флорой или собран без соблюдения правил асептики.

Асептически собранный материал

К асептически собранному материалу относятся резецированные ткани, кровь, гной из холодных абсцессов, грануляции, соскобы синовиальных оболочек, лимфатические узлы или пунктаты, их содержимое, плевральная, спинномозговая, синовиальная или асцитическая жидкость.

Материал помещают в стерильный флакон без консервантов и немедленно доставляют в лабораторию. Кровь необходимо доставлять в специальных пробирках, содержащих цитрат или гепарин. Если в исследуемом образце может образоваться большой сгусток (например, в плевральной или асцитической жидкости), рекомендуется добавить к биологическому материалу в момент его сбора цитрат натрия.

Если материал не может быть немедленно доставлен в лабораторию, во избежание высыхания к нему добавляют небольшое количество стерильного изотонического раствора и помещают в холодильник при 2-8 °С.

Оптимальный объем материала для спинномозговой жидкости – 3 мл, крови – 5-10 мл.

Заведомо загрязненные материалы

Мочу (среднюю часть утренней порции, не менее 200 мл) собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование. Моча доставляется в лабораторию в тот же день, использование консервантов не допускается.

Менструальная кровь и каловые массы не являются адекватным диагностическим материалом для исследования на туберкулез; каловые массы рекомендуется исследовать только на нетуберкулезные микобактерии (НТМ) у иммунокомпроментированных пациентов.

3.4. Консервация диагностического материала

Диагностический материал должен быть доставлен в лабораторию как можно раньше.

Образцы мокроты допустимо хранить в холодильнике (2-8 °С) в течение 72 часов; другие виды биологического материала следует отправлять в лабораторию как можно скорее. При хранении образцов мокроты более 72 часов при 2-8 °С значительно

повышается уровень контаминации посевов и снижается вероятность получения положительных результатов исследования. Использовать морозильники (-20 °С) для хранения диагностического материала недопустимо.

Для консервации образцов диагностического материала могут быть использованы следующие методы:

- свежесобранный образец смешивают с равным объемом 1 % раствора цитидилпиридинхлорида в 2 % растворе хлористого натрия;

- свежесобранный образец смешивают с безводным карбонатом натрия из расчета 50 мг реактива на 2 мл биологической жидкости;

- свежесобранный образец смешивают с равным объемом 23 % раствора трехзамещенного фосфорнокислого натрия.

Ни один из перечисленных методов консервации не является оптимальным, поэтому для получения адекватных результатов следует направлять образцы в лабораторию как можно скорее.

В день поступления консервированного материала в лабораторию его центрифугируют, не подвергая обычной процедуре предварительной обработки. Осадок ресуспендируют в фосфатном буфере и засевают на питательные среды. Посев консервированного диагностического материала в автоматизированные системы детекции микобактерий не проводится, поскольку методика деконтаминации отличается от рекомендованной для использования при работе с автоматизированными системами.

3.5. Прием и распаковка диагностического материала

Микробиологическое и микроскопическое исследование проводится только при наличии письменного направления на исследование.

Распаковка материала, присланного в лабораторию для исследования, должна проводиться с соблюдением мер предосторожности.
--

Прием диагностического материала производится в БББ или вытяжном шкафу с соблюдением следующих правил:

- прием поступающих проб и их осмотр следует проводить в одноразовых перчатках и респираторе;

- аккуратно открыть крышку контейнера и проверить нет ли на поверхности флаконов следов протечки материала. Ни в коем случае нельзя использовать поврежденные флаконы (разбитые или с трещинами). В случае повреждения флаконов во время транспортировки или при наличии следов протечки необходимо провести

обеззараживание поврежденного флакона автоклавированием, продезинфицировать наружную и внутреннюю поверхность транспортного контейнера тампоном, смоченным дезинфектантом, обладающим туберкулоцидным действием, и запросить новый образец;

- проверить наличие маркировки на боковой поверхности флакона;

- проверить наличие идентификационного номера маркировки на флаконах с материалом и их соответствие номеру, указанному в направлении на исследование;

- удостовериться, что полученные образцы сопровождаются полно и правильно заполненной формой направления на бактериологическое исследование. Образцы, которые не идентифицированы точно, не должны приниматься на исследование;

- продезинфицировать внутреннюю поверхность транспортировочного контейнера;

- внести сведения о каждом образце в регистрационный лабораторный журнал, присвоив каждому образцу регистрационный лабораторный номер.

Для лаборатории важно дифференцировать образцы, полученные в диагностических целях, от образцов, полученных для мониторинга лечения. Это позволяет надлежащим образом интерпретировать результаты и определять последовательность необходимых бактериологических исследований для каждого пациента. Нехватка этой информации исключает использование контроля результатов бактериологических исследований как метода внутренней проверки качества.

Задержки транспортировки и/или транспортировка образцов в условиях экстремальных температур без защитных мер должны быть зарегистрированы и отмечены на бланке.

В лабораторном регистре (журнале) регистрируют всю необходимую дополнительную информацию, касающуюся образца.

4. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ

4.1. Общие положения

Микроскопическое исследование мазка мокроты для обнаружения кислотоустойчивых бактерий (КУБ) проводится с целью выявления наиболее эпидемически опасных пациентов, больных туберкулезом легких.

Метод микроскопии является наиболее быстрым, простым и менее затратным методом выявления и оценки содержания КУБ в нативном материале (чаще всего в мокроте) без предварительной его обработки и гомогенизации. Преимущества микроскопии, заключающиеся в скорости получения результата, относительной

простоте, доступности исследования и экономической эффективности, делают его незаменимым для выявления большинства пациентов, больных туберкулезом легких.

Микроскопическое исследование мазков мокроты, окрашенных по Цилю-Нильсену, позволяет выявить КУБ в случае наличия их в количестве 10 000 и более в 1 мл мокроты. Отрицательный результат не исключает диагноз туберкулеза, так как в мокроте может содержаться количество микобактерий ниже предела обнаружения методом микроскопии.

Основным диагностическим материалом для микроскопии на КУБ служит мокрота. Результаты микроскопического исследования на КУБ других биологических материалов (различных жидкостей, гноя, мочи и т.д.) имеют ограниченное значение.

Так, исследование мазков из осадка центрифугированной мочи не всегда позволяет получить достоверные результаты, поскольку в моче могут присутствовать нетуберкулезные микобактерии. Этот факт в некоторых случаях объясняется неправильным сбором материала. В мазках из осадка промывных вод желудка и других материалов могут обнаруживаться кислотоустойчивые сапрофиты, которые легко спутать с МБТ. Поэтому при необходимости выявления возбудителя туберкулеза в различных биологических материалах рекомендуется использовать культуральный метод исследования.

4.2. Приготовление мазков

На практике используются 2 метода приготовления мазков:

- метод прямой микроскопии, когда мазок готовится непосредственно из необработанного диагностического материала или его осадка, если материал жидкий;
- метод микроскопии мазка из осадка материала, подготовленного для культурального исследования после разжижения, деконтаминации, концентрирования и ресуспендирования осадка.

Процедура приготовления мазка начинается с подготовки предметных стекол. Необходимо использовать только одноразовые новые отмытые, обезжиренные (в спирте или смеси Никифорова (96° этиловый спирт + эфир в соотношении 1:1)) стекла без царапин и сколов.

Стекло подписывают простым карандашом по матовой полосе либо алмазным карандашом по стеклу. Номер, проставленный на стекле, должен соответствовать номеру исследования в лабораторном регистрационном журнале.

4.2.1. Приготовление мазков из нативного материала

Флакон открывают аккуратно, избегая разбрызгивания аэрозоля, содержащего МБТ. Микобактерии чаще обнаруживаются в плотных гнойных комочках мокроты.

Результат исследования в большой степени зависит от правильного выбора этих комочков.

Обожженной в пламени спиртовки и охлажденной бактериологической петлей, одноразовой бактериологической петлей или сломанными концами деревянной палочки (новой для каждой порции мокроты) захватывают небольшое количество мокроты с гнойными комочками. Плотнo прижав петлю или палочку перпендикулярно к стеклу, мелкими круговыми движениями распределяют гнойный комочек мокроты на поверхности предметного стекла как можно более тонким слоем на площади приблизительно 1-2 см х 2-3 см в виде овала.



Рисунок 4.1 - Приготовление мазка мокроты

Если мокрота очень вязкая, небольшой гнойный комочек захватывают пинцетом, осторожно отрезают ножницами и наносят его на середину предметного стекла. Толщина мазка в высушенном неокрашенном состоянии должна быть такой, чтобы можно было прочитать газетный шрифт, расположенный за стеклом на расстоянии 5-10 см. Если мазок слишком тонкий, при микроскопическом исследовании можно получить ложноотрицательный результат. Если мазок слишком толстый, он может быть смыт с предметного стекла при окраске. На одном предметном стекле делают только один мазок.

Использованные для приготовления мазка палочки или одноразовую бактериологическую петлю сбрасывают в емкость с дезинфицирующим раствором или в контейнер с отработанным инфекционным материалом. Пинцет и ножницы обжигают в пламени горелки.

Приготовление мазков для микроскопического исследования является относительно опасной процедурой, во время которой может происходить рассеивание аэрозолей, содержащих возбудитель. В случае, когда мазок готовят с помощью бактериологической петли, необходимо обжигать петлю после каждой манипуляции в пламени спиртовой или газовой горелки до тех пор, пока она не станет красного цвета. Перед повторным использованием петлю тщательно прокаливают в пламени горелки, которое при этом должно быть бесцветным или голубым. Предпочтительнее использовать одноразовые бактериологические петли.

4.2.2. Приготовление мазка из осадка материала

Мазки из осадка материала готовят из полученного после центрифугирования осадка любого жидкого материала (БАЛЖ, промывные воды желудка, экссудат и др.). Для приготовления мазка к осадку добавляют 1 мл фосфатного буфера, ресуспендируют. На стекло наносят 1-2 капли ресуспендированного осадка, распределяя его тонким слоем в центре стекла на площади приблизительно 1-2 см х 2-3 см.

Необходимо иметь в виду, что мазки из осадка жидкого материала легко смываются в процессе окраски. Поэтому их желательно готовить на стеклах, предварительно обработанных сывороткой или бычьим сывороточным альбумином, который наносят ватным тампоном на чистые обезжиренные предметные стекла, равномерно распределяя на 2/3 их поверхности. Обработанные сывороткой стекла высушивают при комнатной температуре. Стекла готовят заранее; срок хранения таких стекол - до 5 суток.

Не рекомендуется готовить мазки способом «растяжки» материала между двумя предметными стеклами. Такой способ значительно увеличивает площадь мазка и более чем в 2 раза снижает возможность обнаружения КУБ.

4.3. Фиксация мазков

Приготовленные мазки высушивают при комнатной температуре до высыхания в вытяжном шкафу или БББ.

Не допускается подсушивание или фиксация сырых мазков над пламенем горелки.

Лаборант должен планировать свой рабочий день таким образом, чтоб закончить приготовление, фиксацию, окраску и просмотр препаратов к концу дня. Если исследование не удастся закончить, предметные стекла с мазками оставляют на ночь в закрытой коробке. Нефиксированные мазки ни в коем случае не должны оставаться открытыми на ночь в рабочем помещении.

Для фиксации мазков можно использовать следующие методические приемы:

1. Стекла с высохшими мазками фиксируют трехкратным проведением их в течение 3-5 секунд через верхнюю треть пламени спиртовки до исчезновения признаков запотевания стекла.

2. Стекла с высохшими мазками помещают на электронагреватель для сушки предметных стекол при температуре 65-75 °С на время не менее 1 часа.

3. Стекла с высохшими мазками помещают в сушильный шкаф при температуре 105 °С на 10 минут.

4.4. Окраска мазков по методу Циля-Нильсена

4.4.1. Приготовление растворов

Микобактерии, в том числе микобактерии туберкулеза, сохраняют окраску карболовым фуксином после обесцвечивания раствором серной кислоты или солянокислого спирта, поэтому их называют кислотоустойчивыми. Для облегчения выявления кислотоустойчивых организмов проводят докрашивание фона препарата метиленовым синим.

Используемые красители нередко содержат различные примеси, поэтому при приготовлении растворов красителей нужно учитывать содержание красящего вещества. Навеску рассчитывают путем деления необходимого количества краски на десятичный эквивалент содержания красящего вещества.

Пример. Нужно взвесить 3 г краски, содержащей 75 % (десятичный эквивалент 0,75) красящего вещества. Следует разделить необходимое количество на содержание красящего вещества: $3 \text{ г} : 0,75 = 4 \text{ г}$. Следовательно, нужно взвесить 4 г краски.

Если содержание красящего вещества составляет 88 % и более, пересчитывать навеску не нужно.

Кристаллы фенола бесцветные, если они имеют коричневатый цвет, их не следует использовать, так как в этом случае качество окраски может быть неудовлетворительным.

Реактивы:

1. Окрашивающий раствор (3 % раствор фуксина).

Раствор 1. Раствор основного фуксина:

Основной фуксин - 0,3 г

96° этиловый спирт - 10 мл

Растворяют основной фуксин в спирте.

Раствор 2. Раствор фенола 5 %-й водный:

Кристаллический фенол - 5,0 г

Дистиллированная вода - 100 мл

Медленно нагревают кристаллы фенола во флаконе до жидкого состояния на водяной бане и добавляют слегка подогретую дистиллированную воду.

Рабочий раствор:

Смешивают 10 мл раствора 1 и 90 мл раствора 2, переливают в темную бутылку. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения.

Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Перед использованием раствор следует профильтровать.

2. Обесцвечивающий раствор (раствор 3 % солянокислого спирта):

Концентрированная соляная кислота – 3 мл

96° этиловый спирт – 97мл

Аккуратно добавляют концентрированную соляную кислоту к спирту в темной бутылки. Не следует вливать спирт в кислоту! Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

Вместо 3 % раствора солянокислого спирта для обесцвечивания можно использовать 25 % раствор серной кислоты.

Обесцвечивающий раствор (25 % раствор серной кислоты):

Концентрированная серная кислота – 25 мл

Дистиллированная вода – 75 мл

Аккуратно добавляют концентрированную серную кислоту к воде, наслаивая ее по стенке сосуда. Не следует вливать воду в кислоту! Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

3. Докрашивающий раствор (3 % раствор метиленового синего):

Хлорид метиленового синего – 0,3 г

Дистиллированная вода – 100 мл

Растворяют хлорид метиленового синего в дистиллированной воде. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

4.4.2. Процедура окраски

1. Промаркированные и зафиксированные мазки помещают на подставку («рельсы») так, чтобы они не касались друг друга. Не следует окрашивать одновременно более 12 стекол.

2. На каждый мазок накладывают полоску фильтровальной бумаги. На всю поверхность фильтровальной бумаги, покрывающей стекло, наливают окрашивающий раствор.

3. Медленно нагревают препарат над пламенем горелки до легкого появления

паров. Не допускается закипание или полное испарение окрашивающего раствора на предметном стекле. Если раствора недостаточно, его нужно добавить еще и нагреть во второй раз.

4. Прогретый мазок оставляют на 5 минут, не допуская полного испарения жидкости, после чего фильтровальную бумагу удаляют пинцетом и помещают ее в контейнер для отходов.

5. Каждое предметное стекло аккуратно ополаскивают отдельно под слабой струей воды до полного удаления окрашивающего раствора. Не разрешается смывать и обесцвечивать одновременно несколько мазков во избежание перекрестной контаминации.

6. На стекла с мазками наливают обесцвечивающий раствор, полностью покрывая всю поверхность мазка, оставляют на 3 минуты.

7. Осторожно промывают каждое предметное стекло, как описано выше.

8. Обесцвеченный мазок докрашивают 0,3 % раствором метиленового синего в течение 60 секунд.

9. Промывают стекла водой, удаляют остатки влаги.

10. Оставляют препарат на воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении для высыхания. Не следует промокать препарат.

4.4.3. Настройка микроскопа

Путем вращения макровинта отдалают объектив от предметного столика. Вращая револьвер, устанавливают объектив с малым увеличением (5x или 10x) точно над конденсором. Предметное стекло размещают на предметном столике прямо под объективом. Глядя сбоку для контроля расстояния между стеклом и линзой объектива, медленно вращая макровинт, опускают объектив к предметному стеклу, не касаясь линзой препарата.

Глядя через окуляры, регулируют интенсивность светового потока источника света. Поворачивают макровинт, чтобы линза объектива отошла от предметного столика до получения резкого изображения. Поворачивают макровинт, чтобы получить более четкое изображение.

Глядя на препарат сбоку, выбирают объектив с большим увеличением (100x). Следует убедиться, что объектив не касается предметного стекла. Аппликатором (пипеткой) капают одну каплю иммерсионного масла на препарат, не касаясь стекла. Во избежание загрязнения иммерсионного масла и получения ложноположительного результата нельзя прикасаться пипеткой капельницы масла к мазку, капля масла должна свободно упасть на стекло. Опускают объектив до соприкосновения с каплей масла. Медленно поднимают объектив, пока не появится изображение. Настраивают изображение, используя макровинт.

4.4.4. Методика исследования препаратов

Для исследования мазков, окрашенных по методу Циля-Нильсена, следует использовать световой бинокулярный микроскоп с объективом (100x) с масляной иммерсией и окуляром (10x) (общее увеличение 1000x). Следует использовать только синтетическое иммерсионное масло с коэффициентом преломления $n_D = 1,5$.

Ниже представлена рекомендуемая процедура просмотра мазка; линии со стрелками обозначают направление просмотра.

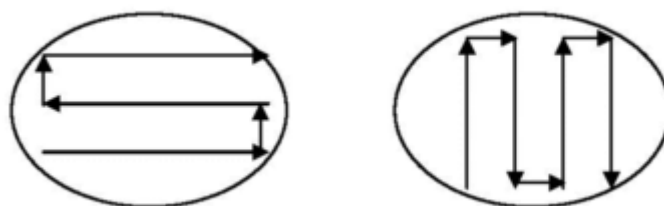


Рисунок 4.2 - Просмотр мазка при микроскопическом исследовании

Подходящими считают поля зрения, в которых видны клеточные элементы бронхиального происхождения (лейкоциты, слизистые тяжи, клетки эпителия). Поля зрения, не содержащие таких элементов, не учитываются. Количество полей зрения по длине мазка около 2 см соответствует как минимум 100-120. В случае, когда результат такого исследования оказывается отрицательным, для подтверждения рекомендуется просмотреть дополнительно еще 200 полей зрения. Таким образом, изучается 300 полей зрения. При значительном количестве КУБ в мазке (2+) достаточно исследовать 50 полей зрения, для мазка КУБ 3+ достаточно просмотреть 20 полей зрения.

По окончании микроскопического исследования каждого препарата для удаления иммерсионного масла необходимо поместить мазок в вытяжной шкаф, накрыть полоской фильтровальной бумаги и смочить ее несколькими каплями ксилола. Через 2-3 минуты фильтровальную бумагу удаляют. Очищенный от иммерсионного масла препарат следует хранить в коробке для просмотренных положительных или отрицательных препаратов. После просмотра каждого препарата следует тщательно протирать объектив микроскопа от иммерсионного масла безворсовыми салфетками, чтобы предотвратить контаминацию следующего мазка. Марлевые салфетки затем опускают в бак для отходов.

Кислотоустойчивые бактерии - тонкие малиново-красные палочки длиной 1-10 (чаще 1-4) мкм, шириной 0,2-0,6 мкм, слегка изогнутые, более или менее зернистые. Микобактерии располагаются изолированно, либо парами, или в виде групп, хорошо видны на голубом фоне мазка.

Кислотоустойчивость, выявляемая при окрашивании по Цилю-Нильсену, свойственна не только разным видам микобактерий, но и другим микроорганизмам, например, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, а также цистам *Cryptosporidium* и *Isospora*. Быстрорастущие микобактерии могут различаться по степени кислотоустойчивости, иногда они могут окрашиваться в фиолетово-малиновый цвет. В сомнительных случаях рекомендуется длительно (в течение 45–60 минут) обесцвечивать мазок в солянокислом спирте. Сапрофиты при этом теряют окраску и выглядят в виде палочек голубого цвета.

4.4.5. Учет и интерпретация результатов микроскопии по Цилю-Нильсену

Подсчитывают количество КУБ в мазке. Количество обнаруженных КУБ определяет тяжесть заболевания и степень эпидемической опасности больного. Следовательно, исследование должно быть не только качественным, но и количественным. Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится в соответствии с таблицей 4.1.

Таблица 4.1 - Градация результатов микроскопического исследования при окраске по Цилю-Нильсену

Количество кислотоустойчивых бактерий (КУБ)	Минимальное число иммерсионных полей зрения, обязательных для просмотра	Форма записи результатов	Интерпретация результатов исследования
КУБ не обнаружены	300	Отр.	Отрицательный
1-2 КУБ в препарате	300	Рекомендуется повторить исследование	Результат не оценивается
От 3 до 9 КУБ в 100 полях зрения	100	Указать точное количество (3-9 КУБ в 100 п/з)	Положительный
От 10 до 99 КУБ в 100 полях зрения	100	1+	Положительный
От 1 до 10 КУБ в 1 поле зрения	50	2+	Положительный
Более 10 КУБ в 1 поле зрения	20	3+	Положительный

4.4.6. Регистрация результатов исследования

Результаты микроскопического исследования регистрируются в лабораторном регистрационном журнале учета микроскопических исследований и на бланках направления на исследование. Результаты микроскопии следует отослать в медицинское учреждение, приславшее пробы, как можно быстрее, желательно в течение 24 часов с момента получения проб мокроты. В бланке результата исследования должны быть приведены следующие сведения:

- паспортные данные пациента;
- наименование учреждения исполнителя и отправителя;
- характеристика качества материала;
- использованный метод окраски;
- количество КУБ в мазке;
- дата исследования и фамилия сотрудника, проводившего исследование.

Мазок с обнаруженными КУБ является документом, от которого зависит постановка диагноза туберкулеза легких у конкретного человека. Его следует хранить в лаборатории, а результаты необходимо подтвердить повторным исследованием.

4.5. Окраска мазков флуорохромными красителями

4.5.1. Общие положения

Флуоресцентная микроскопия - оптическое исследование объектов, окрашенных специальными красителями (флуорохромами), испускающими свечение при воздействии ультрафиолетовыми лучами.

Флуорохромные красители (аурамин О, родамин С и др.) связываются с воскоподобными структурами бактериальных клеток, которые при облучении ультрафиолетовыми лучами видны как флуоресцирующие палочки желтого или оранжевого цвета на темном фоне.

Преимущество флуоресцентного метода микроскопии заключается в возможности просмотра большей площади мазка, что связано с использованием объектива с меньшим увеличением.

Аурамин обладает канцерогенной активностью, поэтому не следует допускать попадания на кожу его порошка или раствора. Взвешивать аурамин нужно, надев виниловые перчатки или 2 пары обычных перчаток и защитные очки. Для защиты дыхательной системы рекомендуется использование респиратора. Помещение после взвешивания следует проветривать. Готовить раствор и проводить окраску мазков следует только в вытяжном шкафу.

При окраске мазков флуорохромными красителями необходимо:

- избегать неполного обесцвечивания;
- готовить достаточно тонкие мазки, поскольку излишняя толщина мазка препятствует качественному обесцвечиванию, а дополнительное докрасивание может

скрыть наличие микобактерий. Кроме этого, толстые мазки плохо фиксируются на предметном стекле, в силу чего могут быть смыты в процессе окрашивания;

- избегать чрезмерно интенсивного докрасивания, скрывающего наличие микобактерий.

Так как со временем флуоресцентная окраска может поблекнуть, микроскопию производят по возможности сразу же после окончания процедуры окраски и высыхания мазков. В случае невозможности проведения микроскопии непосредственно после окрашивания, допускается хранение окрашенных мазков в темном месте, желательно в холодильнике не более 24 часов.

4.5.2. Приготовление реактивов

Реактивы:

1. Окрашивающий раствор

Раствор 1. Спиртовой раствор аурамина О:

Аурамин - 0,1г

Этиловый спирт 96° -10 мл

Растворяют аурамин в спирте.

Раствор 2. Раствор фенола:

Фенол кристаллический - 3,0 г

Дистиллированная вода - 87 мл

Кристаллы фенола (температура плавления 41 °С) растворяют в дистиллированной воде, подогревая на водяной бане.

Рабочий раствор:

В вытяжном шкафу смешивают растворы 1 и 2, переливают в плотно закрывающуюся емкость из темного стекла. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в емкости из темного стекла в прохладном затемненном месте в течение 3 месяцев. В процессе хранения раствор может стать мутным, однако это не влияет на качество окрашивания.

2. Обесцвечивающий раствор (раствор 0,5 % солянокислого спирта):

Концентрированная соляная кислота - 0,5 г

Этиловый спирт 96° -100 мл

Аккуратно добавляют концентрированную соляную кислоту в этиловый спирт.

Следует осторожно влить кислоту в спирт, но не наоборот. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в емкости из темного стекла при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

3. Докрашивающий раствор

Для докрашивания можно использовать растворы перманганата калия, акридинового оранжевого или метиленового синего.

Раствор перманганата калия:

Перманганат калия (KMnO_4) - 0,5г

Дистиллированная вода - 100 мл

Растворяют перманганат калия в дистиллированной воде и переливают в плотно закрывающуюся бутылку из темного стекла. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в емкости из темного стекла при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

Раствор акридинового оранжевого:

Безводный двузамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4) - 0,01 г

Акридиновый оранжевый - 0,01 г

Дистиллированная вода - 100 мл

Растворяют фосфат натрия в дистиллированной воде. Добавляют акридиновый оранжевый. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в емкости из темного стекла при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

Раствор метиленового синего:

Метиленовый синий хлорид - 25 мг

Вода дистиллированная - 100 мл

25 мг метиленового синего хлорида растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Указывают на этикетке название реактива, дату приготовления и срок хранения. Раствор можно хранить в емкости из темного стекла при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

4.5.3. Процедура окраски

Промаркированные и зафиксированные мазки помещают на подставку («рельсы») так, чтобы они не касались друг друга. Не следует окрашивать одновременно более 12 стекол.

На каждое стекло наливают через воронку с бумажным фильтром окрашивающий раствор на 15–20 минут. Не следует подогревать мазки и пользоваться полосками фильтровальной бумаги.

Промывают мазок дистиллированной водой. Водопроводная вода содержит соединения хлора, которые могут повлиять на флюоресценцию.

На стекло наливают обесцвечивающий раствор, оставляют на 2 минуты.

Промывают мазок дистиллированной водой.

Обесцвеченный мазок докрашивают раствором перманганата калия, акридинового оранжевого или метиленового синего с использованием воронки с бумажным фильтром в течение 2 минут.

Промывают мазок дистиллированной водой.

Оставляют препарат на воздухе при комнатной температуре в вертикальном или наклонном положении для высыхания. Не следует промокать препарат. Возможно высушивание мазков в сухожаровом шкафу малого объема при 110 °С в течение 10 минут.

При использовании перманганата калия время его воздействия не должно превышать 2 минуты. Точность экспозиции имеет решающее значение, так как при превышении времени экспозиции интенсивность флуоресценции может уменьшаться.

4.5.4. Учет результатов при окрашивании флуорохромными красителями

Учет результатов микроскопического исследования при окраске флуорохромными красителями осуществляется при значительно меньшем увеличении (обычно 400х), чем увеличение, используемое для просмотра мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену (1000х). Поэтому поле зрения, просматриваемое под люминесцентным микроскопом, имеет значительно большую площадь, чем поле зрения светового микроскопа. Следовательно, количество КУБ в 100 полях зрения препарата, окрашенного флуорохромами и просмотренного при увеличении в 400 раз, будет значительно выше, чем при исследовании этого же препарата, окрашенного по Цилю-Нильсену и просмотренного при увеличении в 1000 раз.

При микроскопировании препарата, окрашенного флуорохромными красителями, следует просматривать не менее 40 полей зрения. Просмотренная площадь мазка при микроскопии 40 полей зрения с увеличением х400 равна площади 100 полей зрения с увеличением х1000 или одной линии мазка, равной 2 см.

Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится в соответствии с таблицей 4.2.

Таблица 4.2 - Градация результатов микроскопического исследования при

окраске флуорохромами

Количество кислотоустойчивых бактерий (КУБ)	Минимальное число полей зрения, обязательных для просмотра	Форма записи результатов	Интерпретация результатов исследования
КУБ не обнаружены	40	Отр.	Отрицательный
От 1 до 99 КУБ в 40 полях зрения	40	Указать точное количество (1-9 КУБ в 40 п/з)	Положительный
От 20 до 199 КУБ в 40 полях зрения	40	1+	Положительный
От 5 до 50 КУБ в 1 поле зрения	5	2+	Положительный
Более 50 КУБ в 1 поле зрения	5	3+	Положительный

4.6. Внутренний контроль качества микроскопического исследования на КУБ

4.6.1. Внутренний контроль качества микроскопического исследования

Внутренний контроль качества микроскопического исследования проводится при окрашивании каждой партии мазков.

С этой целью исследуются контрольные (заведомо положительные и отрицательные мазки), которые готовят заранее, фиксируют и хранят в закрытом контейнере.

Для подготовки контрольных мазков желательно использовать настоящие пробы мокроты, однако допустимо добавлять к пробам мокроты суспензию микобактерий туберкулеза (для положительных мазков) или кишечной палочки или других некислотоустойчивых палочек (для отрицательных мазков).

Из каждого образца мокроты готовят по крайней мере по 20 мазков, максимально идентичных по размеру и толщине, маркируя каждую серию мазков одним и тем же идентификационным номером. Мазки окрашивают, просматривают 2-3 мазка из каждой серии, отмечают среднее количество КУБ для КУБ+ мазков в журнале контроля качества.

Включают положительные и отрицательные контрольные мазки в каждую партию окрашиваемых мазков. Микроскопию контрольных мазков следует проводить перед микроскопией мазков от пациентов.

Исследуют контрольные мазки, отмечают результаты в журнале контроля качества, регистрируя номер партии красителя и/или дату приготовления раствора.

Неудовлетворительными результатами контроля являются следующие:

1. микроскопическое исследование по Цилю-Нильсену:

- в положительном контрольном мазке КУБ окрашены неярко или их количество

слишком мало;

- фон положительного контрольного мазка остается красным;
- в отрицательном контрольном мазке обнаруживаются КУБ;
- в мазках присутствуют конгломераты красителя.

2. микроскопическое исследование с окраской флуорохромами:

- в положительном контрольном мазке КУБ окрашены в неяркий желтый цвет или их количество слишком мало;
- фон отрицательного контрольного мазка остается ярко-желтым после обесцвечивания;
- фон слишком темный или содержит слишком много флуоресцирующих артефактов;
- в отрицательном контрольном мазке обнаруживаются КУБ.

Если при проведении контроля качества отмечаются проблемы хотя бы по одному из вышеперечисленных пунктов, следует выяснить, имели ли место проблемы с приготовлением растворов, и повторить окраску двух отрицательных и двух положительных контрольных мазков, принимая во внимание возможные ошибки. Если при повторном окрашивании имеют место неудовлетворительные результаты, следует приготовить новые растворы красителей.

4.6.2. Причины, снижающие результативность микроскопического исследования

- неправильная маркировка флаконов с мокротой (например, при маркировке крышки флакона, а не самого флакона);
- отсутствие маркировки на стекле или повреждение ее в процессе окраски, ошибки при маркировании образцов;
- отсутствие бинокулярного микроскопа; плохое состояние или плохая настройка микроскопа;
- недостаточная подготовка персонала;
- технические ошибки при записи или передаче результатов исследования;
- неправильная регистрация результатов.

Неправильные результаты могут быть обусловлены ошибками лабораторных работников, связанными преимущественно с физическими и психологическими причинами (так называемый «человеческий фактор»). Многие ошибки, возникающие

при неправильном учете результатов микроскопии мазков мокроты, можно предупредить при осуществлении постоянного централизованного контроля работы по микроскопической диагностике туберкулеза курирующими бактериологическими лабораториями при правильном обучении и периодической переподготовке лабораторных работников.

4.6.3. Возможные причины ложноположительных результатов:

- повторное использование контейнеров или предметных стекол;
- раствор красителя приготовлен с использованием воды, содержащей сапрофитные микобактерии;
- использование непрофильтрованного или длительно хранившегося окрашивающего раствора, содержащего преципитаты и кристаллы;
- несоблюдение методики окрашивания мазков;
- кросс-контаминация КУБ вследствие отсутствия промежутков между соседними окрашиваемыми стеклами;
- неадекватное обесцвечивание;
- неправильная интерпретация результатов микроскопии, когда вследствие недостатка опыта наличие в мазке кристаллов плохо профильтрованного красителя расценивается как КУБ+;
- плохое состояние или плохая настройка микроскопа;
- контаминация иммерсионного масла.

4.6.4. Возможные причины ложноотрицательных результатов:

- низкое качество образца мокроты;
- недостаточный объем образца мокроты, взятого для подготовки мазка;
- неправильный выбор комочков мокроты для приготовления мазка;
- нарушение методики приготовления мазка (слишком тонкий или толстый), плохая его фиксация;
- плохое качество красителей;
- несоблюдение методики приготовления растворов;
- недостаточное время экспозиции с окрашивающим раствором;
- чрезмерное обесцвечивание;

- слишком сильное докрасивание;
- перегревание в ходе окрашивания;
- чтение менее 100 полей зрения, хаотичный или недостаточно тщательный просмотр;
- слишком длительная экспозиция окрашенных мазков при дневном освещении;
- слишком длинный интервал между окрашиванием и чтением, особенно если мазки были плохо окрашены и не хранились в темноте.

5. СТАНДАРТНЫЕ МЕТОДЫ РАЗЖИЖЕНИЯ И ДЕКОНТАМИНАЦИИ

5.1. Общие положения

Культуральное исследование на туберкулез должно выполняться в максимально возможное число дней в неделю. Каждый день задержки посева образца уменьшает вероятность получения положительного результата. Поэтому не следует проводить посев более чем через 7 дней от момента сбора образца. Если ожидается задержка транспортировки образца, следует использовать методы консервации. Обработка и посев промывных вод желудка от детей должна проводиться в максимально короткие сроки.

Большинство проб клинического материала, поступающего в бактериологическую лабораторию для культурального исследования на туберкулез, контаминированы в различной степени более быстро растущими бактериями, являющимися частью нормальной микрофлоры организма человека. Поэтому большинство клинических образцов следует до проведения исследования на туберкулез подвергнуть специальной обработке, необходимой для разжижения пробы и ее деконтаминации, т.е. удаления нежелательной микрофлоры. Особенностью *M. tuberculosis* является способность их долгое время находиться в жидкостях во взвешенном состоянии, поэтому все жидкие материалы подлежат обязательному центрифугированию при $\geq 3000g$. Все последующие манипуляции выполняют с полученным осадком.

Все химические вещества, используемые в настоящее время для гомогенизации и деконтаминации клинического материала, обладают более или менее выраженной токсичностью по отношению к микобактериям. Интенсивность контаминации проб может варьировать в значительной степени, поэтому необходимо выбирать способ деконтаминации соответственно исследуемому материалу. Выбор метода деконтаминации зависит также от того, как давно была взята проба и в каких условиях она хранилась и транспортировалась в лабораторию.

При выполнении посевов на микобактерии туберкулеза необходимо иметь в виду три важных аспекта:

1. Клинические образцы должны быть гомогенизированы, чтобы освободить

микобактерии туберкулеза из тканей, в которых они могут находиться.

2. Ни гомогенизация, ни деконтаминация не должны существенно уменьшать содержание жизнеспособных микобактерий туберкулеза в диагностическом материале.

3. Успех гомогенизации и деконтаминации зависит от ряда факторов:

- повышенной устойчивости микобактерий к резкощелочной или кислой реакции растворов, используемых для гомогенизации материала;

- продолжительности обработки материала этими веществами;

- температуры образца в процессе его центрифугирования;

- эффективности центрифугирования, используемого для осаждения микобактерий.

Процедура предпосевной обработки должна быть максимально щадящей, обеспечивающей частоту контаминации, не превышающую 5 % для плотных сред и 8-10 % для жидких.

Всю процедуру деконтаминации проводят только в БББ II класса. Поскольку продолжительность обработки материала должна строго соблюдаться, целесообразно проводить одновременную обработку не более 8-12 проб.

Если возникают сомнения в контаминации асептически собранных проб, можно провести посев части пробы без какой-либо предварительной обработки на неселективную питательную среду (например, на простой питательный агар) и инкубировать в течение 24 часов для того, чтобы проконтролировать наличие в образце контаминирующих бактерий. Остальную часть пробы хранят без какой-либо обработки в холодильнике до тех пор, пока не будет подтверждено отсутствие контаминирующих бактерий. Если при этом будет установлен факт контаминации, оставшуюся часть пробы необходимо деконтаминировать одним из описанных ниже методов.

Для предпосевной обработки диагностического материала используют только стерильные растворы детергентов, щелочей и кислот. Для обработки и посева материала используют только стерильную посуду (контейнеры для сбора диагностического материала, центрифужные пробирки, пипетки и т.д.).

Надосадочную жидкость, полученную в результате центрифугирования, сливают в контейнер с воронкой, что уменьшает разбрызгивание жидкости и образование аэрозоля. Использованные пипетки помещают в емкость с дезинфицирующим раствором либо в автоклавируемые пакеты. Вся загрязненная лабораторная посуда с биологическими жидкостями и использованные расходные материалы утилизируются

автоклавированием.

5.2. Обработка мокроты

5.2.1. Обработка с использованием N-ацетил-L-цистеина и гидроксида натрия (NALC-NaOH)

Метод NALC-NaOH является оптимальным методом деконтаминации, так как применяется при посевах на плотные и в жидкие питательные среды, в том числе в автоматизированные системы детекции микобактерий. При правильном использовании данный метод позволяет получить больше положительных результатов культурального исследования, чем любой другой метод.

Применение муколитического препарата N-ацетил-L-цистеина, используемого для быстрого разжижения мокроты, позволяет снизить концентрацию деконтаминирующего вещества (NaOH) до конечной концентрации 1 % при смешивании с пробой. Ацетилцистеин в растворе быстро теряет активность, поэтому раствор нужно готовить ежедневно. Цитрат натрия включен в литическую смесь для связывания ионов тяжелых металлов, которые могут присутствовать в пробе и инактивировать действие N-ацетил-L-цистеина.

Необходимо строго соблюдать рекомендованное время экспозиции; кроме того, для уменьшения концентрации токсических веществ, которые могут угнетать рост микобактерий туберкулеза, следует при ресуспендировании осадка разводить его в соотношении 1:10.

NALC вызывает только разжижение образцов мокроты и не имеет деконтаминирующих свойств. Поэтому для других биологических материалов (моча, смывы, ликвор и др.) деконтаминацию следует проводить без добавления NALC (только раствором гидроксида натрия и цитрата натрия).

Реактивы

а) 4 % раствор гидроксида натрия (NaOH)

б) 2,9 % раствор цитрат натрия $\times 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, MW 294.10)

или 2,6 % безводный раствор цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, MW 258.07)

в) N-ацетил-L-цистеин (NALC)

г) фосфатный буфер, 0.067 М/л, pH 6.8:

Na_2HPO_4 (или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)

KH_2PO_4

Приготовление растворов

а) 4 % NaOH. Растворяют 4 г NaOH в 100 мл дистиллированной воды.

б) 2,9 % цитрат натрия х 2H₂O. Растворяют 2,9 г цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды или 2,6 % цитрат натрия. Растворяют 2,6 г цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды.

Смешивают 100 мл раствора NaOH и 100 мл раствора цитрата натрия.

Этот раствор после стерилизации автоклавированием при 121°C в течение 15 минут можно хранить для дальнейшего использования.

в) NALC-NaOH. 0,5 г N-ацетил-L-цистеина добавляют к 100 мл раствора NaOH и цитрата натрия (1 г на 200 мл раствора). После добавления N-ацетил-l-цистеина раствор необходимо использовать в течение рабочего дня.

г) фосфатный буфер, 0,067 М/л, рН 6,8.

Раствор 1: растворяют в 1 л дистиллированной воды:

9,47 г Na₂HPO₄

или 11,63 Na₂HPO₄ х 2H₂O

или 15,17 Na₂HPO₄ х 7H₂O

или 23,41 Na₂HPO₄ х 12H₂O

Раствор 2: растворяют 9,07 г KH₂PO₄ в 1 л дистиллированной воды.

Смешивают равные части раствора 1 и раствора 2. Добавляя при необходимости 10 % HCl и 10 % NaOH, добиваются значения рН 6,8. Стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 минут. Для снижения риска контаминации рекомендуется ежедневно использовать свежий раствор стерильного фосфатного буфера.

Для предотвращения перекрестной контаминации мерные сосуды с раствором NALC и буферным раствором рекомендуется заклеить на 2/3 парафиновой пленкой.

Максимальное количество материала не должно превышать 10 мл. Если объем образца мокроты превышает 10 мл, проба должна быть разделена на 2 или более пробирок (в зависимости от начального объема) и обработана согласно стандартной методике. После центрифугирования все осадки одного образца объединяют в одной пробирке. Если объем образца превышает 10 мл и не может быть разделен из-за густоты материала, к образцу добавляют раствор NALC-NaOH в соотношении 1:1, встряхивают в течение 20 мин на шейкере, затем пробу делят пополам, в обе пробирки добавляют фосфатный буфер до 50 мл и центрифугируют при 3000g, осадки объединяют.

Методика

Включают таймер на 20 минут при добавлении раствора NALC-NaOH в первый образец. Общее время обработки NALC-NaOH для каждой пробы не должно превышать 20 мин.

К 2-3 мл (не более 5 мл) диагностического материала добавляют равный объем раствора NALC-NaOH.

Встряхивают на вортексе в течение 15-20 сек.

Встряхивают на шейкере в течение 15 минут при комнатной температуре (20-25 °C).

Доливают до 50 мл фосфатный буфер.

Встряхивают на вортексе.

Центрифугируют при 3000g в течение 15 мин.

Осторожно сливают всю надосадочную жидкость в емкость с микобактерицидным дезинфектантом, не оставляя в пробирке ничего, кроме осадка.

Ресуспендируют осадок в 1 мл фосфатного буфера, немедленно производят посев на питательную среду.

5.2.2. Обработка 10 % раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия

Трехзамещенный фосфорнокислый натрий (Na_3PO_4) критически не влияет на жизнеспособность микобактерий, поэтому может использоваться для консервирования, транспортировки и деконтаминации образцов мокроты. Метод не имеет жестких ограничений по времени. Данный метод обработки материала используется только для посева на плотные питательные среды.

Реактивы

10 % раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, MW 380.13)

Приготовление растворов

10 % раствор Na_3PO_4 . Растворяют 10 г трехзамещенного фосфата натрия в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием при 121 °C в течение 15 минут.

Методика

К 2-3 мл (не более 5 мл) диагностического материала добавляют равный объем 10 % раствора $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Встряхивают на вортексе и оставляют при комнатной температуре на 12-18 ч.

Доливают до 50 мл фосфатный буфер. Встряхивают на вортексе.

Центрифугируют при 3000g в течение 15 мин.

Осторожно сливают надосадочную жидкость в емкость с микобактерицидным дезинфектантом, не оставляя в пробирке ничего, кроме осадка.

Ресуспендируют осадок в 1 мл фосфатного буфера, немедленно производят посев на питательную среду.

5.2.3. Обработка 4 % раствором едкого натра (модифицированный метод Петрова)

Обработка с помощью NaOH является достаточно жесткой и может приводить к гибели микобактерий, содержащихся в исследуемом образце материала, поэтому при использовании данного метода необходимо строго соблюдать указанное время обработки.

Реактивы

а) 4 % раствор гидроксида натрия (NaOH)

б) фосфатный буфер, 0.067 М/л, рН 6,8

Приготовление растворов

а) 4 % NaOH. Растворяют 4 г NaOH в 100 мл дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 минут.

б) фосфатный буфер, 0.067 М/л, рН 6.8.

Раствор 1: растворяют 9,47 г Na_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды.

Раствор 2: растворяют 9,07 г KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды.

Смешивают равные части раствора 1 и раствора 2. Добавляя при необходимости 10 % HCl и 10 % NaOH, добиваются значения рН 6,8. Стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 15 минут.

Методика

К 2-3 мл (не более 5 мл) диагностического материала добавляют равный объем 4 % раствора NaOH.

Встряхивают на шейкере при комнатной температуре в течение 15 мин.

Доливают до 50 мл фосфатный буфер. Встряхивают на вортексе.

Центрифугируют при 3000g в течение 15 мин.

Осторожно сливают надосадочную жидкость в емкость с микобактерицидным дезинфектантом, не оставляя в пробирке ничего, кроме осадка.

Ресуспендируют осадок в 1 мл фосфатного буфера, немедленно производят посев на питательную среду.

5.3. Обработка других видов диагностического материала

5.3.1. Мазок из носоглотки

Стерильным пинцетом вносят тампон в стерильную пробирку для центрифугирования (50 мл). Добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Проводят обработку материала NALC-NaOH. Перед добавлением фосфатного буфера тампон удаляют из пробирки.

5.3.2. Промывные воды желудка

Исследование промывных вод желудка должно быть проведено в течение первых четырех часов после их получения от пациента, так как из-за высокой кислотности микобактерии туберкулеза могут быстро погибнуть. Обычно при исследовании промывных вод желудка нет необходимости осуществлять деконтаминацию, если проба была взята в стерильный контейнер с соблюдением правил асептики. Весь объем пробы центрифугируют при 3000g в течение 30 минут. Сразу же после этого производят посев материала на питательную среду.

5.3.3. Моча

С целью повышения высеваемости микобактерий из мочи к образцу рекомендуется добавить:

- на объем до 20 мл - 1 каплю 1 % Твин 80, 1 каплю 20 % сульфосалициловой кислоты и 0,1 мл белкового раствора (7-8 % стерильного бычьего сывороточного альбумина, сыворотки или плазмы);

- на объем 20-30 мл - 1 каплю 1 % Твин 80, 2 капли 20 % сульфосалициловой кислоты и 0,3 мл белкового раствора (7-8 % стерильного бычьего сывороточного альбумина, сыворотки или плазмы);

- объем 30-50 мл - 1 каплю 1 % Твин 80, 3 капли 20 % сульфосалициловой кислоты и 0,5 мл белкового раствора (7-8 % стерильного бычьего сывороточного альбумина, сыворотки или плазмы).

Пробы мочи оставляют на 2 часа в холодильнике при 2 °С. Образцы, объем жидкости в которых превышает 30 мл, следует разделить поровну на две пробирки. Образцы центрифугируют при 3000g в течение 20 минут, сливают надосадочную жидкость. Далее обработку материала проводят по методике деконтаминации мокроты (NALC-NaOH), после чего немедленно производят посев на питательную среду.

Бактериоскопическое исследование осадка мочи на КУБ проводить

нецелесообразно.

5.3.4. Ткани

Лимфатические узлы, биоптаты и другие ткани, резецированные во время хирургического вмешательства, необходимо измельчить с помощью стерильного скальпеля или ножниц и пинцета. Образец гомогенизируют в стерильной фарфоровой ступке или в гомогенизаторе тканей, добавив 0,5–1,0 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия и при необходимости небольшое количество стерильного песка. Эту суспензию можно использовать для посева на питательную среду в тех случаях, если указанные выше манипуляции были проведены с соблюдением правил асептики. Если правила асептики не соблюдались, проводят деконтаминацию пробы 4 %-м раствором серной кислоты, как это рекомендуется делать при обработке мочи.

Если полученный материал не может быть отработан в день получения пробы, в образец необходимо добавить равное по объему количество (не менее 1мл) стерильного физиологического раствора, чтобы предотвратить высыхание ткани. Хранить материал в таком виде возможно не более 48 часов в холодильнике при 4 °С.

5.3.5. Гной

Гной можно обрабатывать таким же образом, как и аспирированные жидкости. Если гной очень густой, его следует обрабатывать так же, как мокроту.

5.3.6. Спинномозговая жидкость

Стерильно взятую спинномозговую жидкость можно засеивать без предварительной обработки. Если стерильность образца вызывает сомнения, можно обработать его по методике, описанной для мокроты. Рекомендуется проводить посев на жидкие питательные среды. Если позволяет объем образца, целесообразно разделить его на 2 части, посеяв одну из них без обработки, другую – после обработки.

5.3.7. Другие биологические жидкости (включая плевральную жидкость)

Слизисто-гнойные жидкости обрабатывают так же, как и мокроту, когда объем пробы составляет 10 мл или меньше.

Чистые жидкости. Если материал получен с соблюдением правил асептики, его центрифугируют при 3000g в течение 15 минут и сразу же производят посев осадка на питательную среду. Если объем пробы превышает 10 мл, ее обрабатывают так же, как промывные воды желудка.

Кровь и другие жидкие материалы с большой примесью крови после добавления 3 % раствора лимоннокислого натрия центрифугируют при 3000g и осадок 3 раза отмывают стерильной дистиллированной водой.

Микобактерии туберкулеза могут «приклеиваться» к стеклу или пластику. Чтобы добиться максимального извлечения микобактерий, контейнер ополаскивают стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Центрифугируют раствор при

3000g в течение 15 минут и производят посев 2–3 капель осадка на питательную среду.

5.3.8. Кал

Около 5 г кала переносят в пробирку. Заливают гипернасыщенным раствором NaCl (в растворе должна содержаться нерастворимая соль) и оставляют на 4 часа в БББ. Образец фильтруют через стерильную марлю в центрифужную пробирку, центрифугируют при 3000g в течение 20 минут, сливают надосадочную жидкость. К осадку добавляют 0,3 % раствор хлорамфеникола в пропорции 1:3. Образец помещают на ночь в холодильник при 2 °С. Далее проводят обработку материала по методике деконтаминации мокроты (NaLC-NaOH). Посев проводят как на плотные, так и в жидкие питательные среды. Бактериоскопическое исследование осадка кала на КУБ проводить нецелесообразно.

5.4. Внутренний контроль качества деконтаминации

5.4.1. Оценка возможных причин контаминации образца

Следует уточнить, не был ли слишком велик интервал между сбором образца и его обработкой. Если это так, необходимо принять корректирующие меры в организации транспортировки, организации работы в лаборатории или в обеих.

Следует строго соблюдать время контакта образца с деконтаминантом. Слишком короткое время контакта приводит к высокой частоте контаминации, слишком долгий контакт вызывает потерю жизнеспособности микобактерий.

Следует убедиться, что ротор достигает необходимую относительную силу центрифугирования 3000g и поддерживает ее в течение 15 минут.

5.4.2. Периодически повторяющаяся контаминация

Периодически повторяющаяся контаминация может иметь место среди образцов, обработанных в течение одного дня или среди деконтаминированных образцов, собранных в каком-либо одном месте. В таких случаях следует проверить стерильность растворов для деконтаминации, выполнение процедуры деконтаминации или организацию системы сбора и транспортировки образцов. Если обнаружены ошибки, следует принять немедленные корректирующие действия. Если обнаружены проблемы в выполнении процедуры, следует провести обучение сотрудников лаборатории, выполняющих деконтаминацию.

Если имеет место повторяющаяся контаминация образцов от одного и того же пациента, следует использовать более жесткую процедуру деконтаминации для обработки образцов от этого пациента. Следует увеличить концентрацию реактива, но не время обработки, использовать два объема раствора для деконтаминации одного объема образца. Такую жесткую процедуру следует применять только для обработки

контаминируемых образцов, а не для всех образцов.

5.4.3. Кросс-контаминация образцов

Кросс-контаминация образцов от эпидемиологически не связанных между собой пациентов может привести к серии положительных результатов бактериологического исследования за короткий промежуток времени. В таких случаях следует оценить возможность кросс-контаминации для исключения ложноположительных результатов исследования. Необходимо проанализировать следующие обстоятельства:

- имеют ли пациенты, у которых получен положительный результат культурального исследования, клинические симптомы туберкулеза;
- получен ли положительный результат культурального исследования при исследовании других образцов от тех же пациентов;
- не были ли один или несколько образцов с ростом единичных колоний МБТ обработаны сразу после образцов с большим количеством КУБ.

Если в лабораториях, выполняющих большое количество исследований внелегочных образцов, многие из которых стерильны, выделяется значительное количество культур МБТ только из деконтаминированных образцов, это позволяет предполагать, что кросс-контаминация произошла при обработке образцов.

Если кросс-контаминация не может быть исключена, следует убедиться, что следующие процедуры выполняются правильно:

- деконтаминация образцов не проводится параллельно с посевом культур микобактерий;
- при внесении растворов в пробирки не происходит касание горлышка;
- растворы реагентов делятся на аликвоты;
- аликвоты растворов, открытые в течение рабочего дня, не используются повторно;
- образцы с высокой вероятностью КУБ+ обрабатываются и засеваются в последнюю очередь;
- контейнеры или пробирки с образцами не открываются до того, как будут закрыты предыдущие;
- контейнеры или пробирки с образцами не открываются непосредственно после доставания из центрифуги;
- надосадочная жидкость аккуратно сливается в контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор, избегая расплескивания, например, через воронку.

- перчатки в ходе работы меняются часто и никогда не используются повторно.

5.4.4. Тестирование качества деконтаминации с использованием референс-штамма

Тестирование проводят с использованием референс-штамма микобактерий. Можно использовать любой доступный референс-штамм или хорошо изученный клинический изолят микобактерий. Предпочтительнее использовать быстрорастущие НТМ (*M. fortuitum* и др.). При проведении тестирования оценивается скорость и обильность роста деконтаминированной и необработанной суспензии микобактерий.

Тестирование проводится ежемесячно; каждый раз при смене реагентов; в случае неадекватного уровня контаминации или при неудовлетворительных результатах контроля качества - еженедельно.

Методика

Готовят суспензию *M. fortuitum* в 2 мл стерильного фосфатного буфера по стандарту мутности McFarland 1.

Суспензия 1: 0,1 мл суспензии вносят в 9,9 мл физраствора.

Суспензия 2: 1,0 мл суспензии 1 вносят в 9,0 мл физраствора.

Засевают по 0,2 мл суспензии 1 в две пробирки со средой Левенштейна-Йенсена. Засевают по 0,2 мл суспензии 2 в две пробирки со средой Левенштейна-Йенсена.

Остатки суспензии 1 и суспензии 2 подвергают полной процедуре деконтаминации и центрифугирования. Осадок суспензии 1 ресуспендируют в 1,0 мл стерильного буфера (суспензия 3). Осадок суспензии 2 ресуспендируют в 1,0 мл стерильного буфера (суспензия 4).

Засевают по 0,2 мл суспензии 3 в две пробирки со средой Левенштейна-Йенсена.

Засевают по 0,2 мл суспензии 4 в две пробирки со средой Левенштейна-Йенсена.

Учет результатов

Через 5-7 дней инкубации оценивают обильность роста *M. fortuitum*.

В пробирках, засеянных суспензией 1, должен быть получен обильный рост *M. fortuitum* (3+), в пробирках, засеянных суспензией 2 - умеренный рост (2+).

В пробирках, засеянных суспензиями 3 и 4, должен быть получен такой же рост (3+, 2+), либо на ступень ниже (2+, 1+).

В случае использования другого референс-штамма следует проводить учет обильности роста по истечении времени, достаточного для появления видимого роста данного референс-штамма.

Отрицательный контроль деконтаминации

Процедуре деконтаминации и центрифугирования подвергают пробирку со средой Middlebrook 7H9 или физраствором, засеянную *E. coli*. Через 3 дня оценивают наличие роста *E. coli* в контрольной пробирке и других пробирках, обработанных одновременно, с целью установления возможной кросс-контаминации.

Можно подвергнуть процедуре деконтаминации и центрифугирования незасеянную пробирку со средой Middlebrook 7H9 или физраствором. Через 3 дня оценивают наличие роста в контрольной пробирке.

5.4.5. Статистическая оценка уровня контаминации

Для оценки уровня контаминации определяют удельный вес контаминированных пробирок от общего числа засеянных пробирок для каждой питательной среды. Такая оценка проводится ежемесячно, в случае неадекватного уровня контаминации или при неудовлетворительных результатах контроля качества – еженедельно.

Расчет уровня контаминации проводится по следующей формуле:

$$\text{Уровень контаминации} = \frac{\text{число контаминированных пробирок}}{\text{общее число засеянных пробирок}} \times 100\%$$

Допустимый уровень контаминации для посевов на плотные питательные среды составляет 2-5 %. Неудовлетворительным считается показатель как более 5 %, так и менее 2 %.

Допустимый уровень контаминации для посевов в жидкие питательные среды составляет 6-8 %. Если он превышает 10 %, использование жидких сред экономически нецелесообразно.

5.4.6. Потенциальные источники ошибок

Высокий уровень контаминации может быть вызван следующими причинами:

- недостаточное время деконтаминации;
- низкая концентрация NaOH, NALC;
- раствор NALC-NaOH приготовлен более 24 ч назад;
- неудовлетворительное качество реагентов;
- проблемы с референс-штаммом (нежизнеспособный, неправильная мутность суспензии);

- нестерильные растворы.

Крайне низкий уровень контаминации, отсутствие роста или медленный скудный рост культур микобактерий может быть вызван следующими причинами:

- превышение времени деконтаминации образцов более 20 мин;
 - завышенная концентрация NaOH, NALC;
 - неудовлетворительное качество реагентов;
 - проблемы с референс-штаммом (нежизнеспособный, неправильная мутность суспензии);
 - неадекватный уровень pH (выше 8);
- неадекватный режим центрифугирования (время, скорость, температура).

5.4.7. Действия при отклонениях от нормы уровня контаминации

В случаях отклонения уровня контаминации от нормы следует убедиться, что в лаборатории соблюдаются следующие требования внутреннего контроля качества:

- адекватные качество, срок годности, концентрации реагентов и растворов;
- приготовленный рабочий раствор используется в течение 24 ч;
- pH растворов и образца после деконтаминации не превышает 8,0;
- время экспозиции с деконтаминирующим раствором не превышает 20 мин;
- растворы и питательные среды стерильны;
- адекватное качество стерилизации в автоклаве и сухожаровом шкафу;
- адекватное качество контрольного штамма *M. fortuitum*.

При любом отклонении от удовлетворительных показателей деконтаминации следует проанализировать полученные результаты и возможные причины.

Если в период, за который зарегистрированы отклонения уровня контаминации, результаты внутреннего контроля качества питательных сред, оборудования и внутреннего контроля качества деконтаминации, проведенного с использованием тест-штамма, были удовлетворительными, изменения в методику деконтаминации не вносят, наблюдают за уровнем контаминации при использовании новой партии среды.

Если имеют место неудовлетворительные результаты внутреннего контроля качества деконтаминации, незамедлительно предпринимают меры к повышению качества метода.

6. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

6.1. Общие положения

Бактериологическое исследование является обязательным этапом в диагностике туберкулеза. Для подтверждения диагноза «туберкулез» необходимо выделить культуру *M. tuberculosis* на искусственной питательной среде и идентифицировать ее, используя дифференциальные тесты *in vitro*. Для культивирования микобактерий туберкулеза разработано множество различных питательных сред, которые делятся на три основные группы – яичные (плотные), агаровые (плотные и полужидкие) и жидкие (синтетические и полусинтетические). Идеальная среда для выделения микобактерий туберкулеза должна:

- быть экономичной и простой в приготовлении, состоять из легкодоступных компонентов;
- угнетать рост сопутствующей микрофлоры (контаминантов);
- стимулировать рост микобактерий туберкулеза, содержащихся в исследуемом материале;
- позволять осуществлять предварительную дифференциальную диагностику выделенных культур по морфологии колоний.

Для выделения микобактерий туберкулеза яичные среды являются средами выбора, так как именно они удовлетворяют всем требованиям, перечисленным выше. Рутинному использованию жидких сред при исследовании мокроты препятствует их более высокая стоимость. Однако при исследовании некоторых видов биологического материала жидкие питательные среды могут иметь преимущества.

Рекомендуется для выделения микобактерий туберкулеза одновременно использовать две среды – яичную и жидкую.

Достоинства и недостатки яичных сред

Достоинства

- просты в приготовлении;
- самые дешевые из всех имеющихся специальных сред и в то же время поддерживают хороший рост микобактерий туберкулеза;
- могут храниться в холодильнике в течение четырех недель при соблюдении условий хранения;
- возможность контаминации в процессе приготовления сводится к минимуму, так как после разлива во флаконы подвергаются тепловой обработке; кроме того,

добавляемый к этим средам малахитовый зеленый угнетает рост сопутствующей микрофлоры.

Недостатки

- рост колоний становится заметным через большой промежуток времени - иногда через 8 недель, особенно если в исследуемом материале содержалось небольшое количество микобактерий туберкулеза или если процесс деконтаминации был слишком жестким;

- если в процессе культивирования появляется рост сопутствующей микрофлоры, он отмечается на всей поверхности питательной среды, из-за чего данные пробы приходится удалять.

Существует большое количество плотных питательных сред: Левенштейна-Йенсена, Финна, Огавы, Кирхнера, Петраньяни и др. Для культуральной диагностики туберкулеза следует использовать как минимум две разные по составу питательные среды. Наиболее широкое распространение в Республике Беларусь получил набор из 2 яичных сред: Левенштейна-Йенсена и Финн-II.

6.2. Приготовление яичных сред

6.2.1. Среда Левенштейна-Йенсена

Среда Левенштейна-Йенсена применяется во всем мире в качестве стандартной среды для выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности. Это плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерий туберкулеза получают на 15-25-й день после посева микроскопически положительного материала. В состав этой питательной среды входит глицерин, который способствует росту *M. tuberculosis*. Для культивирования *M. bovis* в состав солевого раствора вместо глицерина добавляют 8,0 г пирувата натрия.

Состав среды

Раствор минеральных солей

Калий однозамещенный фосфорнокислый (KH_2PO_4) - 2,4 г

Магний лимоннокислый ($\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \times 14\text{H}_2\text{O}$) - 0,24 г

Магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) - 0,6 г

L-аспарагин ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$) - 3,6 г

Глицерин ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) - 12,0 мл

Вода дистиллированная - 600 мл

Ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной

последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Затем стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 30 минут. Срок хранения раствора составляет 3–4 недели при комнатной температуре.

Раствор малахитового зеленого

Малахитовый зеленый ($C_{52}H_{54}O_{12}N_4$) – 2 г

Вода дистиллированная – 100 мл

Малахитовый зеленый растворяют в стерильной дистиллированной воде, поместив раствор в термостат на 1–2 часа. Стерилизуют при 112 °С в течение 30 минут. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, при появлении осадка или изменении окраски его следует заменить свежим раствором.

Яичная масса

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, оставляют на 30 мин в мыльном растворе. Тщательно промывают проточной водой и погружают в 70 % этиловый спирт на 15 мин. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20–25 яиц в зависимости от их величины).

Приготовление среды

В большую стерильную емкость вносят 600 мл раствора минеральных солей, 1000 мл яичной массы, 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают с использованием мешалки для растворов, избегая образования пены, фильтруют через четырехслойный стерильный марлевый фильтр, разливают в пробирки по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не образовался осадок. Для предупреждения выпадения осадка пробирки с яичной средой помещают в свертыватель не позже чем через 15 минут после разлива среды.

Свертывание среды

Пробирки с разлитой в них средой помещают в штативы со специально подобранным углом наклона для формирования скошенной среды. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 80–85 °С в течение 45 минут. После коагуляции крышку свертывателя не открывают; пробирки должны оставаться в исходном наклонном положении до полного остывания среды.

Хранение

На коробках с приготовленной партией среды указывают дату изготовления и срок годности. Среду помещают в холодильник после остывания и хранят в холодильнике при 4–6 °С с тщательно завинченными крышками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели. Следует готовить

объем среды, достаточный для использования в течение срока годности.

6.2.2. Среда Финн-II

Среда Финн-II отличается от среды Левенштейна-Йенсена тем, что вместо L-аспарагина в ней используется глутамат натрия, и конечная кислотность среды (рН 6,3-6,8) имеет более низкое значение и более стабильна по сравнению со средой Левенштейна-Йенсена. Эти свойства обуславливают более высокую эффективность среды при посеве материала, обработанного щелочными детергентами.

Состав среды

Раствор минеральных солей

Магний сернокислый ($MgSO_4 \times 7H_2O$) - 0,5 г

Натрий лимоннокислый ($C_6H_5O_7Na_3 \times 5,5H_2O$) - 0,1 г

Квасцы железоаммонийные ($Fe(NH_4)(SO_4)_2 \times 12 H_2O$) - 0,05 г

Калий однозамещенный фосфорнокислый (KH_2PO_4) - 20 г

Аммоний лимоннокислый однозамещенный ($C_8H_{11}O_7N$) - 5 г

Натрий глутаминовокислый однозамещенный ($C_5H_8NNaO_4 \times H_2O$) - 10 г

Глицерин ($C_3H_8O_3$) - 20 мл

Вода дистиллированная - до 1000 мл

Ингредиенты растворяют в дистиллированной воде в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане. Стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 20 минут. Срок хранения раствора составляет 3-4 недели при комнатной температуре.

Раствор малахитового зеленого

Малахитовый зеленый ($C_{52}H_{54}O_{12}N_4$) - 2 г

Стерильная дистиллированная вода - 100 мл

Малахитовый зеленый растворяют в стерильной дистиллированной воде, поместив раствор в термостат на 1-2 часа. Стерилизуют при 112 °C в течение 30 мин. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению, при появлении осадка или при изменении окраски его следует заменить свежим раствором.

Яичная масса

Свежие диетические куриные яйца со сроком хранения не более 7 суток без

трещин и дефектов скорлупы тщательно отмывают в теплой проточной воде с помощью ручных щеток и щелочного мыла, оставляют на 30 мин в мыльном растворе. Тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70 % этиловый спирт на 30 мин. Затем в стерильном боксе разбивают яйца стерильным ножом в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется в среднем 20-25 яиц в зависимости от их величины).

Приготовление среды

В большую стерильную емкость вносят 600 мл раствора минеральных солей, 1000 мл яичной массы, 20 мл раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают с использованием мешалки для растворов, избегая образования пены, разливают в пробирки по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не образовался осадок. Для предупреждения выпадения осадка флаконы или пробирки с яичной средой подвергают тепловой обработке не позже чем через 15 минут после разлива среды.

Свертывание среды

Пробирки с разлитой в них средой помещают в штативы со специально подобранным углом наклона для формирования скошенной среды. Штативы устанавливают в свертыватель и проводят коагуляцию при 80-85 °С в течение 45 минут. После коагуляции крышку свертывателя не открывают; пробирки должны оставаться в исходном наклонном положении до полного остывания среды.

Хранение

На коробках с приготовленной партией среды указывают дату изготовления и срок годности. Среду помещают в холодильник после остывания и хранят при 4-6 °С с тщательно завинченными крышками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды не должен превышать 4 недели. Следует готовить объем среды, достаточный для использования в течение срока годности.

6.3. Внутренний контроль качества при приготовлении питательных сред

6.3.1. Основные требования к приготовлению питательных сред

Чтобы приготовить качественные питательные среды, необходимо использовать реагенты высокого качества, чистую стерильную посуду и свежеприготовленную стерильную дистиллированную воду. Следует тщательно выполнять рекомендации по приготовлению питательных сред и не вносить в стандартную процедуру никаких модификаций.

Рабочие помещения необходимо содержать в максимальной чистоте, рабочие столы обрабатывать дезинфицирующими растворами до того как разместить на них стерильные реактивы и питательные среды.

Необходимо контролировать температуру сухожарового шкафа, холодильника.

В процессе приготовления питательных сред необходимо строго соблюдать

правила асептики, например, обжигать в пламени горелки горлышки флаконов и пробирок, так как свертывание является не стерилизующей, а лишь коагулирующей процедурой.

Необходимо всегда тщательно очищать и мыть поверхность скорлупы яйца перед его разбиванием.

Крышки пробирок с питательной средой должны обеспечивать небольшой газообмен и вместе с тем предотвращать высыхание среды во время инкубации. Пробирки с завинчивающимися крышками удовлетворяют эти условия.

Не следует экономить на объеме питательной среды. Следует вносить в каждую пробирку 5 мл среды.

Качество приготовленной яичной среды зависит от соблюдения температурного и временного режимов коагуляции. Не следует перегревать питательные среды в процессе свертывания.

Не следует оставлять приготовленные питательные среды на свету (в том числе не подвергать воздействию ультрафиолетовых лучей); среды до употребления следует хранить в холодильнике в темноте в течение не более 4 недель.

Контаминированные, неомогенные или перегретые в ходе свертывания партии питательных сред следует изымать из употребления немедленно.

6.3.2. Внутренний контроль качества

Цвет

Различия в оттенке цвета среды в разных пробирках из одной и той же партии среды свидетельствует о плохой гомогенизации или присутствии остатков химреактивов в пробирках. Очень темный оттенок зеленого может быть вызван избытком малахитовой зелени или очень кислым рН среды. Желтоватая окраска среды может указывать на низкое качество малахитовой зелени или очень высокий (щелочной) рН среды. Обесцвечивание среды, наличие пузырьков или углублений на ее поверхности свидетельствует о нарушении режима свертывания. Повторное свертывание также ухудшает качество среды.

Консистенция

Для проверки консистенции среды отбирают одну или две пробирки из партии. Если среда жидкая или распадается при вращении пробирок в руках, это свидетельствует о слишком низкой температуре свертывания. Пробирки с такой средой непригодны для использования.

Влажность

На дне пробирки должно быть небольшое количество конденсационной жидкости. Избыток воды указывает на то, что пробирки были плотно завинчены до остывания или

что состав среды не стандартен. Среда не должна скатываться при перемещении пробирок.

Однородность

Появление пузырей в среде в ходе свертывания свидетельствует о слишком высокой температуре коагуляции. Присутствие в среде комков указывает на плохую гомогенизацию.

Стерильность

10 % пробирок из каждой партии среды должны проверяться на стерильность. После 3-дневной инкубации при 37 °С на среде не должен появляться рост микрофлоры.

6.3.3. Тестирование чувствительности плотной яичной среды с использованием стандартного штамма

Если среды готовятся централизованно, чувствительность партий сред должна проверяться лабораторией, производящей среду и не проверяться повторно пользователями. Следует организовать транспортировку сред в соответствующих условиях. Яичные среды сохраняют чувствительность в течение длительного времени (до 1 месяца), если не подвергаются экспозиции на свету или при высокой температуре.

Качество коммерчески доступных яичных сред должно быть подтверждено изготовителем. Однако условия хранения сред, особенно в ходе дальней транспортировки, могут отличаться от оптимальных. Поэтому следует проверять качество каждой новой партии среды, используемой в лаборатории.

Для выявления серьезных проблем, влияющих на чувствительность питательной среды, проводят тестирование с использованием стандартного штамма. Исследование выполняют следующим образом.

Готовят суспензию референс-штамма, соответствующую стандарту мутности McFarland 1 (эквивалент 1 мг/мл бактериальных клеток). Можно использовать любой доступный референс-штамм или хорошо изученный клинический изолят микобактерий. Предпочтительнее использовать быстрорастущие НТМ (*M. fortuitum* и др.).

Выполняют серию из 4 последовательных 10-кратных разведений суспензии.

Засевают по 0,2 мл третьего и четвертого разведений в 5 пробирок предыдущей партии среды и в 5 пробирок новой партии.

Инкубируют посеvy при температуре 36 ± 1 °С, оценивают рост в пробирках из старой и новой партии, регистрируют результаты в журнале (табл. 6.1).

Учет обильности роста следует проводить по истечении времени, достаточного

для появления видимого роста данного референс-штамма.

Таблица 6.1 – Образец журнала регистрации контроля качества среды

Сред а	Номер парти и	Объем (мл)	Дата			Контроль стерильности	Контроль чувствительности		
			приготовления (приобретения)	начала использовани я	конца использовани я		штамм	число КОЕ на ____ день*	
								контаминация обнаружена Да/Нет	контрольная партия

*5-й день – для быстрорастущих микобактерий, 20-й день – для медленно растущих микобактерий.

При засеве стандартного штамма в определенной концентрации всегда должно вырастать определенное число колониеобразующих единиц (КОЕ). Лаборатория должна определить минимальное число колоний для каждой концентрации и использовать его в качестве стандарта при сравнении старых и новых партий сред.

Если число КОЕ, выросших на новой партии среды, значительно ниже, чем на старой, чувствительность новой партии среды неудовлетворительна. В этом случае отрицательные результаты бактериологического исследования с использованием данной партии среды являются сомнительными. Культуральное исследование диагностического материала для этих случаев следует повторить.

6.3.4. Оценка чувствительности питательных сред

Чувствительность (способность обеспечивать хороший рост микобактерий) партии плотной или жидкой среды оценивается по соотношению положительной микроскопии и положительной культуры.

7. ПОСЕВ И ИНКУБАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ОЦЕНКА И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1. Общие положения

<p>Достоверная клиническая интерпретация результатов микробиологического обследования достигается при обязательном соблюдении следующего правила: культуральное исследование диагностического материала проводится параллельно с микроскопическим исследованием осадка той же пробы диагностического материала.</p>

Все мазки из осадка готовят после выполнения процедуры посева.

7.2. Процедура посева

Рабочее место микробиолога необходимо организовать таким образом, чтобы исключить операторские ошибки.

Перед процедурой посева необходимо подготовить пробирки с питательными средами, промаркировать их согласно нумерации анализов в рабочем журнале и последовательно расположить в штативе. Аналогичным образом подготовить и промаркировать предметные стекла для приготовления мазков.

Перед началом посева необходимо убедиться в том, что номер пробирки с посевным материалом соответствует номерам пробирок с питательной средой и номеру предметного стекла для приготовления мазка, проверить соответствие расположения пробирок с готовым осадком и предметных стекол в порядке их регистрационных номеров.

Среды нужно вынимать из холодильника заранее, чтобы к моменту посева среда согрелась до комнатной температуры. В нижней части пробирки со скошенной питательной средой нередко наблюдается образование конденсата. До посева биологического материала этот конденсат желательно удалить.

Посев диагностического материала производят следующим образом.

Ресуспендируют осадок в 1-2 мл фосфатного буфера.

Засевают по 0,2 мл осадка в 2 промаркированные пробирки с плотной питательной средой и/или 0,5 мл в пробирку с жидкой питательной средой. Крышки пробирок не завинчивают плотно. 1 каплю осадка наносят на предметное стекло для бактериоскопического исследования.

Мазки оставляют сушиться в БББ до полного высыхания, затем фиксируют и окрашивают.

Пробирки помещают в термостат при температуре 36 ± 1 °С в наклонном положении; наклон штатива должен обеспечивать горизонтальное расположение поверхности питательной среды и исключать смачивание крышки засеянным материалом.

Через 72 часа пробирки с посевами просматривают, плотно завинчивают крышки. Пробирки переводят в вертикальное положение. Если есть возможность, пробирки оставляют в горизонтальном положении в течение всего времени инкубации.

7.3. Инкубация посевов

Оптимальная температура инкубации микобактерий туберкулеза составляет

36±1 °С.

При снижении температуры скорость размножения микобактерий туберкулеза быстро снижается. Исключение составляют образцы, полученные из кожи или поверхностных повреждений, которые могут содержать *M. avium*, *M. ulcerans* или *M. haemophilum*. Эти микобактерии лучше всего растут при температуре 25–33 °С. *M. avium* или *M. xenopi* для оптимального роста нуждаются в температуре 40–42 °С. При подозрении на НТМ (образцы от ВИЧ-инфицированных пациентов, пациентов с микобактериозами и др.) рекомендуется дополнительный посев на жидкую питательную среду и инкубацию при 30 и 42 °С.

Микобактерии туберкулеза размножаются чрезвычайно медленно – время деления клетки составляет 18–24 часа. С этим связана необходимость длительного срока инкубации для получения видимого роста колоний. Среднее время появления видимого роста микобактерий туберкулеза на плотных питательных средах составляет 25–30 дней. Это обуславливает необходимость выдерживать посеvy в термостате до 8 недель с обязательным еженедельным просмотром. Если в течение 8 недель рост микобактерий не появляется, посеvy уничтожают автоклавированием.

Появление роста кислотоустойчивых бактерий в течение 7–10 дней культивирования на плотных питательных средах может свидетельствовать о выделении быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий.

Во время еженедельных просмотров посевов при подозрении на загрязнение посева сопутствующей микрофлорой необходимо прежде всего удалить и уничтожить автоклавированием те посеvy, в которых отмечается загрязнение всей поверхности питательной среды или изменение самой питательной среды (разжижение или обесцвечивание).

Посевы с частичным загрязнением желательно выдержать до окончания срока инкубации или до появления хотя бы нескольких колоний микобактерий, так как позднее появление загрязнения не исключает роста *M. tuberculosis*. В таких случаях необходимо сделать мазок из выросшей культуры, окрасить его по Цилю-Нильсену и при наличии в мазке КУБ попытаться обработать выросшую культуру деконтаминирующим раствором, после чего вновь засеять осадок на питательные среды.

Во всех случаях при появлении видимого роста колоний необходимо контролировать чистоту выросшей культуры с помощью микроскопии мазка по Цилю-Нильсену для исключения ложноположительного результата.

7.4. Оценка и учет результата посева

Во время еженедельных просмотров регистрируют следующие параметры:

- появление видимого роста;
- интенсивность роста – суммарное число колониобразующих единиц (КОЕ) на

всех пробирках, засеянных данным материалом, если материал засеивается на пробирки с одинаковыми средами. Если инокулируются разные питательные среды, результат отмечается для каждой из них. Показатель интенсивности роста имеет большое диагностическое и прогностическое значение в динамике наблюдения за больным в процессе химиотерапии;

- контаминация посева неспецифической микрофлорой или грибами; в этом случае следует обязательно провести бактериоскопическое исследование мазка культуры и/или посев на неселективные питательные среды (кровяной/простой агар). Исключение составляет рост плесневых грибов; в этом случае не следует открывать пробирки;

- отсутствие роста.

Интенсивность роста микобактерий оценивают по следующей шкале, рекомендуемой ВОЗ:

1-19 колоний - указать точное количество

(1+) - 20-100 КОЕ - скудное бактериовыделение;

(2+) - 100-200 КОЕ - умеренное бактериовыделение;

(3+) - >200 КОЕ - обильное бактериовыделение.

Все характеристики выросших на плотных питательных средах микобактерий заносятся в лабораторный журнал учета результатов культуральных исследований (компьютерную базу данных) и в бланки результатов исследования.

Культуральное исследование на туберкулез требует много времени (от нескольких недель до нескольких месяцев), поэтому следует своевременно информировать врача о ходе этапов исследования. Рекомендуется следующий перечень вариантов результатов исследования:

- результат микроскопического исследования осадка диагностического материала;

- контаминация посева;

- выделение культуры кислотоустойчивых бактерий;

- идентификация культуры *M. tuberculosis*;

- определение лекарственной чувствительности МБТ;

- отрицательный результат посева (через 8 недель инкубирования).

В бланке окончательного результата исследования следует указать результаты всех исследований образца.

Пробирки с культурами микобактерий хранят в течение 1 месяца после выдачи результатов исследования ([п. 8.9.1](#)), чтобы в случае необходимости иметь возможность выполнить или повторить исследование на лекарственную чувствительность МБТ.

7.5. Внутренний контроль качества посева

7.5.1. Инкубация образцов

Необходимо ежедневно измерять температуру в термостате и регистрировать ее в журнале. Диапазон допустимой температуры термостата составляет 35–37 °С. Если температура термостата или термальной комнаты превышает 38 °С или падает ниже 35 °С, следует зарегистрировать это в журнале и переместить пробирки с посевами в другой термостат. Слишком высокая или низкая температура инкубирования ставит под сомнение отрицательные результаты культурального исследования. От таких пациентов следует получить новые образцы диагностического материала и повторить исследование.

7.5.2. Регистрация

Удостоверьтесь, что:

- дата обнаружения роста и характер колоний на плотной питательной среде зарегистрированы в журнале и/или электронной базе данных;
- для жидких сред зарегистрированы дата и число дней до обнаружения роста;
- отрицательные результаты зарегистрированы и выданы после истечения рекомендованного времени инкубации;
- для каждой из контаминированных пробирок указано время обнаружения контаминации;
- в лабораторном журнале и/или электронной базе данных указана дата выдачи результатов исследования;
- результаты исследования выданы в кратчайшие сроки от момента завершения исследования;
- результаты исследования выдаются с указанием качественных и количественных показателей.

7.5.3. Ежедневный рутинный контроль

Проведение ежедневного контроля позволяет проводить раннюю коррекцию ошибок. Следует обращать внимание на образцы с положительным результатом микроскопического и отрицательным результатом культурального исследования.

Обратите внимание на частоту повторения таких результатов.

Убедитесь, что:

- концентрация раствора для деkontаминации и время контакта с образцами соответствуют рекомендованным в руководстве.
- колебания температуры термостата не превышали приемлемые пределы;
- чувствительность используемой партии среды была соответствующим образом проверена.

8. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

8.1. Общие положения

Род *Mycobacterium* – единственный представитель группы 21 «Микобактерии», согласно «Определителю бактерий Берджи». Род *Mycobacterium* представлен более чем 100 видами; в клиническом диагностическом материале обычно определяется 10-12 видов микобактерий.

Как известно, нетуберкулезные микобактерии характеризуются природной устойчивостью к большинству ПТЛС первого ряда. Схемы химиотерапии, назначаемые при лечении микобактериозов, зависят от вида выделенной микобактерии. Кроме того выделение НТМ из патологического материала не всегда свидетельствует об этиологической значимости данного микроорганизма, поскольку может иметь место вследствие случайной контаминации НТМ из окружающей среды или носительства. Поэтому ошибочная идентификация выделенной культуры НТМ как *M. tuberculosis* может привести к установлению диагноза множественно лекарственно-устойчивый туберкулез и лечению пациента по IV клинической категории (МЛУ-ТБ) в течение не менее 18 месяцев.

Выделенная культура микобактерий должна быть идентифицирована на основании результатов иммунохроматографических, молекулярно-генетических или культуральных и биохимических методов исследования.

Идентификация с использованием культуральных и биохимических методов исследования никогда не должна базироваться на единичных тестах или характеристиках, так как отдельные штаммы могут давать отклонения от ожидаемых результатов тестирования, присущих данному виду. Сочетание характерных признаков с результатами биохимических и культуральных тестов позволяет провести идентификацию микобактерий комплекса *M. tuberculosis* с высокой точностью.

В зависимости от материально-технической обеспеченности лаборатории,

рекомендуемый выбор методов видовой идентификации МБ должен осуществляться в приоритетном порядке:

1. иммунохроматографические методы
2. молекулярно-генетические методы
3. биохимические и культуральные методы

8.2. Характеристика комплекса *Mycobacterium tuberculosis*

8.2.1. Характеристика колоний *M. tuberculosis*

Типичные культуры *M. tuberculosis*, выросшие на плотных питательных средах – восковидные, сухие, морщинистые, растут в виде R-колоний (от английского слова *rough* – грубый, шершавый), не пигментированы (кремового цвета или цвета слоновой кости). После курса химиотерапии от больных туберкулезом могут выделяться гладкие колонии с влажным ростом (S-формы (от английского слова *smooth* – гладкий)).

Колонии микобактерий туберкулеза не эмульгируются в изотоническом растворе, а образуют зернистую крошковидную суспензию. Это обусловлено наличием в составе их клеточной стенки большого количества гидрофобных жиро-восковых субстанций.

8.2.2. Морфология *M. tuberculosis*

При микроскопическом исследовании мазков из выросших колоний, окрашенных по Цилю-Нильсену, обнаруживаются яркие малиново-красные палочковидные бактерии длиной 1–10 (чаще 1–4) мкм, шириной 0,2–0,6 мкм, гомогенные или зернистые с незначительно закругленными концами, лежащие одиночно или группами, образующие скопления или переплетения в виде «войлока» или «кос». Часто в препарате, особенно в длительно растущих культурах, видны скопления темно окрашенных зерен. В молодых культурах, особенно выделенных от длительно леченных больных, микобактерии отличаются значительным плеоморфизмом, вплоть до появления коротких, почти кокковидных форм. Нетуберкулезные микобактерии могут варьировать по форме колоний и морфологии клеток.

Если морфология колоний или клеток микобактерий вызывает сомнения в их принадлежности к роду *Mycobacterium* или культуры выделены из материала, который может содержать кислотоустойчивые сапрофиты (моча, гной из ушей и др.), мазки дополнительно обесцвечивают 3 % солянокислым спиртом в течение 40–45 минут. Следует учитывать, что молодые культуры микобактерий туберкулеза могут сравнительно легко обесцвечиваться спиртом, так как они обладают слабой кислотоустойчивостью. В таких случаях культуры следует выдержать в термостате еще 5–10 дней и вновь повторить микроскопическое исследование, чтобы убедиться в их тинкториальных свойствах.

После микроскопии окрашенного по Цилю-Нильсену мазка из выросших колоний и обнаружении в нем КУБ лечащему врачу выдается предварительный результат

бактериологического исследования («Выделена культура кислотоустойчивых бактерий»).

8.3. Продукция пигмента

Микобактерии в зависимости от вида синтезируют различные каротиноидные пигменты. В 50-х годах XX века Раньоном так называемые «атипичные», нетуберкулезные микобактерии (НТМ) по пигментообразованию и скорости роста были разделены на четыре группы.

Фотохромогены – микроорганизмы, продуцирующие пигмент только после экспозиции на свету. Колонии таких микобактерий обычно белые, кремовые, или темно-желтые, когда выращены в темноте и непигментированы до экспозиции на свету. *M. kansasii* – фотохромоген, становится ярко желтым после освещения. Напротив, некоторые штаммы *M. simiae* демонстрируют фотохромогенность только после длительных периодов освещения.

Скотохромогены – это микроорганизмы, продуцирующие пигмент в темноте или на свету, например, *M. gordonae* и *M. scrofulaceum*. Продукцию пигмента можно усилить, если культуры подвергнуть непрерывному освещению (2 недели или более). *M. szulgai* демонстрируют уникальные свойства: будучи скотохромогенными при 37 °С, при 25 °С проявляют свойства фотохромогенности.

Нефотохромогены – микроорганизмы, не продуцирующие пигмент. Редкие штаммы демонстрируют цвет колоний от бледных пастелей до насыщенно-оранжевого.

Хотя быстрорастущие микобактерии легко определяются по скорости роста, но они также проявляют все вышеописанные варианты пигментов.

Определение продукции пигмента

Принцип метода – определение пигментообразования у микобактерий в темноте и на свету.

Методика

Суспензией изучаемого штамма микобактерий засевают пять пробирок с яичной средой. Четыре пробирки изолируют от света, обернув их алюминиевой фольгой или черной бумагой.

Инкубируют две защищенных от света культуры при 25 °С, две защищенных от света культуры и одну незащищенную культуру – при 37 °С до появления роста в незащищенной от света пробирке. Иногда могут быть использованы другие температуры для инкубации (например, при подозрении на *M. marinum* или *M. xenopi*).

Удаляют защитный экран с одной пробирки из каждого температурного режима и при наличии роста регистрируют наличие пигмента. Культуры в защищенных от света пробирках из каждого температурного режима являются контролем фотоактивного пигментообразования.

Если исследуемая культура в пробирке не пигментирована, ее подвергают 3–5 часовому освещению 60W вольфрамовой лампочки (или эквивалентной люминесцентной лампочки) на расстоянии 20–25 см от пробирки. При экспозиции крышки пробирок должны быть обязательно закрыты.

Если культура, выросшая при 37 °С, пигментирована, изучают продукцию пигмента при 25 °С (*M. szulgai* может быть фотохромогенна при 25 °С, скотохромогенна при 37 °С).

После световой экспозиции пробирки закрывают бумагой (фольгой), инкубируют все культуры при разных температурных режимах и просматривают их после 24, 48 и 78 часов. Сравнивают пигментацию освещенных и защищенных от света культур.

Примечание: фотоактивный пигмент может проявиться медленнее при культивировании при 25 °С, чем при 37 °С.

Результаты и их интерпретация

Культуры, которые образуют пигмент и на свету и в темноте – скотохромогенные.

Культуры, которые не образуют пигмент в темноте, но становятся желтыми или оранжевыми после световой экспозиции – фотохромогенные.

Культуры, которые не образуют пигмент на свету и в темноте – нефотохромогенные.

8.4. Биохимические методы идентификации микобактерий

8.4.1. Ниациновый тест

Ниациновый тест является основным тестом, используемым для идентификации *M. tuberculosis*.

Принцип метода

Ниацин (производное никотиновой кислоты) играет важную роль в осуществлении окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках микобактерий. Ниацин продуцируют все микобактерии, однако у *M. tuberculosis* в результате блокирования ряда метаболических путей никотиновая кислота накапливается в больших количествах, во много раз превышающих ее содержание в клетках микобактерий других видов. Штаммы *M. tuberculosis*, не продуцирующие ниацин, встречаются очень редко.

Ниациновый тест не должен использоваться как единственный для идентификации *M. tuberculosis*, так как отдельные штаммы *M. bovis*, в том числе и субштаммы BCG, а также некоторые виды нетуберкулезных микобактерий (*M. simiae*, *M. chelonae chetovar niacinogenes*) обладают относительно высокой способностью синтезировать ниацин и могут давать положительную реакцию.

Ниациновый тест дает наиболее убедительные результаты в тех случаях, когда для его постановки используют колонии, выросшие на яичной среде. Возраст культур должен быть не менее 3-4 недель, причем для постановки ниацинового теста необходимо использовать пробирки с ростом не менее 50 колоний. Так как растущие колонии *M. tuberculosis* выделяют ниацин в питательную среду, посеvy со сливающимися колониями могут давать ложноотрицательные результаты, так как экстрагирующая жидкость в этом случае не может контактировать с питательной средой. При наличии сливающихся колоний для обеспечения контакта жидкости с питательной средой необходимо либо снять и удалить часть колоний, либо проколоть поверхность среды.

Реакция требует свободного доступа кислорода на протяжении всего исследования, поэтому следует пользоваться пробками, обеспечивающими свободный доступ воздуха в пробирку.

Ниациновый тест рекомендуется выполнять с использованием коммерческих бумажных полосок.

Методика

Добавляют в пробирку с исследуемой культурой 1,0 мл стерильной дистиллированной воды.

Укладывают пробирку горизонтально на 30 минут, чтобы жидкость покрыла всю поверхность питательной среды. Время экстракции может быть увеличено, если колоний слишком мало.

Переводят пробирки в вертикальное положение на 5 минут, чтобы вода полностью стекла на дно.

Переносят 0,5 мл экстракта в пробирку с завинчивающейся крышкой.

Помещают с помощью пинцета индикаторную полоску отмеченным концом в пробирку с экстрактом, не допуская смачивания экстрагирующей жидкостью средней части полоски.

Оставляют при комнатной температуре на 15-20 минут. Допустимо слегка встряхивать пробирку, но не переворачивать ее.

Наблюдают появление желтого окрашивания на дне пробирки на белом фоне.

Результаты и их интерпретация

Положительный результат - экстракт окрашивается в желтый цвет разной интенсивности.

Отрицательный результат - нет окрашивания жидкости.

Любое окрашивание индикаторной полоски не расценивается как положительный

результат, так как может быть вызвано окислением реактивов в верхней части полоски.

Утилизация отходов

Для нейтрализации содержимого пробирок после проведения реакции использовать 10 % NaOH или любое щелочное дезинфицирующее средство.

Все контаминированные материалы утилизируют автоклавированием.

Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества ниаминового теста проводится каждый раз при проведении тестирования. В качестве положительного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) *M. tuberculosis*. В качестве отрицательного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) НТМ, например, *M. fortuitum*, либо дистиллированную воду.

Следует убедиться в чистоте исследуемых штаммов, строго соблюдать правила хранения и сроки использования растворов, реагентов и бумажных полосок.

8.4.2. Нитратредуктазный тест

Принцип метода заключается в определении активности нитратредуктазы по количеству нитрита, восстановленного из нитрата, что сопровождается цветной реакцией. Реакция восстановления нитратов дает возможность дифференцировать *M. tuberculosis*, у которых нитратредуктазная активность наиболее выражена из всех микобактерий, от *M. bovis*, *M. avium* и некоторых нетуберкулезных микобактерий, у которых этот фермент отсутствует. Для определения способности микобактерий восстанавливать нитраты используют 4-недельные культуры с обильным ростом, выращенные на плотной яичной питательной среде.

Приготовление реактивов

Раствор 1. Нитрат натрия в фосфатном буфере (pH 7,0).

NaNO₃, (MW 85) - 0,085 г

KH₂PO₄, (MW 136.1) - 0,117 г

Na₂HPO₄ x 12H₂O, (MW 358.14) - 0,485 г

Дистиллированная вода - 100 мл

Добавляют нитрат натрия в фосфатный буфер. Проверяют pH-раствор с помощью pH-метра. Стерилизуют полученный раствор автоклавированием при 121 °С в течение 15 минут.

Раствор 2. Раствор соляной кислоты.

Концентрированная соляная кислота (HCl, 36 %) – 10 мл

Дистиллированная вода – 10 мл

Медленно вливают концентрированную соляную кислоту в дистиллированную воду. Никогда не вливать воду в кислоту!

Раствор 3. Раствор сульфаниламида (0,2 %).

Сульфаниламид (C₆H₈N₂O₂S, MW 172.21) – 0,2 г

Дистиллированная вода – 100 мл

Растворяют сульфаниламид в дистиллированной воде. Полученную смесь хранят в герметично закрытой бутылки из темного стекла в холодильнике.

Раствор 4. Раствор N-нафтилэтилендиамина (0,1 %).

N-нафтилэтилендиамин дигидрохлорид – 0,1 г

Дистиллированная вода – 100 мл

Растворяют нафтилэтилендиамин в дистиллированной воде. Полученную смесь хранят в герметично закрытой бутылки из темного стекла в холодильнике.

Методика

Вносят 0,2 мл дистиллированной воды в стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой.

Вносят две лопатки биомассы микобактерий в пробирку и суспендируют их в воде.

Добавляют 2 мл раствора 1, хорошо перемешивают.

Помещают пробирки на 2 часа в водяную баню при температуре 37 °С, после чего добавляют в каждую пробирку 1 каплю раствора 2; 2 капли раствора 3; 2 капли раствора 4.

Немедленно фиксируют появление розового или красного окрашивания, сравнивая его интенсивность с цветовым стандартом.

Результаты и их интерпретация

Положительный результат: красное окрашивание (оттенки от розового до темно-красного). Результат считают положительным только в тех случаях, когда интенсивность окраски при сравнении со стандартами составляет от 2+ до 5+.

Отрицательный результат – окрашивания нет. Если раствор остается бесцветным, это означает, что результат теста отрицательный или что процесс восстановления прошел слишком быстро, при этом нитриты восстановились до

нитридов. Для того чтобы убедиться в истинности результата, необходимо добавить в пробирку немного порошка цинка (небольшой объем порошка цинка переносят из флакона на кончике слегка увлажненного аппликатора).

а) Если в растворе остался нитрат, цинк катализирует реакцию и появится красное окрашивание, что свидетельствует об истинно отрицательном результате теста.

б) Если после добавления порошка цинка красного окрашивания раствора не произошло, это означает, что результат теста положителен, но процесс восстановления прошел стадию нитрита.

Тест повторяют, чтобы подтвердить его результат.

Утилизация отходов

Все контаминированные материалы утилизируют автоклавированием.

Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества нитратредуктазного теста проводится каждый раз при проведении тестирования. Следует убедиться в чистоте исследуемых штаммов, строго соблюдать правила хранения и сроки использования растворов и реагентов.

В качестве положительного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) *M. tuberculosis*. Для отрицательного контроля проводят тестирование без добавления культур микроорганизмов.

Стандарты для нитратредуктазного теста

Чтобы обеспечить унификацию положительных результатов теста по выявлению способности микобактерий восстанавливать нитраты, рекомендуется использовать заранее приготовленную серию стандартов, соответствующих различной интенсивности окраски - от «+/-» до «5+». Эти стандарты можно хранить неопределенно долго и использовать при каждой постановке нитратредуктазного теста.

Реагенты и растворы

Раствор 1. 0,067М раствор фосфата натрия двузамещенного $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14)

Растворяют 23,68 г фосфата натрия двузамещенного в 1000 мл воды.

Раствор 2. 0,067М раствор фосфата калия однозамещенного KH_2PO_4 (MW 136.1)

Растворяют 9,07 г фосфата калия однозамещенного в 1000 мл воды

Раствор 3. 0,067М раствор фосфата натрия трехзамещенного $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$

(MW380.12).

Растворяют 25,47 г фосфата натрия трехзамещенного в 1000 мл воды.

Раствор 4. 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Растворяют 1 г фенолфталеина в 100 мл 95 %-го этилового спирта.

Раствор 5. 1 % спиртовой раствор бромтимолового синего.

Растворяют 1 г бромтимолового синего в 100 мл 95 %-го этилового спирта.

Раствор 6. 0,01 % раствор бромтимолового синего.

Растворяют 1,0 мл 1 % бромтимолового синего в 100 мл дистиллированной воды.

Раствор 7. Смешивают 35 мл раствора 1; 5 мл раствора 2 и 100 мл раствора 3.

Раствор 8. К 10 мл раствора 7 добавляют 0,1 мл раствора 4 и 0,2 мл раствора 6.

Методика

Маркируют 8 чистых пробирок (пробирки № 1–8).

Вносят 2 мл раствора 8 в пробирку № 1.

Вносят по 2 мл раствора 7 в пробирки № 2–8.

Вносят 2 мл раствора 8 в пробирку № 2, хорошо перемешивают и переносят 2 мл в следующую пробирку (№ 3). Серию двукратных разведений продолжают до пробирки № 8, из которой выливают 2 мл раствора.

В результате будут получены следующие цветовые стандарты:

пробирка № 1 - 5+

пробирка № 2 - 4+

пробирка № 3 - 3+

пробирка № 5 - 2+

пробирка № 6 - 1+

пробирка № 8 - +/-

Пробирки автоклавируют, герметично закрывают и хранят при 4 °С.

8.4.3. Каталазный тест

Принцип метода

Каталаза - это внутриклеточный растворимый фермент, который способен расщеплять перекись водорода на воду и кислород. При этом в реагирующей смеси образуются пузырьки кислорода, что указывает на наличие каталазной активности. Почти все виды микобактерий обладают каталазной активностью, за исключением *M. bovis* и некоторых резистентных к изониазиду штаммов *M. tuberculosis*. В клетках микобактерий присутствует ряд изоферментов каталазы, различающихся по термостабильности. После прогревания бактерий при 68 °С и рН 7,0 в течение 20 минут микобактерии комплекса *M. tuberculosis* демонстрируют отсутствие каталазной активности (термолабильная каталаза). Нетуберкулезные микобактерии синтезируют термостабильную каталазу.

Для постановки каталазных тестов следует использовать двухнедельные культуры, выращенные на среде Левенштейна-Йенсена при 35-37 °С.

Реактивы

0,067 М фосфатный буферный раствор, рН 7,0

Раствор 1. 0,067М раствор фосфата натрия двузамещенного $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (MW 358.14)

Растворяют 23,68 г фосфата натрия двузамещенного в 1000 мл воды.

Раствор 2. 0,067М раствор фосфата калия однозамещенного KH_2PO_4 (MW 136.1)

Растворяют 9,07 г фосфата натрия однозамещенного в 1000 мл воды

Рабочий раствор. Смешивают 61,1 мл раствора 1 и 38,9 мл раствора 2. Проверяют рН-раствор с помощью рН-метра

30 % перекись водорода (H_2O_2)

При постановке теста используют 30 % раствор перекиси водорода, а не 3 % раствор, который обычно получают из аптек. 30 % раствор перекиси водорода хранят в холодильнике. При работе с раствором используют резиновые перчатки и защитный щиток для глаз.

10 % Твин 80

Смешивают 10 мл Твин 80 с 90 мл дистиллированной воды и автоклавируют при 121 °С в течение 10 минут. В процессе автоклавирования Твин 80 может образовать осадок, который можно растворить при покачивании флакона сразу же после автоклавирования или в процессе охлаждения. Готовый раствор хранят в холодильнике в течение 3 месяцев.

Готовый каталазный реагент (смесь Твина 80 с перекисью водорода)

Непосредственно перед постановкой теста смешивают равные объемы 10 % раствора Твина 80 и 30 % раствора перекиси водорода. Для исследования каждого штамма требуется 1,0 мл каталазного реагента.

Методика

С соблюдением правил асептики вносят 0,5 мл 0,067 М фосфатного буферного раствора (рН 7,0) в 2 пробирки с завинчивающимися крышками.

В каждую пробирку вносят несколько петель или лопаток исследуемой культуры микобактерий, суспендируют.

Помещают одну пробирку с бактериальной суспензией в предварительно нагретую водяную баню на 20 минут при температуре 68 °С, вторую пробирку оставляют при комнатной температуре.

Через 20 минут достают пробирку из водяной бани и оставляют при комнатной температуре до полного остывания.

Вносят в каждую пробирку 0,5 мл свежеприготовленной смеси Твина 80 с перекисью водорода.

Наблюдают образование пузырьков, появляющихся на поверхности жидкости.

Нельзя встряхивать пробирку, так как при этом Твин 80 спонтанно образует пузырьки, что может стать причиной ложноположительного результата. Пробирки с отрицательными результатами теста нельзя сбрасывать раньше, чем через 20 минут.

Результаты и их интерпретация

Если пузырьки газа образуются в ненагретой пробирке и не образуются в нагретой пробирке, тестируемый штамм микобактерий обладает термолабильной каталазой.

Если пузырьки газа образуются в обеих пробирках, тестируемый штамм микобактерий обладает термостабильной каталазой.

Если пузырьки газа не образуются ни в одной пробирке, тестирование считается неудавшимся.

В редких случаях может наблюдаться небольшое количество пузырьков, поднимающихся от осадка бактериальных клеток; при этом пена в пробирке не образуется. В таких случаях результаты каталазного теста также считают положительными.

Для исключения ложноположительного результата необходимо повторить исследование с большим количеством бактериальной массы. Такой результат возможен и у каталаза-негативных микобактерий (редкие изониазид-устойчивые штаммы *M. tuberculosis*).

Утилизация отходов

Для нейтрализации содержимого пробирок после проведения реакции использовать 10 % NaOH или любое щелочное дезинфицирующее средство.

Все контаминированные материалы утилизируют автоклавированием.

Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества каталазного теста проводится каждый раз при проведении тестирования. В качестве положительного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) *M. tuberculosis*.

В качестве отрицательного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) НТМ, например, *M. fortuitum*, либо дистиллированную воду.

Следует убедиться в чистоте исследуемых штаммов, строго соблюдать правила хранения и сроки использования растворов и реагентов.

8.5. Культуральные методы идентификации микобактерий

Для идентификации микобактерий туберкулеза может быть использовано определение способности к росту при 37 °С на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей пара-нитробензойную кислоту (ПНБ-тест).

8.5.1. Тест с пара-нитробензойной кислотой (ПНБ-тест)

Принцип метода

Пара-нитробензойная кислота оказывает ингибирующее действие на рост микобактерий туберкулеза.

Приготовление среды с пара-нитробензойной кислотой

Растворяют 250 мг ПНБ в 10 мл пропиленгликоля на водяной бане при 37 °С.

Добавляют 10 мл полученного раствора к 490 мл среды Левенштейна-Йенсена, хорошо перемешивают.

Свертывание среды производят при 85 °С в течение 45 минут.

Конечная концентрация ПНБ в среде составляет 500 мкг/мл.

Методика

Производят посев по 0,2 мл суспензии микобактерий, соответствующей стандарту мутности McFarland 1, в две пробирки со средой Левенштейна-Йенсена, одна из которых содержит ПНБ в концентрации 500 мкг/мл, другая – контрольная без ПНБ.

Инкубирование проводят при 37 °С в течение 28 суток.

Результаты и их интерпретация

Если в обеих пробирках отмечается обильный рост, то исследуемый штамм принадлежит к нетуберкулезным микобактериям.

Если в контрольной пробирке отмечается обильный рост, а в пробирке с ПНБ – отсутствие роста или рост единичных колоний, то исследуемый штамм принадлежит к комплексу *M. tuberculosis*.

Если в обеих пробирках отмечается отсутствие роста, то результат невозможно интерпретировать. В этом случае тестирование следует повторить.

Утилизация отходов

Все контаминированные материалы утилизируют автоклавированием.

Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества проводится каждый раз при приготовлении новой партии питательной среды с ПНБ. В качестве положительного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) *M. tuberculosis*.

В качестве отрицательного контроля используют идентифицированный или референс-штамм (музейный) НТМ, например, *M. fortuitum*.

Следует убедиться в чистоте исследуемых штаммов, строго соблюдать правила хранения и сроки использования ПНБ.

8.6. Идентификация микобактерий комплекса *M. tuberculosis* с использованием культуральных и биохимических методов

При идентификации штаммов *M. tuberculosis* учитываются следующие морфологические, биохимические и культуральные свойства:

- появление видимого роста не ранее 3 недель инкубации (сутки инкубирования при 36±1 °С);
- наличие колоний характерной морфологии (шероховатые, напоминающие хлебные крошки или цветную капусту) и цвета (кремовые, цвета слоновой кости, никогда не бывают желтыми или оранжевыми);
- отсутствие роста на среде с ПНБ (500 мкг/мл);
- положительный результат ниацинового теста;
- положительный результат нитратредуктазного теста;

- термолабильная каталаза.

Алгоритм идентификации микобактерий с использованием культуральных и биохимических тестов представлен на рис. 8.1.



8.7. Иммунохроматографическая идентификация комплекса *M. tuberculosis*

Биохимические, иммунологические и молекулярно-биологические исследования микобактерий туберкулеза привели к выявлению нескольких антигенов, которые оказались полезны для разработки более совершенных методов и коммерческих тестов идентификации *M. tuberculosis*. Микобактерии туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), как известно, продуцируют, то есть выделяют в питательную среду, более 30 различных белков, один из преобладающих – МРТ64 (МРВ64). Было установлено, что нетуберкулезные микобактерии не продуцируют этот белок, таким образом, обнаружение МРТ64 (МРВ64) в пробе свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к комплексу *M. tuberculosis*.

Иммунохроматографию можно отнести к группе реакций с мечеными антителами. В реакции используют моноклональные антитела к искомому антигену, адсорбированные на микрочастицах (окрашенный латекс или частицы коллоидного

золота), и моноклональные антитела к тому же антигену, иммобилизованные в виде полосы на хроматографической бумаге. Кроме того, в этой реакции имеется внутренний контроль (антивидовые антитела, также закрепленные в виде полосы на хроматографической бумаге).

Тест-системы, основанные на данном принципе, обладают высокой специфичностью. Данный метод может быть использован для быстрой идентификации комплекса микобактерий туберкулеза из жидких и твердых культур.

Подготовленный исследуемый материал (суспензия микобактерий или положительная жидкая культура) в небольшом количестве (100 мкл) вносится в стартовое окно тест-системы. Здесь происходит взаимодействие антигена с антителами, адсорбированными на частицах, и начинается движение образовавшихся комплексов за счет капиллярности бумаги. Дойдя до антител, расположенных на бумаге в окне учета результата, эти комплексы связываются, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого (латекс) или (коричневого) цвета. Наличие полосы в окне учета результата свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к комплексу *M. tuberculosis*, отсутствие – о принадлежности исследуемого штамма микобактерий к НТМ. Поскольку частицы, нагруженные антителами, берутся в избытке, часть их движется дальше и связывается в окне внутреннего контроля реакции. Полоса в этом окне свидетельствует о правильной работе тест-системы. В случае отсутствия полосы в окне внутреннего контроля реакции результаты интерпретировать нельзя. Интерпретация результатов теста проводится через 15 минут после внесения суспензии микобактерий в стартовое окно.

Выполнять исследования следует в соответствии с инструкцией производителя.

Внутренний контроль качества

Сразу же после получения новой партии тестов должно быть проведено тестирование заведомо положительных и отрицательных проб, для того чтобы проверить, не произошло ли повреждение тестов в ходе транспортировки.

Внутренний контроль качества проводится каждый раз при проведении тестирования.

В качестве положительного контроля могут быть использованы:

- музейный штамм H37Rv или клинический изолят *M. tuberculosis*;
- суспензия 1 мкл (эквивалент 1 петли диаметром 1 мм) колоний *M. bovis BCG* в 0,2 мл 10 ммоль/л фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 0,1 % Твина-80;
- жидкая культура *M. bovis BCG* (McFarland 1 ($3-6 \times 10^7$ КОЕ/мл)), выращенная в жидкой среде.

Следует иметь в виду, что некоторые штаммы *M. bovis BCG* (Глахо, пастеровский,

тайский) не экспрессируют МРТ64 или МРВ64. Поэтому только бразильский, японский (Токио), русский, шведский штаммы *M. bovis BCG* можно использовать в качестве положительного контроля.

В качестве отрицательного контроля могут быть использованы:

- незасеянная жидкая среда;
- 10 ммоль/л фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 0,1 % Твина-80;
- любая нетуберкулезная микобактерия, например, *M. smegmatis* или *M. goodii*.

8.8. Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий

Дифференциацию микобактерий туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*) и идентификацию НТМ рекомендуется проводить с использованием молекулярно-генетических методов исследования.

Использование молекулярно-генетических методов для идентификации микобактерий основано на гибридизации ДНК исследуемого штамма со специфическими для вида микобактерий ДНК-зондами. Применение молекулярно-генетических методов позволяет проводить идентификацию микобактерий в течение рабочего дня.

Наиболее эффективными признаны молекулярно-генетические методы, основанные на гибридизации с ДНК-зондами (Line Probe Assay, LPA), в частности, GenoType® Mycobacterium CM/AS, GenoType® MTBC, INNO-LiPA MYCOBACTERIA. Технология проведения исследований с использованием этих методов включает следующие этапы:

1. Выделение ДНК из культур микобактерий.
2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации фрагментов генов микобактерий.
3. Гибридизация ПЦР-продуктов с ДНК-зондами, иммобилизованными на полоске.
4. Визуализация результатов гибридизации, при этом определяется принадлежность микобактерий к определенному виду.

Выполнять исследования следует в соответствии с инструкцией производителя.

8.9. Хранение выделенных штаммов микобактерий

8.9.1. Кратковременное хранение

Допускается хранение культуры микобактерий при температуре 2-8 °С на плотных питательных средах в течение 1 года или при комнатной температуре (не выше 20 °С) в темном проветриваемом месте до 6 месяцев.

Хранение культур в жидкой питательной среде допускается на срок не более 1 месяца.

8.9.2. Долговременное хранение

Клинические изоляты и референс-штаммы для контроля качества должны быть сохранены/заархивированы в адекватных условиях для сохранения жизнеспособности и специфических характеристик штамма. Чтобы избежать многократного субкультивирования, которое может привести к генетическим изменениям, которые приводят к изменению фенотипических и биологических характеристик штамма, целесообразно замораживать культуры микобактерий, которые могут сохраняться в таких условиях в течение нескольких лет (-20 °С) или десятилетий (-70 °С). Следует иметь в виду, что жизнеспособность микобактерий туберкулеза снижается гораздо быстрее при -20 °С, чем при -70 °С, а также что большая плотность замораживаемой суспензии способствует поддержанию жизнеспособности культуры микобактерий. Штаммы для контроля качества желательно хранить при -70 °С и использовать их в течение одного года, поскольку по истечении этого срока жизнеспособность может значительно уменьшиться.

Среда для замораживания

Используют один из следующих вариантов среды для замораживания:

1. 10 % раствор молока, стерилизованный при температуре 110 °С в течение 10 минут (возможно использование сухого молока или коммерческого реагента Skimmed Milk Powder);

2. жидкая питательная среда с повышенным содержанием глицерина, например, Middlebrook 7H9 с добавкой ADC или триптиказо-соевый бульон, приготовленные согласно инструкции производителя;

3. 5 % глицерин в 0,85 % растворе NaCl, стерилизованный при температуре 110 °С в течение 10 минут.

Процедура

Используют только свежие культуры микобактерий, выросшие на плотной среде. Если культура является старой (более 3 недель), ее пересевают на свежую среду, культивируют при 37 °С. Как только появляется хороший рост, используют эту культуру для замораживания.

Стерильной лопаткой или бактериологической петлей снимают максимально возможное число колоний, стараясь не захватывать питательную среду, и вносят в криопробирку, содержащую 1,5 мл одной из вышеперечисленных сред.

Пробирки маркируют с указанием даты приготовления субкультуры, делают запись в журнале.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

9.1. Общие положения

Необходимо тщательно выполнять рекомендации по проведению всех этапов исследования на лекарственную чувствительность МБТ и не вносить в стандартную процедуру никаких модификаций.

Для предотвращения контаминации при выполнении всех этапов исследования следует использовать только стерильные растворы, пробирки, пипетки и т.д.

Точное взвешивание веществ противотуберкулезных лекарственных средств, приготовление их растворов, разведение и добавление в среду, приготовление суспензий МБТ является необходимым условием для получения достоверных результатов исследования.

Для приготовления растворов должны использоваться только качественные (от известных производителей или фармацевтических компаний) химически чистые вещества ПТЛС. Лекарственные формы для определения лекарственной чувствительности микобактерий непригодны.

Химически чистые вещества должны иметь оригинальное название, сведения об активности (содержание действующего вещества в процентах, мкг/мг или IU/mg) и срок годности (expiration date). Производитель должен представить сертификаты анализа чистоты субстанций с использованием методов тонкослойной хроматографии или жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC). Сертификаты анализа (Certificate of analysis) веществ должны представляться при покупке химически чистых веществ ПТЛС. Также их можно получить на сайтах фирм-производителей, указав название вещества, номер по каталогу (CAT NO) и номер лота (LOT NO).

Субстанции должны храниться в сухом месте, лучше всего в коробке с поглотителем влаги, в соответствии с инструкциями производителя. Некоторые субстанции должны храниться в холодильнике (2-8 °C) или морозильнике (-18-20 °C), другие - при комнатной температуре (Storage at room temperature, RT). Перед началом работы необходимо довести температуру субстанции до комнатной температуры.

Для приготовления навесок ПТЛС необходимо использовать электронные или аналитические весы, дискретность которых позволяет точно взвешивать маленькие количества ПТЛС. Растворы ПТЛС обычно готовят с использованием стерильной дистиллированной воды. В случае низкой растворимости вещества применяют этиловый или метиловый спирт, диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль. В этом

случае навеску ПТЛС растворяют в минимальном объеме растворителя (допускается подогревание в теплой водяной бане или в термостате при 37°C), после чего разводят дистиллированной водой до нужной концентрации.

Можно готовить концентрированные растворы ПТЛС, делить их на небольшие аликвоты в стерильных полипропиленовых или полиэтиленовых микропробирках, пригодных для замораживания, и хранить при температуре -20 °С или при -70 °С в течение не более 6 месяцев. Допускается только однократное замораживание. Микропробирки маркируют с указанием названия ПТЛС и даты приготовления или срока годности. Перед использованием концентрированные растворы ПТЛС согревают до комнатной температуры, после чего разводят стерильной дистиллированной водой до нужной концентрации. После размораживания и использования остаток раствора следует выбросить, поскольку повторное замораживание может оказать влияние на активность ПТЛС.

Для исключения сомнительных результатов исследования ТЛЧ не следует проводить при однократном выделении от пациента культуры МБТ в количестве менее 5 колоний. ТЛЧ в таких случаях выполняется только по запросу лечащего врача или консилиума. В случае многократного (два и более раз) выделения от пациента культуры МБТ в количестве менее 5 колоний ТЛЧ проводится, однако в таких случаях при интерпретации результатов ТЛЧ следует принимать во внимание возможность вариабельности результатов исследования.

9.2. Выбор ПТЛС для определения лекарственной чувствительности МБТ

ПТЛС делятся на несколько групп в зависимости от активности, подтвержденной эффективностью, класса лекарственных средств:

Группа 1. Оральные ПТЛС I ряда: изониазид (H), рифампицин (R), рифабутин (Rb), этамбутол (E), пиразинамид (PZA).

Группа 2. Инъекционные ПТЛС: стрептомицин (S), канамицин (Km), амикацин (Am), капреомицин (Cm), виомицин (Vm).

Группа 3. Фторхинолоны (Fq): цiproфлоксацин (Cfx), офлоксацин (Ofx), левофлоксацин (Lfx), моксифлоксацин (Mfx), гатифлоксацин (Gfx).

Группа 4. Бактериостатические ПТЛС II ряда: этионамид (Eto), протионамид (Pto), циклосерин (Cs), теризидон (Tzd), ПАСК (PAS), тиацетазон (Thz).

Группа 5. ПТЛС с недоказанной эффективностью: клофазимин (Cfz), амоксициллин/клавуланат (Amx/Cl), кларитромицин (Clr), линезолид (Lzd).

Определение лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена следует проводить для следующих ПТЛС:

1. оральные ПТЛС I ряда: изониазид, рифампицин, этамбутол;
2. инъекционные ПТЛС: аминогликозиды - стрептомицин, амикацин и/или канамицин, полипептиды - капреомицин;
3. фторхинолоны - офлоксацин;
4. бактериостатические ПТЛС - этионамид/протионамид, ПАСК, циклосерин.

При интерпретации результатов определения чувствительности МБТ к этионамиду/протионамиду, циклосерину, ПАСК следует учитывать низкую воспроизводимость результатов ТЛЧ к данным ПТЛС.

9.3. Критические концентрации ПТЛС

Для определения чувствительности микобактерий туберкулеза к ПТЛС используют метод абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена.

Принцип метода абсолютных концентраций заключается в детекции ингибирования роста штамма МБТ при выращивании его на питательных средах, содержащих определенные концентрации ПТЛС.

В таблице 9.1 приведены критические концентрации ПТЛС, рекомендуемые ВОЗ для определения лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена.

Таблица 9.1 - Критические концентрации ПТЛС, рекомендуемые ВОЗ для определения лекарственной чувствительности МБТ на среде Левенштейна-Йенсена

Название лекарственного средства	Критическая концентрация, мкг/мл
Изониазид (H)	0,2
Изониазид (H)	1
Рифампицин (R)	40,0
Стрептомицин (S)	4,0
Этамбутол (E)	2,0
Канамицин (Km)	30,0
Амикацин (Am)	40,0
Капреомицин (Cm)	40,0
Офлоксацин (Ofx)	2,0
Этионамид (протионамид) (Eto/Pto)	40,0
Циклосерин (Cs)	40,0
ПАСК (PAS)	1,0

9.4. Расчет навески ПТЛС

Содержание действующего вещества ПТЛС может составлять менее 100 % веса в используемом химически чистом веществе. Кроме того, уровень активности ПТЛС может меняться в зависимости от партии.

Например, содержание действующего вещества стрептомицина сульфата может составлять 800,0 мг/г (80 % от веса субстанции), канамицина сульфата - 797,0 мг/г (79,7 %), ПАСК - 877,2 мг/г (87,72 %).

Концентрации рабочих растворов должны учитывать содержание действующего вещества ПТЛС в используемом химически чистом веществе в соответствии с данными производителя, а также фактор разбавления раствора ПТЛС в питательной среде.

Поэтому раствор ПТЛС, который будет добавляться в среду, должен быть стандартизован. Для расчета навески ПТЛС используется поправочный коэффициент (ПК), который позволяет рассчитать навеску ПТЛС, соответствующую 1 мг (1000 мкг) действующего вещества данного ПТЛС, и вычисляется по формуле

$$ПК = \frac{1000 \text{ мкг}}{\text{содержание действующего вещества (мкг/мг)}}$$

Необходимую навеску ПТЛС следует умножить на поправочный коэффициент, чтобы определить количество субстанции, которое нужно взвесить.

Например, для канамицина сульфата с содержанием действующего вещества 797 мкг/мг

$$ПК = \frac{1000}{797} = 1,26$$

то есть для того, чтобы получить навеску 1 мг действующего вещества канамицина сульфата, следует взвесить 1,26 мг химически чистого вещества канамицина сульфата с содержанием действующего вещества 797 мкг/мг.

Для канамицина сульфата с содержанием действующего вещества 823 мкг/мг

$$PK = \frac{1000}{823} = 1,21$$

то есть для того, чтобы получить навеску 1 мг действующего вещества канамицина сульфата, следует взвесить 1,21 мг химически чистого вещества канамицина сульфата с содержанием действующего вещества 823 мкг/мг.

Поскольку рабочее разведение ПТЛС вносят в среду в соотношении 1:100, концентрация рабочего разведения ПТЛС должна быть в 100 раз выше критической концентрации. Например, критическая концентрация канамицина сульфата составляет 30 мкг/мл, следовательно рабочее разведение этого ПТЛС должно иметь концентрацию 3000 мкг/мл.

В случаях, когда трудно точно взвесить требуемое количество химически чистого вещества ПТЛС, бывает удобнее увеличить объем растворителя (ОР) для ПТЛС. Объем растворителя рассчитывается по формуле

$$OP_{(мл)} = \frac{\text{навеска ПТЛС (мг)} \times \text{содержание действующего вещества (мкг/мг)}}{\text{нужная концентрация ПТЛС (мкг/мл)}}$$

Пример расчета навески ПТЛС

Необходимо взвесить 60 мг (60 000 мкг) действующего вещества канамицина и растворить навеску в 10 мл воды для получения раствора 6000 мкг/мл. Содержание действующего вещества канамицина сульфата в химически чистом веществе - 797 мкг/мг.

$$\text{навеска ПТЛС} = 60 \times PK = 60 \times \frac{1000 \text{ мкг}}{797 \text{ мкг/мг}} = 75,28 \text{ мг}$$

Поскольку трудно точно взвесить 75,28 мг химически чистого вещества ПТЛС, можно взвесить 80 мг вещества и добавить больший объем растворителя.

$$OP = \frac{80 \text{ мг} \times 797 \text{ мкг/мг}}{6000 \text{ мкг/мл}} = 10,63 \text{ мл}$$

Следовательно, чтобы приготовить раствор канамицина сульфата 6000 мкг/мл, следует взвесить 80 мг химически чистого вещества, содержащего 797 мкг/мг действующего вещества канамицина сульфата, и растворить навеску в 10,63 мл воды.

9.5. Приготовление рабочих растворов ПТЛС

9.5.1. Изониазид

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества изониазида, содержащую 10 мг (10 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе 1 составляет 1000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием INH-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре -20 °С или -70 °С в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 0,5 мл раствора 1 добавляют 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе 2 составляет 100 мкг/мл.

Раствор 3 (рабочий). К 1 мл раствора 2 добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе 3 составляет 20 мкг/мл.

Рабочий раствор изониазида (раствор 2 для приготовления среды с концентрацией изониазида 1 мкг/мл и раствор 3 для приготовления среды с концентрацией изониазида 0,2 мкг/мл) добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.2. Рифампицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества рифампицина, содержащую 80 мг (80 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 5 мл ДМСО, затем добавляют 5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация рифампицина в полученном растворе 1 составляет 8000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием

RIF-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочий раствор рифампицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.3. Стрептомицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества дигидрострептомицина или дигидрострептомицина сульфата, содержащую 40 мг (40 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием SM-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 0,5 мл раствора 1 добавляют 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составляет 400 мкг/мл.

Рабочий раствор стрептомицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.4. Этамбутол

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества этамбутола гидрохлорида, содержащую 20 мг (20 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 2 000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием EMВ-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания

раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 0,5 мл раствора 1 добавляют 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляет 200 мкг/мл.

Рабочий раствор этамбутола добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.5. Канамицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества канамицина сульфата, содержащую 60 мг (60 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 6000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием КМ-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 200 мкг/мл.

Рабочий раствор канамицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.6. Амикацин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества амикацина, содержащую 80 мг (80 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 8000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием АМ-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл

раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация амикацина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочий раствор амикацина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.7. Капреомицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества капреомицина, содержащую 80 мг (80 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 4 000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием СМ-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация капреомицина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочий раствор капреомицина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.8. Офлоксацин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (0,1N NaOH). 0,4 г NaOH растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

Раствор 2 (хранение). Навеску химически чистого вещества офлоксацина, содержащую 20 мг (20 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл 0,1 N NaOH. Концентрация офлоксацина в полученном растворе составляет 2000 мкг/мл.

Раствор 2 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием OFX-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 3 (рабочий). Для проведения исследования раствор 2 оттаивают. К 0,5 мл раствора 1 добавляют 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация

офлоксацина в полученном растворе составляет 200 мкг/мл.

Рабочий раствор офлоксацина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.9. Этионамид (протионамид)

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества этионамида, содержащую 80 мг (80 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 5 мл этанола или пропиленгликоля, затем добавляют 5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этионамида в полученном растворе 1 составляет 8000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием ЕТО-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре -20 °С или -70 °С в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этионамида в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочий раствор этионамида добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.10. Циклосерин

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества циклосерина, содержащую 80 мг (80 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация циклосерина в полученном растворе составляет 8000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 2,2 мл в криопробирки, промаркированные названием СS-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре -20 °С или -70 °С в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 2 мл раствора 1 добавляют 2 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация циклосерина в полученном растворе составляет 4000 мкг/мл.

Рабочий раствор циклосерина добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.5.11. ПАСК

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (хранение). Навеску химически чистого вещества натриевой соли парааминосалициловой кислоты, содержащую 10 мг (10 000 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Концентрация ПАСК в полученном растворе составляет 1000 мкг/мл.

Раствор 1 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием CS-ЛЙ и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 2 (рабочий). Для проведения исследования раствор 1 оттаивают. К 0,5 мл раствора 1 добавляют 4,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация ПАСК в полученном растворе составляет 100 мкг/мл.

Рабочий раствор ПАСК добавляют в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, тщательно перемешивают.

9.6. Приготовление и хранение среды Левенштейна-Йенсена с ПТЛС

Среду Левенштейна-Йенсена готовят как описано в [п. 6.2.1](#). После размешивания среду разливают по флаконам для приготовления среды с различными ПТЛС. В среду добавляют раствор ПТЛС в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды, хорошо перемешивают, разливают в пробирки, промаркированные названием ПТЛС и его концентрацией, по 5 мл, следя за тем, чтобы в растворе не образовался осадок. Для предупреждения выпадения осадка пробирки с яичной средой помещают в свертыватель не позже чем через 15 минут после разлива среды.

Свертывание и хранение среды проводят как описано в [п. 6.2.1](#).

9.7. Приготовление суспензии микобактерий, ее стандартизация, инокуляция, инкубирование посевов

Для определения лекарственной чувствительности используют культуру микобактерий через 1-2 недели после появления видимого роста на плотной питательной среде. Если прошло более двух недель от момента появления видимого роста, культуру следует пересеять.

Перед посевом пробирки с ПТЛС и контрольные пробирки, не содержащие ПТЛС, маркируют, указывая номер теста на лекарственную чувствительность.

Стерильной лопаткой или бактериологической петлей снимают максимально возможное число колоний, стараясь не захватывать питательную среду, поскольку она увеличивает мутность суспензии. Колонии переносят в стерильную пробирку и растирают стерильной стеклянной палочкой на ее стенках, не касаясь дна, в течение 1

минуты. Затем в пробирку добавляют 3 мл стерильного физраствора, аккуратно встряхивают несколько раз до получения однородной суспензии. Суспензию оставляют на 10–30 минут для осаждения крупных конгломератов. Надосадочную жидкость вносят пипеткой по каплям в пробирку с 2–3 мл стерильного физраствора до достижения оптической плотности суспензии 0,5 по шкале McFarland. Засевают по 0,2 мл суспензии на пробирку. После посева пробирки, не закручивая плотно крышки, помещают в термостат при температуре 36 ± 1 °С в наклонном положении так, чтобы поверхность среды располагалась горизонтально, чтобы равномерно распределить суспензию микобактерий по поверхности среды. Через 2–3 суток инкубации пробирки просматривают для выявления контаминации, плотно закручивают крышки и переводят пробирки в вертикальное положение.

Суспензию микобактерий после выполнения ТЛЧ замораживают для хранения как описано в [п. 8.9.2.](#)

9.8. Приготовление стандартов мутности по McFarland

Раствор 1 (1 % раствор BaCl_2). 0,1 г BaCl_2 растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Раствор 2 (1 % раствор H_2SO_4). К 99 мл дистиллированной воды добавляют 1 мл H_2SO_4 . Никогда не наливать воду в кислоту!

Маркируют пробирки с указанием номера стандарта («McFarland № ...») и даты приготовления. Необходимо убедиться в том, что стандарт McFarland приготовлен в такой же пробирке, которая будет использоваться для приготовления суспензии микобактерий.

Серии разведений 1 % BaCl_2 в 1 % H_2SO_4 готовят согласно таблице 9.3.

Таблица 9.3 – Приготовление стандарта мутности по McFarland

Стандарт мутности по McFarland	0,5	1	2	3	4	5
BaCl_2 (1 %), мл	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
H_2SO_4 (1 %), мл	10,0	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5
Количество бактерий, $\times 10^8$ КОЕ/мл	1,5	3	6	9	12	15

Крышки пробирок заклеивают изоляцией. Пробирки хранят в холодильнике при 2–8 °С в течение 6 месяцев.

Приготовленные таким образом стандарты мутности позволяют с определенной

точною калибровать бактериальные суспензии. Перед использованием стандарта мутности пробирку необходимо энергично встряхнуть для растворения солевого осадка.

9.9. Учет, интерпретация и регистрация результатов

Пробирки с посевами инкубируют в течение 4 недель, после чего проводят учет результатов. В контрольной пробирке должен быть получен обильный рост (более 100 колоний). В случае слабого роста МБТ в контрольной и опытных пробирках следует инкубировать посеvy до 5 недель.

Штамм микобактерий считается чувствительным к ПТЛС в случае присутствия в популяции менее 1 % резистентных микобактерий, то есть роста 20 КОЕ и менее на среде с ПТЛС при обильном росте в контроле. Штамм микобактерий считается устойчивым к ПТЛС в случае присутствия в популяции более 1 % резистентных микобактерий, то есть роста более 20 КОЕ на среде с ПТЛС при обильном росте в контроле. В случае скудного роста в контроле исследование необходимо повторить.

Случаи, когда на пробирках с ПТЛС регистрируется скудный рост МБТ (около 1 % от роста в контроле), рассматриваются как устойчивые. Исследование в таких случаях следует повторить.

Регистрация исследований на лекарственную чувствительность микобактерий в лаборатории ведется в лабораторном журнале и/или электронной базе данных.

Результат исследования оформляется на бланке. Результаты ТЛЧ к ПТЛС основного и резервного ряда записываются в отдельных столбцах бланка.

9.10. Внутренний контроль качества при определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

9.10.1. Контроль качества питательной среды

Контроль качества среды Левенштейна-Йенсена – цвет, консистенция, гомогенность, стерильность – проводится в соответствии с общими требованиями контроля качества питательных сред, изложенными в [п. 6.3](#).

Контроль чувствительности (способность выявлять устойчивые штаммы МБТ) и специфичности (способность выявлять чувствительные штаммы МБТ) среды Левенштейна-Йенсена, содержащей ПТЛС, проводится для каждой партии среды для обеспечения уверенности в достоверности полученных результатов.

В качестве контрольного используется стандартный лабораторный штамм, чувствительный ко всем ПТЛС (например, H₃₇Rv или «Академия»). Контрольный штамм засеивается так же, как испытуемые.

Если среда с ПТЛС приготовлена правильно, то контрольный штамм МБТ не должен расти на средах, содержащих ПТЛС, при обильном росте в контроле.

Появление роста контрольного штамма на среде, содержащей ПТЛС, свидетельствует о том, что при приготовлении среды допущена ошибка, либо суспензия микобактерий приготовлена неправильно. Если результат контроля свидетельствует о неудовлетворительном качестве серии среды, необходимо провести повторное определение лекарственной чувствительности всех штаммов МБТ с использованием новой серии среды. Вся партия замороженного раствора ПТЛС должна быть заменена свежеприготовленным раствором.

9.10.2. Причины возможных ошибок при определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

При выполнении тестов на лекарственную чувствительность МБТ следует учитывать следующие возможные ошибки:

- использование ПТЛС и компонентов среды низкого качества, с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;
- неисправность весов или использование весов неподходящего класса точности;
- ошибки при расчете навески или взвешивании ПТЛС;
- неправильное приготовление разведений ПТЛС;
- произвольное уменьшение объема среды в пробирке, что приводит к нарушению соотношения между количеством клеток микобактерий и количеством ПТЛС;
- несоблюдение времени и температуры свертывания питательной среды. Повышение температуры или увеличение времени экспозиции приводит к изменению ростовых свойств среды и к тепловой деградации лекарственных средств, что искажает уровень лекарственной резистентности МБТ;
- нарушение условий и срока хранения готовой среды с ПТЛС;
- засев нестандартизированной суспензии микобактерий: слишком маленький или слишком большой объем суспензии МБТ, слишком маленькая или слишком большая концентрация МБТ;
- несоблюдение температуры инкубирования посевов;
- слишком короткий срок инкубации;
- отсутствие контроля качества сред с использованием стандартного штамма;
- учет результатов ТЛЧ МБТ в случае неудовлетворительных результатов контроля с использованием лабораторного штамма, в том числе в случае скудного роста в контроле.

10. АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

10.1. Детекция микобактерий

Преимуществом использования автоматизированных систем для культивирования микобактерий является сокращение сроков диагностики туберкулеза в 2-3 раза по сравнению с традиционными методами, что позволяет своевременно назначать адекватные схемы химиотерапии, снизить частоту формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, уменьшить общебольничные затраты на лечение пациентов.

Детекцию и определение чувствительности микобактерий туберкулеза к ПТЛС с помощью автоматизированных систем проводят параллельно с традиционными исследованиями диагностического материала на плотных питательных средах.

Проведение исследований с помощью автоматизированных систем должно осуществляться в строгом соответствии с инструкцией производителя.

Доставленный в лабораторию для исследования образец диагностического материала обрабатывают с целью разжижения и деkontаминации в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе (обычно с использованием NaLC-NaOH), засевают в жидкую и на плотную питательные среды. Параллельно проводят микроскопическое исследование осадка диагностического материала по Цилю-Нильсену. Засеянные пробирки с плотной средой помещают в термостат, пробирки с жидкой средой устанавливают в прибор.

Результат исследования диагностического материала с помощью автоматизированных систем расценивается как положительный при наличии флуоресценции (в системах с флуориметрической детекцией) или изменении цвета сенсора (в системах с колориметрической детекцией) в пробирке с диагностическим материалом. Поскольку среда, используемая в автоматизированных системах, не является селективной, после получения сообщения о наличии роста в пробирке следует определить наличие роста микобактерий. Обычно рост МБТ проявляется появлением своеобразной «зернистости» или белых хлопьев на дне пробирки, при этом прозрачность среды может почти не меняться. Сильная мутность среды может свидетельствовать о наличии контаминации посторонней флорой. Содержимое из «положительной» пробирки должно быть использовано для приготовления мазков; посева на кровяной агар для контроля контаминации; идентификации и субкультивирования на плотных средах.

Максимальное рекомендованное время инкубации пробирок в приборе ВАСТЕС MGIT 960 - 42 дня. Пробирки, в которых рост микобактерий не зафиксирован прибором в течение указанного времени, идентифицируются системой как отрицательные. При наличии видимого осадка в пробирке, идентифицированной системой как

отрицательная, рекомендуется провести бактериоскопическое исследование на КУБ и посев на кровяной агар.

При обнаружении роста КУБ и контаминации в одной и той же «положительной» пробирке рекомендуется провести повторную процедуру деконтаминации и посев в новую пробирку с жидкой питательной средой. При получении отрицательного результата микроскопии на КУБ и отсутствии контаминации в «положительной» пробирке рекомендуется дополнительное инкубирование посева в термостате при 36 ± 1 °С. В данном случае необходимо каждые 5–7 суток до получения положительного результата проводить посев среды из пробирки на кровяной агар и готовить мазок для окраски по Цилю-Нильсену. При отсутствии положительного результата до 42 суток выдается заключение об отсутствии роста МБТ.

Различие в составе плотных и жидких питательных сред приводят к расхождению результатов бактериологического исследования с использованием традиционного метода и автоматизированной системы в 5–10 % случаев. Тем не менее, результат бактериологического исследования образца диагностического материала расценивается как положительный вне зависимости от того, получен он на плотной или в жидкой среде.

10.2. Внутренний контроль качества питательной среды для детекции микобактерий с использованием автоматизированной системы

Каждая партия среды должна быть протестирована с использованием референс-штамма. Можно использовать любой доступный референс-штамм или хорошо изученный клинический изолят микобактерий. Предпочтительнее использовать быстрорастущие НТМ (*M. fortuitum* и др.). При тестировании должен быть обнаружен рост контрольного штамма в течение определенного промежутка времени (табл. 10.1).

Таблица 10.1 - Разведение и время до детекции видимого роста контрольных штаммов в жидкой среде

Вид	Номер штамма	Разведение суспензии McFarland 0,5	Время до детекции роста, сут.
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	1:500	6–10
<i>M. kansasii</i>	DSM 44162 ATCC 12478	1:50 000	6–11
<i>M. fortuitum</i>	CCUG 46694	1:5000	1–3

10.3. Определение лекарственной чувствительности микобактерий с использованием автоматизированной системы

Определение лекарственной чувствительности микобактерий можно проводить с использованием культуры микобактерий в жидкой среде или колоний микобактерий,

выросших на плотной питательной среде. Исследование проводят в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе.

В настоящее время выпускаются диагностические наборы для автоматизированных систем, позволяющие проводить определение чувствительности микобактерий туберкулеза к пяти основным ПТЛС в следующих концентрациях (мкг/мл): стрептомицин (S) – 1,0; изониазид (I) – 0,1; рифампицин (R) – 1,0; этамбутол (E) – 5,0; пиперазид (PZA) – 100,0.

Диагностические наборы для автоматизированных систем, позволяющие проводить определение чувствительности микобактерий туберкулеза к ПТЛС резервного ряда, в настоящее время не выпускаются. Поэтому лаборатория должна сама приготовить растворы ПТЛС в рекомендуемых концентрациях.

Расчет навески ПТЛС и объема растворителя проводят как описано в [п. 9.4](#).

Для тестирования лекарственной чувствительности микобактерий в пробирку MGIT с 7,0 мл среды добавляют 0,8 мл добавки MGIT 960 SIRE и вносят 0,5 мл инокулята (суспензии микобактерий). Таким образом, общий объем засеянной среды составляет 8,3 мл. В пробирку вносят 0,1 мл раствора ПТЛС, достигая разбавления ПТЛС 1:83 (0,1 мл объема добавленного ПТЛС не принимается в расчет).

Для исследований на лекарственную чувствительность используют только химически чистые вещества ПТЛС, учитывают содержание активного начала в используемом химически чистом веществе. Критические концентрации ПТЛС резервного ряда, рекомендованные ВОЗ, представлены в таблице 10.2.

Таблица 10.2 - Критические концентрации ПТЛС резервного ряда для ВАСТЕС MGIT 960

ПТЛС	Критическая концентрация для ВАСТЕС MGIT 960, мкг/мл
Офлоксацин (Ofx)	2,0
Левифлоксацин (Lfx)	2,0
Амикацин (Am)	1,0
Капреомицин (Cm)	2,5
Канамицин (Km)	2,5
Моксифлоксацин (Mfx)	0,25

10.3.1. Приготовление рабочих растворов ПТЛС резервного ряда

Офлоксацин (левофлоксацин)

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (0,1N NaOH). 0,4 г NaOH растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

Раствор 2. Навеску химически чистого вещества офлоксацина, содержащую 33,2 мг (33 200 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл 0,1N раствора NaOH. Концентрация офлоксацина в полученном растворе составляет 3320 мкг/мл.

Раствор 3 (хранение). К 1 мл раствора 2 добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация офлоксацина в полученном растворе составляет 332 мкг/мл. Для приготовления раствора 3 можно использовать весь объем раствора 2.

Раствор 3 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием OFX и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 4 (рабочий). Для проведения исследования раствор 3 оттаивают. К 0,5 мл раствора 3 добавляют 0,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация офлоксацина в полученном растворе составляет 166 мкг/мл.

100 мкл рабочего разведения офлоксацина добавляют в пробирку MGIT. Концентрация офлоксацина в среде составляет 2,0 мкг/мл.

Амикацин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1. Навеску химически чистого вещества амикацина, содержащую 33,2 мг (33 200 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация амикацина в полученном растворе составляет 3320 мкг/мл.

Раствор 2 (хранение). К 1 мл раствора 1 добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация амикацина в полученном растворе составляет 332 мкг/мл. Для приготовления раствора 2 можно использовать весь объем раствора 1.

Раствор 2 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием AM и датой приготовления. Хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 3 (рабочий). Для проведения исследования раствор 2 оттаивают. К 0,5 мл раствора 2 добавляют 1,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация амикацина в полученном растворе составляет 83 мкг/мл.

Для проведения исследования 100 мкл рабочего разведения амикацина добавляют

в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация амикацина в среде составляет 1,0 мкг/мл.

Капреомицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1. Навеску химически чистого вещества капреомицина, содержащую 41,5 мг (41 500 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация капреомицина в полученном растворе составляет 4150 мкг/мл.

Раствор 2 (хранение). К 1 мл раствора 2 добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация капреомицина в полученном растворе составляет 415 мкг/мл. Для приготовления раствора 2 можно использовать весь объем раствора 1.

Раствор 2 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием СМ и датой приготовления. Хранят при температуре -20°C в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 3 (рабочий). Для проведения исследования раствор 2 оттаивают. К 0,5 мл раствора 2 добавляют 0,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация капреомицина в полученном растворе составляет 207,5.

Для проведения исследования 100 мкл рабочего разведения капреомицина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация капреомицина в среде составляет 2,5 мкг/мл.

Канамицин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1. Навеску химически чистого вещества канамицина, содержащую 41,5 мг (41 500 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 4150 мкг/мл.

Раствор 2 (хранение). К 1 мл раствора 2 добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 415 мкг/мл. Для приготовления раствора 2 можно использовать весь объем раствора 1.

Раствор 2 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием КМ и датой приготовления. Хранят при температуре -20°C в течение 6 месяцев.

Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 3 (рабочий). Для проведения исследования раствор 2 оттаивают. К 0,5 мл раствора 2 добавляют 0,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация канамицина в полученном растворе составляет 207,5.

Для проведения исследования 100 мкл рабочего разведения канамицина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация канамицина в среде составляет 2,5 мкг/мл.

Моксифлоксацин

Перед приготовлением рабочего раствора необходимо уточнить содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС и рассчитать необходимую навеску и объем растворителя.

Раствор 1 (0,1N NaOH). 0,4 г NaOH растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

Раствор 2. Навеску химически чистого вещества моксифлоксацина, содержащую 41,5 мг (41 500 мкг) действующего вещества, растворяют в 10 мл 0,1 N NaOH. Концентрация моксифлоксацина в полученном растворе составляет 4150 мкг/мл.

Раствор 3. К 1 мл раствора 2 добавляют 9 мл 0,1 N NaOH. Концентрация моксифлоксацина в полученном растворе составляет 415 мкг/мл.

Раствор 4 (хранение). К 1 мл раствора 2 добавляют 9 мл 0,1 N NaOH. Концентрация моксифлоксацина в полученном растворе составляет 41,5 мкг/мл. Для приготовления раствора 4 можно использовать весь объем раствора 3.

Раствор 4 аликвотируют по 0,6 мл в криопробирки, промаркированные названием MFХ и датой приготовления. Хранят при температуре -20 °С в течение 6 месяцев. Возможно только однократное размораживание. После размораживания раствор используют сразу, хранение размороженных растворов не допускается.

Раствор 5 (рабочий). Для проведения исследования раствор 2 оттаивают. К 0,5 мл раствора 2 добавляют 0,5 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация моксифлоксацина в полученном растворе составляет 20,75.

Для проведения исследования 100 мкл рабочего разведения моксифлоксацина добавляют в пробирку, содержащую 7,8 мл среды Middlebrook. Концентрация моксифлоксацина в среде составляет 0,25 мкг/мл.

Процедура

Исследование проводят в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе (определение чувствительности МБТ к ПТЛС 1 ряда (SIRE)).

Соблюдение правильного порядка пробирок в держателе AST является необходимым условием для надлежащего выполнения тестирования. Порядок пробирок в держателе AST должен всегда быть единообразным. Пробирка контроля роста всегда должна находиться слева от всех пробирок набора.

При подготовке наборов пробирок AST необходимо использовать держатель пробирок, размер которого соответствует тестируемому набору AST. Число пробирок в наборе кодируется в штрих-коде держателя. Использование держателя неправильного размера может привести к тому, что прибор интерпретирует отсутствие пробирки как состояние ошибки, и вследствие этого результаты для всего набора AST будут признаны недействительными.

Набор комбинаций ПТЛС 2 ряда не запрограммирован в системе. Для предотвращения путаницы с результатами ТЛЧ к ПТЛС 1 ряда (SIRE) необходимо выбрать другую комбинацию ПТЛС для распечатки результатов тестирования, например:

Growth Control

Streptomycin

Streptomycin

Ethambutol

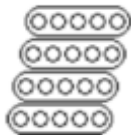
Ethambutol.

Не следует выбирать Undefined Drug вместо названия ПТЛС. В этом случае прибор определит только уровень Growth Unit (единица роста), но не интерпретирует результат исследования в данной пробирке как чувствительность (S) или устойчивость (R) к данному ПТЛС.

Для установки наборов пробирок AST в прибор открывают нужную секцию, нажимают программную клавишу «Загрузка пробирки»:



Сканируют этикетку держателя AST со штрихкодом. На экране отображается набор держателя по умолчанию. Поскольку вводимый набор AST не является набором по умолчанию, нажимают программную клавишу «Изменить определение набора AST»:



Используют клавишу СТРЕЛКА ВВЕРХ или СТРЕЛКА ВНИЗ для прокрутки доступных определений для отсканированного размера держателя. Нажимают программную клавишу «ОК» для выбора выделенного набора.

Устанавливают держатель AST в ячейки, обозначенные включенными зелеными индикаторами.

После завершения исследования и распечатки результатов вписывают названия ПТЛС 2 ряда в распечатанный протокол исследования. В таком же порядке результаты исследования для ПТЛС 2 ряда регистрируют в журнале.

При интерпретации результатов определения лекарственной чувствительности МБТ у пациентов в случае несовпадения данных, полученных с использованием автоматизированных систем и метода абсолютных концентраций, принимают во внимание результаты обоих методов. В данном случае рекомендуется проведение повторного тестирования.

10.4. Внутренний контроль качества определения лекарственной чувствительности микобактерий с использованием автоматизированной системы

В качестве референс-штамма для ТЛЧ с использованием автоматизированной системы рекомендуется использовать штамм *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Если данный штамм недоступен, можно использовать хорошо изученный клинический изолят *M. tuberculosis*, чувствительный ко всем тестируемым ПТЛС.

Внутренний контроль качества проводится для каждой новой партии раствора ПТЛС 2 ряда, нового лота SIRE или PZA, среды Middlebrook или PZA в пробирке MGIT.

Если прибор интерпретирует результат исследования в пробирках, содержащих ПТЛС, как чувствительность (S), то результаты контроля качества считаются удовлетворительными.

Если прибор интерпретирует результат исследования в одной или нескольких пробирках, содержащих ПТЛС, как устойчивость (R), то результаты контроля качества считаются неудовлетворительными. В этом случае необходимо повторить исследование с использованием контрольного штамма, в случае повторного неудовлетворительного результата провести повторное определение лекарственной чувствительности всех штаммов МБТ с использованием нового лота SIRE или PZA, среды Middlebrook или PZA в пробирке MGIT. Вся партия замороженного раствора ПТЛС должна быть заменена свежеприготовленным раствором.

Процедура

Рассевают референс-штамм в несколько пробирок с плотной питательной средой, инкубируют при 37 ± 1 °С. Когда в пробирках появится хороший сливающийся рост колоний, пробирки используют для приготовления суспензии.

Используют только свежие культуры микобактерий, выросшие на плотной среде. Если культура является старой (более 10-15 дней), ее пересевают на свежую среду, культивируют при 37 °С.

Стерильной лопаткой или бактериологической петлей снимают максимально возможное число колоний, стараясь не захватывать питательную среду, поскольку она увеличивает мутность суспензии. Колонии переносят в стерильную пробирку 1 и растирают стерильной стеклянной палочкой на ее стенках, не касаясь дна, в течение 1 минуты. Затем в пробирку добавляют 4 мл стерильного физраствора, аккуратно встряхивают несколько раз до получения однородной суспензии. Суспензию оставляют на 20 минут для осаждения крупных конгломератов.

Надосадочную жидкость переносят пипеткой в новую стерильную пробирку 2, стараясь не захватывать осадок, оставляют на 15 минут.

Надосадочную жидкость переносят пипеткой в новую стерильную пробирку 3, стараясь не захватывать осадок. Доводят мутность суспензии до McFarland 0,5, добавляя стерильный физиологический раствор и хорошо перемешивая. Если суспензия слишком мутная, переносят часть суспензии в стерильную пробирку 4 и доводят мутность суспензии до McFarland 0,5, добавляя стерильный физиологический раствор и хорошо перемешивая.

Проводят ТЛЧ с использованием новой партии раствора ПТЛС 2 ряда или нового лота SIRE или PZA в соответствии с инструкцией к автоматизированной системе.

Суспензию референс-штамма (пробирка 2) можно заморозить и хранить как описано в [п. 8.9.2](#).

11. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

11.1. Общие положения

Сроки выявления и идентификации микобактерий при проведении бактериологических исследований достаточно длительные и зависят от количества возбудителя в диагностическом материале. Современные молекулярно-генетические методы позволяют значительно сократить время исследования и с высокой чувствительностью и специфичностью проводить выявление микобактерий в различном диагностическом материале, их идентификацию и определение лекарственной чувствительности.

Молекулярная диагностика - один из наиболее современных и динамично развивающихся высокотехнологичных лабораторных методов, широко применяющийся

в диагностике инфекционных заболеваний. Она объединяет несколько методов исследования, самый распространенный из них - метод ПЦР (полимеразной цепной реакции). ПЦР - принципиально очень простой метод амплификации, т.е. умножения нуклеиновых кислот. Он имитирует естественный процесс репликации ДНК, при котором число молекул ДНК удваивается после каждого цикла. Одно из отличий заключается в том, что ПЦР используется для амплификации не всей хромосомы, а лишь небольшого участка ДНК, специфичного для данного вида.

Исследование с использованием молекулярно-генетических методов должно проводиться в специально предназначенных для этого помещениях. Предотвращение контаминации может быть достигнуто принципиальным разделением помещения на отдельные зоны для (1) выделения ДНК; (2) приготовления ПЦР-смеси; (3) выполнения ПЦР-амплификации и гибридизации; интерпретации результатов.

11.2. Принцип ПЦР

ПЦР-диагностика состоит из 3 основных этапов: подготовки исследуемой пробы материала (выделение ДНК или РНК), собственно полимеразной цепной реакции и детекции продукта ПЦР.

Амплификация ДНК (собственно ПЦР) основана на повторении трех этапов, проходящих при разных температурных режимах. На первом этапе двухцепочечную ДНК денатурируют путем кратковременного нагрева инкубационной системы до 90-95 °С. Таким образом, две цепочки ДНК остаются в растворе в не связанном друг с другом состоянии до тех пор, пока температура не будет понижена. На следующем этапе, получившем название этапа отжига праймеров, который проходит при температуре 40-60 °С, с участками одноцепочечных молекул ДНК, фланкирующими последовательность-мишень, связываются праймеры. Это короткие участки РНК длиной около 20 нуклеотидов. Каждая из затравок связывается только с одной цепочкой ДНК. Следующий шаг ПЦР - умножение последовательности-мишени с помощью полимеразы. Поскольку инкубационная система на этапе денатурации нагревается до 90-95 °С, в ПЦР используется термостабильная Taq-полимераза, выделенная из *Thermus aquaticus*. Этап достройки затравок проходит при температуре 70-75 °С. На этом заканчивается первый цикл амплификации. Далее этапы повторяются 20-40 раз. В результате количество ДНК-мишени возрастает в геометрической прогрессии.

Традиционными способами детекции продуктов ПЦР и идентификации специфического гена являются электрофорез в агарозном или (реже) полиакриламидном геле или использование иммобилизованных фрагментов ДНК. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты. Результат должен быть безусловно отрицательным в контроле без изучаемой ДНК и положительным - в пробе с ДНК, содержащей искомый участок гена. Положительный контроль может представлять собой целевую ДНК или участок гена, клонированный в плазмиде или амплифицированный с помощью ПЦР.

В последнее время широкое распространение получила ПЦР в реальном времени

(Real time PCR), основанная на использовании флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих на концах две метки. Одна из них - флуоресцирующая молекула, другая - молекула-гаситель флуоресценции. Таq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом флуоресцирующая метка выходит в свободное состояние, освобождаясь от влияния гасителя. Поэтому интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции каждой пробы. В результате после 20-40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые уровня флуоресценции. По калибровочным кривым с контрольными образцами возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Преимуществом данного вида исследований является возможность детекции накопления продуктов ПЦР непосредственно во время проведения амплификации. Подобный подход позволяет отказаться от стадии электрофореза, что ведет к резкому уменьшению вероятности контаминации исследуемых проб продуктами амплификации и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов, а также позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории.

11.3. Детекция МБТ

Исследованию методом ПЦР с целью детекции МБТ подлежат мокрота, бронхиальный секрет, плевральная и др. жидкости и другие виды диагностического материала.

Для проведения детекции МБТ в диагностическом материале из него при помощи специальных методов выделяют ДНК, к которой добавляют реакционный буфер, смесь нуклеозидтрифосфатов, праймеры, полимеразу и проводят амплификацию в программируемом термостате (термоциклере), затем учитывают результат. Присутствие в пробе последовательности-мишени свидетельствует о наличии МБТ в исследуемом образце.

Необходимо отметить, что ПЦР не дает ответа на вопрос об активности туберкулезного процесса, поэтому интерпретировать полученный результат необходимо с учетом клинико-рентгенологических данных. Метод ПЦР может использоваться как дополнительный диагностический метод при дифференциальной диагностике в комплексе с другими методами лабораторной диагностики туберкулеза и не применяется в качестве скринингового метода для выявления больных туберкулезом из-за возможности ложноположительных результатов.

11.4. Определение лекарственной чувствительности МБТ

Использование амплификационных методик для выявления различий в генетической структуре чувствительных и устойчивых штаммов - новый подход к определению лекарственной чувствительности микобактерий. Этот вид исследований

стал возможен благодаря определению нуклеотидных последовательностей генов, мутации в которых приводят к возникновению резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам.

Новые молекулярно-генетические методы диагностики ЛУ МБТ демонстрируют высокую чувствительность и специфичность, что позволило Экспертной группе ВОЗ по оценке эффективности молекулярно-генетических методов (2008 г.) рекомендовать широкомасштабное внедрение этих методов для диагностики МЛУ-ТБ.

Наиболее эффективными методами диагностики ЛУ МБТ признаны молекулярно-генетические методы, основанные на гибридизации с ДНК-зондами (LPA), в частности, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl и INNO-LiPA Rif TB Assay.

Технология проведения исследований с использованием этих методов включает следующие этапы:

1. Выделение ДНК из культур *M. tuberculosis* либо непосредственно из клинического материала.

2. ПЦР для амплификации фрагментов генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью.

3. Гибридизация ПЦР-продуктов с ДНК-зондами.

4. Визуализация результатов гибридизации, при которой детектируется наличие в пробе микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, а также наличие либо отсутствие мутаций в исследуемых генах.

В состав зондов включаются специфический зонд для идентификации микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, зонды «дикого типа» (без мутаций, WT), а также зонды для детекции наиболее часто встречающихся мутаций (MUT). Замена хотя бы одного нуклеотида в последовательности ДНК-мишени ведет к нарушению гибридизации с зондом, комплементарным соответствующему участку ДНК-мишени «дикого типа», но при этом происходит гибридизация с зондом, учитывающим эту замену. Таким образом, детекция мутаций производится по отсутствию сигнала одного или нескольких зондов «дикого типа», а также по присутствию сигналов от одного или нескольких «мутантных» зондов. Также возможно выявление гетерорезистентных штаммов микобактерий, у которых регистрируются все сигналы зондов «дикого типа» и сигналы «мутантных» зондов. Причинами гетерорезистентности могут быть инфицирование пациента двумя различными штаммами, суперинфекция или сегрегация одного штамма, представленного чувствительными и резистентными микроорганизмами (вследствие неадекватной химиотерапии).

Молекулярно-генетические методы детекции МЛУ МБТ в основном направлены на обнаружение мутаций, обуславливающих резистентность МБТ к рифампицину (который является маркером множественной лекарственной устойчивости микобактерий, поскольку в соответствии с данными литературы резистентность к рифампицину у 80-90 % штаммов МБТ коррелирует с устойчивостью к изониазиду), а

также к изониазиду. Генодиагностика резистентности к рифампицину основана на детекции мутаций, локализованных в высоко консервативной области размером 81 п.о. гена *groV*, кодирующего *b*-субъединицу РНК-полимеразы, поскольку 95-98 % устойчивых к рифампицину штаммов МБТ имеют мутации в этом гене. Для определения высокого уровня устойчивости к изониазиду исследуют ген *katG*, кодирующий каталазу-пероксидазу, для определения низкого уровня устойчивости к изониазиду изучают область промотора гена *inhA*, кодирующего еноил-ацил-протеинредуктазу. В настоящее время на рынке есть также диагностические наборы, например, GenoType MTBDRsl, позволяющие проводить определение устойчивости к фторхинолонам (*gyrA*), аминогликозидам/циклопептидам (*rrs*) и этамбутолу (*embB*), то есть экспресс-детекцию широкой лекарственной устойчивости.

Молекулярно-генетические тесты на лекарственную чувствительность МБТ (за исключением Xpert MTB/RIF) рекомендуется использовать в лабораториях III (областных) и IV (Республиканская референс-лаборатория, РПЛ) уровня.

11.5. Xpert MTB/RIF

Еще один новый быстрый и эффективный метод диагностики туберкулеза - Xpert MTB/RIF тест (GeneXpert), позволяющий проводить детекцию наличия микобактерий туберкулеза в образце диагностического материала и устойчивости к рифампицину менее чем за два часа. Все стадии теста полностью автоматизированы. Экстракция, амплификация и детекция ДНК осуществляются автоматически в закрытом картридже, что минимизирует возможность кросс-контаминации. Проведение исследования представляет собой двухступенчатый процесс, включающий в себя обработку клинических образцов и ПЦР в режиме реального времени, в результате которой амплифицируется специфическая последовательность гена *groV*, которая затем тестируется молекулярными маяками (*molecular beacons*) на мутации в районе устойчивости к рифампицину. Рекомендуется использование методики Xpert MTB/RIF для быстрого выявления МЛУ ТБ в культуральных ТБ лабораториях и микроскопических центрах в районах с высоким уровнем заболеваемости ТБ.

11.6. Алгоритм диагностики лекарственной устойчивости МБТ с использованием молекулярно-генетических методов

Ускоренное определение лекарственной чувствительности МБТ с использованием молекулярно-генетических методов следует проводить для следующих категорий пациентов с высоким риском МЛУ-ТБ:

1) пациенты с впервые установленным диагнозом туберкулез:

- имеющие контакт с больным МЛУ-ТБ;
- освободившиеся из ИТУ;
- ВИЧ-инфицированные;

2) ранее леченные пациенты.

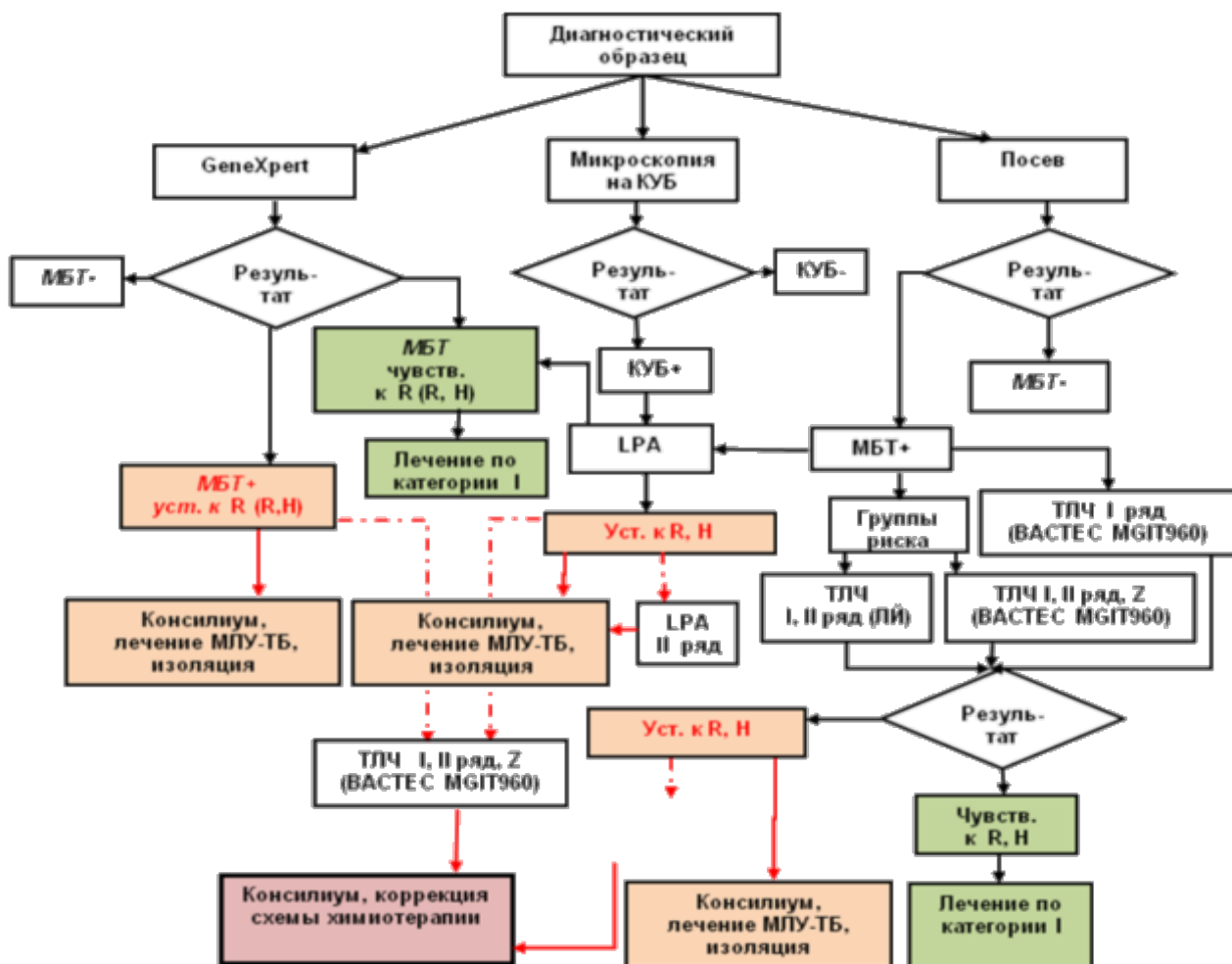
Пациенты с ранее установленным диагнозом МЛУ-ТБ направляются на исследование лекарственной чувствительности МБТ с использованием молекулярно-генетических методов только по направлению консилиума по МЛУ-ТБ.

Алгоритм диагностики лекарственной устойчивости МБТ с использованием молекулярно-генетических методов представлен на рис. 11.1.

Лабораторные тесты, результаты которых используются для рекомендаций по лечению пациентов, должны выполняться в соответствии с инструкцией производителя исключительно с использованием тест-систем, успешно прошедших всестороннюю апробацию и зарегистрированных в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь.

Молекулярно-генетические методы не могут полностью заменить существующие традиционные методы диагностики лекарственной устойчивости МБТ, так как последние необходимы для выявления МБТ у пациентов с отрицательным мазком, а также для выявления резистентности МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам резервного ряда. Тем не менее, использование молекулярно-генетических методов позволяет в короткие сроки (1-2 суток) выявить наличие лекарственной устойчивости МБТ и провести своевременную коррекцию схемы химиотерапии.

Алгоритм диагностики лекарственной устойчивости МБТ



12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА, ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА И ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

12.1. Общие положения

Обеспечение качества – это система, направленная на постоянное повышение надежности и эффективности работы лаборатории.

Чтобы добиться высокого качества диагностики, в лабораторной сети противотуберкулезных организаций должна быть создана постоянно действующая система контроля качества, включающая лаборатории всех уровней.

Республиканская референс-лаборатория должна осуществлять контроль качества лабораторий III уровня, которые, в свою очередь, должны осуществлять контроль качества лабораторий II и I уровня.

Компонентами программы обеспечения качества являются:

- контроль качества;
- улучшение качества;

- профессиональное тестирование.

Контроль качества - это процесс эффективного и систематического мониторинга работы бактериологической лаборатории в сравнении с установленными стандартами.

Внутренний контроль качества должен охватывать все реактивы и питательные среды, все методы, используемые в лаборатории, и проводиться с участием всех сотрудников лаборатории.

Контроль качества гарантирует, что предоставляемая лабораторией информация является точной, надежной и воспроизводимой и служит механизмом, посредством которого лаборатория подтверждает свою компетентность. Контроль качества является обязанностью всех работников лаборатории.

Улучшение качества - это процесс, с помощью которого различные аспекты работы лаборатории подвергаются постоянному анализу для повышения их надежности, эффективности и использования. Известно, что наиболее эффективные и долгосрочные улучшения достигаются за счет прогнозирования и предотвращения проблем, а не путем выявления и исправления проблем после того, как они возникли. Сбор информации, ее анализ и творческое решение проблем являются ключевыми компонентами этого процесса.

Для улучшения качества необходим непрерывный мониторинг работы лаборатории, выявление дефектов, незамедлительные меры, предупреждающие повторение проблемы. Нередко многие проблемы удается решить только при посещении лаборатории опытным куратором. Это самый быстрый и наиболее эффективный метод улучшения качества работы лаборатории.

Во время таких визитов могут быть предприняты следующие действия:

- оценка соблюдения сотрудниками лаборатории требований биологической безопасности и техники безопасности;
- проверка наличия и доступности письменных инструкций с детальным описанием всех методик и манипуляций;
- проверка наличия записей о техническом обслуживании и ремонте оборудования;
- оценка частоты получения проб в неудовлетворительном состоянии (в негерметично закрытых или треснувших контейнерах) или некачественных образцов (слюна);
- проверка качества красителей, реактивов и питательных сред (срок годности, наличие маркировки о порядке использования);

- проверка регулярности использования положительных и отрицательных контролей при проведении микроскопических и бактериологических исследований;
- анализ среднемесячных показателей положительных результатов мазка и культуры для выявления отклонений от нормы;
- отбор положительных и отрицательных мазков для слепого пересмотра;
- оценка среднемесячных показателей контаминации.

При посещении лабораторий куратором рекомендуется заполнять протокол мониторингового визита ([приложение 2](#)). Раздел «Комментарии» может включать статистическую информацию о деятельности лаборатории (количество сотрудников, исследований, выделенных культур и т.д.), оценку различных показателей деятельности лаборатории и их динамики, пояснения по пунктам, оцененным в 0 баллов, и т.д. Копия протокола представляется курируемой лаборатории. При последующем посещении в протоколе мониторингового визита дополнительно указывается информация о выполнении предыдущих рекомендаций.

Очень важно наладить обратную связь с сотрудниками лаборатории. Следует на месте давать рекомендации по исправлению любых обнаруженных недостатков, при необходимости проводить обучение персонала лаборатории.

Профессиональное тестирование (внешний контроль качества) – это система объективного сравнения результатов работы различных лабораторий.

Основная цель профессионального тестирования заключается в подтверждении сопоставимости работы различных лабораторий в соответствии со стандартами. Для этой цели в РРЛ или лаборатории III уровня готовят материал для тестирования и направляют его в лаборатории более низкого уровня. Получатели выполняют необходимые процедуры и сообщают свои результаты в центральную или референс-лабораторию, которая проводит оценку степени профессионализма контролируемых лабораторий.

Выявление недостатков в процессе профессионального тестирования позволяет улучшать качество работы лабораторий.

Каждой лаборатории присваивается уникальный идентификационный код, известный только ей и лаборатории, осуществляющей профессиональное тестирование. Контролирующая лаборатория рассылает во все лаборатории суммарные отчеты, которые позволят каждой из участвующих лабораторий сравнить свои результаты с результатами других лабораторий.

12.2. Внешняя оценка качества микроскопического исследования на КУБ

12.2.1. Оценка путем проверки случайных репрезентативных образцов

Внешняя оценка качества (ВОК) микроскопического исследования мокроты с окраской по Цилю-Нильсену или флуоресцентными красителями проводится путем повторной проверки случайных репрезентативных образцов.

Метод повторной проверки случайных репрезентативных образцов считается самым эффективным, так как позволяет контролировать ежедневную работу, и мотивирующим персонал лабораторий. Метод позволяет определять возможные отклонения от стандартной методики исследования и устранять обнаруженные проблемы.

В ВОК участвуют все лаборатории, выполняющие микроскопию мокроты на КУБ. Для того, чтобы гарантировать репрезентативность ВОК, каждой лабораторией должны сохраняться все исследованные мазки мокроты. Мазки мокроты для ВОК отбираются при периодических посещениях куратором наугад, независимо от результатов. Образцы передаются контролеру I для слепого пересмотра; список результатов остается у куратора.

Куратор сравнивает результаты, полученные лабораторией и контролером I, и делает список мазков мокроты, для которых результаты исследования не совпали. Список и мазки мокроты с несовпадающими результатами микроскопического исследования передаются контролеру II для более тщательного исследования и исправления результатов.

Координатор ВОК использует правильные результаты для идентификации ошибок контролируемой лаборатории или контролера I. После идентификации ошибок контролерами I и II осуществляется обратная связь, необходимая для сообщения правильных результатов и исправления серьезных ошибок. После завершения оценки результатов ВОК в течение года проводится заключительный анализ и идентифицируются лаборатории, продемонстрировавшие неудовлетворительные результаты ВОК. Для выявления и решения основных проблем в таких лабораториях необходимо дальнейшее исследование причин неудовлетворительных результатов. В случае необходимости проводится посещение лаборатории экспертом.

Для оценки значения ложноположительных результатов не используются статистические показатели, поскольку любой ложноположительный результат значим. Единичные ложноположительные результаты могут иметь место в любой лаборатории из-за административных ошибок. Принятие мер требуется только в случае систематических ложноположительных результатов, вызванных серьезными ошибками в процессе исследования. Ошибки определения количества (ООК) имеют меньшее значение, но они могут указать на проблемы в качестве красителей или методики окрашивания.

Единичные низко ложноположительные (НЛП) ошибки можно игнорировать, поскольку они могут иметь место из-за ложноотрицательных результатов контролеров.

Относительно частые высоко ложноположительные (ВЛП) результаты указывают

на наличие серьезных проблем, например, непригодность микроскопа, небрежную регистрацию или недостаточную квалификацию персонала. В этих случаях требуется анализ ситуации и принятие мер.

Низко ложноотрицательные (НЛО) результаты могут иметь место в любой лаборатории. Поэтому при оценке результатов ВОК учитывают общее количество ложноотрицательных результатов (ВЛО + НЛО) и рассматривают пропорцию ВЛО как основание для анализа ситуации и принятия мер. Частые ложноотрицательные результаты обычно имеют место из-за невнимательного микроскопирования, а также использования некачественных растворов красителей, неудовлетворительной методики окрашивания, плохого качества микроскопа. Следует иметь в виду, что в одной и той же лаборатории может иметь место сочетание плохого качества приготовления и окрашивания мазка, неудовлетворительного качества микроскопа и невнимательного микроскопирования.

Персонал

Для осуществления ВОК микроскопии требуется следующий персонал:

- наблюдатели для ежеквартального отбора образцов и обратной связи;
- координатор;
- контролеры I - сотрудники, имеющие опыт в микроскопических исследованиях. Обычно достаточно одного контролера I для 10-20 лабораторий;
- контролеры II - квалифицированные сотрудники, ответственные за принятие окончательного решения в спорных случаях. Обычно достаточно одного контролера II для 50 лабораторий.

Хранение и отбор мазков в лабораториях, проводящих микроскопические исследования

Следует хранить все мазки, вне зависимости от результата исследования, до отбора мазков для ВОК.

После этого можно удалить все оставшиеся мазки и начать собирать новую партию.

После чтения мазков следует удалить иммерсионное масло. Для этого на мазок кладут полоску фильтровальной бумаги, на нее наносят несколько капель ксилола и оставляют в вытяжном шкафу до следующего утра. Никогда не следует протирать мазок.

Мазки располагают в штатив-боксах для предметных стекол согласно их нумерации, оставляя пустые щели для мазков, которые ожидается получить в течение

ближайших дней, или стекло с данным номером отсутствует.

Образцы отбираются для контроля не реже 1 раза в 3 месяца.

В журнале регистрации микроскопических исследований проводится запись периода, охваченного контролем. Регистрируется общее количество мазков мокроты, исследованных в течение этого периода. Это число делится на типовой размер выборки (10 %), в результате получается размер выборки.

Заполняют форму перепроверки, указывая лабораторные номера мазков, число исследованных образцов и т.п.

Для того чтобы выбрать первый мазок для контроля, используют случайный номер, например, последнюю цифру в номере любой банкноты. Мазки следует отбирать по лабораторному журналу, а не из штатив-бокса. Идентификационный номер мазка и результат микроскопии регистрируют в форме учета, которая заполняется в двух экземплярах (допустимо использование копирки): один с результатами исследования (для координатора), второй - без результатов (для контролера 1).

Начинают отсчет мазков для выборки с первого выбранного мазка с учетом шага выборки (вне зависимости от результата микроскопии), например, если выбран случайный номер 7, отбирают мазки № 7, 17, 27 и т.д. Идентификационные номера мазков и результаты микроскопии регистрируются в форме учета.

Продолжают таким образом, пока не будет отобрано необходимое число мазков. Если конец периода контроля достигнут прежде, чем отобрано необходимое число мазков, возвращаются к началу периода осуществления выборки и продолжают отсчет.

Вынимают отобранные мазки из штатив-бокса и проверяют их по списку. Отмечают все недостающие мазки и заменяют их следующими по номеру мазками, внося необходимую информацию в учетную форму.

Если ни один из отобранных мазков не является положительным, отбирают первые два положительных мазка из анализируемого периода.

Оставшиеся мазки утилизируют.

Располагают отобранные мазки в штатив-боксе в порядке лабораторных номеров (не все положительные мазки вместе) и передают их контролеру I вместе с формой учета, не содержащей результатов. Форму с результатами передают координатору.

Процесс перепроверки

Контроль первого уровня

Необходимо гарантировать слепое чтение мазков контролером I, который не должен иметь никакого доступа к результатам, только список идентификационных номеров мазков.

Для каждого мазка делают отметку о размере, толщине, ровности и фоне мазка, цвете КУБ и наличии артефактов.

Не просматривают повторно мазки с неясной маркировкой или поврежденные, о них делают отметку «исключен/номер» или «исключен/поврежден».

Повторно окрашивают все мазки по Цилю-Нильсену, если подозреваются проблемы в окрашивании. Это следует делать в случае частых пропусков мазков с единичными КУБ или КУБ 1+ контролерами I (что установлено контролером II после повторного окрашивания), а также в том случае, если после повторного окрашивания обнаруживаемое число КУБ систематически оказывается выше.

Для повторного окрашивания используют обычную окраску. Перед повторным окрашиванием мазки не обесцвечивают. Делают отметку в учетной форме о том, что было проведено повторное окрашивание.

Проводят микроскопирование по стандартной методике, отмечают результат контроля в учетной форме. Добавляют примечания относительно качества мазка и окрашивания и отправляют координатору.

После пересмотра удаляют иммерсионное масло с помощью абсорбирующей бумаги, как при обычной работе, помещают мазки в штатив-бокс. Проверенные мазки хранят в закрытой коробке, при возможности в прохладном месте (холодильнике), пока не будут вынуты мазки с несовпадающими результатами.

Координатор ВОК вносит результаты контролера I в оригинальную форму с результатами лаборатории микроскопии и результаты лаборатории микроскопии в копию контролера I.

Определяет мазки, для которых лабораторные результаты и результаты контролера не совпали: это расхождение положительный / отрицательный результат или различие в количестве по крайней мере на 2 шага (единичные КУБ / КУБ 2+ или 3+; КУБ 1+ / КУБ 3+).

Мазки с несовпадающими результатами вносит в список с указанием названия лаборатории, номера мазка и двух результатов микроскопии. Указывает результат лаборатории как «Результат 1» и результат контролера как «Результат 2» для одних лабораторий и результат лаборатории как «Результат 2» и результат контролера как «Результат 1» для других лабораторий.

Запрашивает все мазки с несовпадающими результатами у контролера I.

Обратную связь не обеспечивают до тех пор, пока не будут идентифицированы ошибки.

Контроль второго уровня

Повторно окрашивают все мазки с несовпадающими результатами, если они не были повторно окрашены на первом уровне контроля. Делают отметку о повторном

окрашивании.

Повторно проверяют эти мазки, предполагая, что КУБ в них присутствуют. Используют лабораторный результат и результат контролера I (результаты 1 и 2) для определения числа полей зрения, которые нужно просмотреть:

- в случае расхождения отрицательный/положительный мазок достаточно просмотреть две длины мазка, чтобы убедиться, что результат является отрицательным;

- в случае расхождения единичные КУБ/отрицательный мазок следует исследовать пять длин мазка;

- в случае расхождения в количественной оценке КУБ исследуют так много полей зрения, как необходимо.

Отмечают результаты второго контроля в форме, делают необходимые замечания. Делают копию формы для отчета и посылают оригинал координатору вместе со всеми мазками.

Координатор ВОК копирует результаты второго контроля в соответствующей колонке в обеих оригинальных формах. Используя результат контролера II как «золотой стандарт», определяет характер ошибки и того, кто был ответственен за ошибку. Следует иметь в виду, что ошибки могут быть сделаны контролером I так же, как и лабораторией.

Совпадающие результаты признаются правильными.

Таблица 12.1 - Классификация и определение ошибок, найденных при перепроверке

Результат лаборатории	Заключительный результат				
	отрицательный	скудный	1+	2+	3+
Отрицательный	правильно	НЛО	ВЛО	ВЛО	ВЛО
Скудный	НЛО	правильно	правильно	ООК	ООК
1+	ВЛП	правильно	правильно	правильно	ООК
2+	ВЛП	ООК	правильно	правильно	правильно
3+	ВЛП	ООК	ООК	правильно	правильно

ВЛП: высоко ложноположительный, отрицательный против положительного результата.

ВЛО: высоко ложноотрицательный, положительный против отрицательного результата.

НЛП: низко ложноположительный, отрицательный против скудного положительного результата.

НЛО: низко ложноотрицательный, скудный против отрицательного результата.

ООК: ошибка определения количества, различие в определении количества КУБ по крайней мере на два шага.

После того, как будет обеспечена обратная связь между лабораторией микроскопии и контролером I и будут предприняты необходимые меры для устранения выявленных проблем, координатор ВОК делает ежеквартальный отчет для более высокого уровня, копию каждой заполненной формы хранит в папке. Организует немедленное посещение лабораторным экспертом лабораторий микроскопии, демонстрирующих стабильно плохие результаты: большинство КУБ 1+ - 3+ результатов ложноположительные; процент ложноотрицательных результатов приближается к числу положительных; чувствительность микроскопии ниже 60 %.

Заключительная интерпретация результатов ВОК возможна только после анализа всех образцов, включая второй контроль. Однако очень плохие результаты могут быть очевидными сразу, после каждого квартала, и в этом случае требуется немедленное принятие мер.

Следует отказаться от всех результатов перепроверки как ненадежных, если лаборатории обнаруживают больше истинно положительных мазков, чем контролер I. Для этого региона должен быть определен другой контролер I, или рабочая нагрузка контролера I должна быть значительно уменьшена.

Обратная связь и решение проблем

Региональный координатор ВОК

Обеспечивает обратную связь с местным координатором, дает консультации относительно необходимых действий, например, указывает лаборатории, приоритетные для посещения экспертом и проведения исследований для выяснения причин неудовлетворительных результатов ВОК. Обеспечивает обратную связь с контролерами II в случае проблем, например, слишком часто пропускаемых ВЛП результатов.

Координатор ВОК

Отсылает заполненную копию формы в лабораторию.

Для любого мазка, в котором была установлена серьезная ошибка (ВЛО, ВЛП), вносят правильный результат в лабораторный журнал (регистр).

Следует попросить сотрудника лаборатории, обнаружившего КУБ в мазке, признанном ВЛП, показать найденные КУБ. Если будут обнаружены истинные КУБ, делают примечания в обеих копиях формы, если нет, следует инициировать процесс переподготовки специалиста.

После завершения анализа всех образцов квартала следует обсудить результаты с контролером I, особенно если он сделал слишком много ошибок. Следует провести повторное исследование всех мазков, в которых подозревается возможность ошибки контролера I.

Лабораторный эксперт

При посещении лаборатории с целью выявления и решения проблем берет с собой результаты перепроверки в течение целого года и любые мазки с серьезными ошибками, если они еще доступны. Проводит исследование причин неудовлетворительных результатов, исходя из типа выявленных проблем. Начинает рассмотрение ошибок с местным сотрудником лаборатории:

- проверяет, функционирует ли должным образом микроскоп;
- чтобы оценить знания лаборанта в случае ВЛП результатов, просит его показать, что он или она рассматривает как КУБ;
- в случае ВЛО результатов проверяет качество красителей: даты приготовления, цвет (раствор карболового фуксина должен быть красным), наличие преципитатов в растворе аурамина. Любое обнаруженное отклонение может быть причиной проблемы;
- если не выявлено проблем с красителями, проверяет цвет КУБ в недавно окрашенных положительных мазках. Если КУБ неяркие, просит лаборанта продемонстрировать методику окраски;
- просматривает последние мазки, чтобы оценить качество их приготовления, обесцвечивания и окраски;
- проверяет лабораторный журнал, анализируя количество положительных результатов, пропорцию мазков с большим и скудным числом КУБ.

Если в ходе исследования не обнаружена никакая явная проблема, делают заключение, что ошибка была случайной или явилась следствием невнимательного микроскопирования.

Любая обнаруженная проблема должна быть исправлена при первом удобном случае обучением на месте (например, методике приготовления и окрашивания), заменой, ремонтом или настройкой микроскопа, заменой растворов красителей и т.д.

Типичные ошибки, выявляемые при слепом пересмотре мазков, приведены в таблице 12.2.

Таблица 12.2 - Ошибки, выявляемые при слепом пересмотре мазков

Тип ошибки	Возможные причины	Необходимые действия
ВЛП 3+ и ВЛО 3+ (бесмысленные результаты)	<ol style="list-style-type: none"> 1. непригодный микроскоп 2. Нет понимания того, что такое КУБ 3. Результаты были выданы без просмотра мазка 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Просматривают мазок КУБ3+ с использованием данного микроскопа 2. Тестируют знания лаборанта с помощью четких положительных/отрицательных мазков и хорошего микроскопа 3. Исключают другие причины
Единичные ВЛП	<ol style="list-style-type: none"> 1. Административные ошибки 2. Как для более частых ВЛП (см. ниже) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Сравнивают лабораторный журнал с протоколом ВОК: правильно ли указан номер и результат мазка? 2. Исключают причины более частых ВЛП
Регулярные ВЛП с или без НЛП	<ol style="list-style-type: none"> 1. Плохая регистрация 2. Нет систематического перекрашивания перед ВОК 3. Нет понимания того, что такое КУБ 4. Заведомо ложные положительные результаты 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проверяют лабораторный журнал, бланки, маркировку контейнеров с мокротой 2. Перекрашивают и пересматривают ВЛП: результат снова положительный? 3. Оценивают несоответствующие результаты мазков для диагностики в лабораторном журнале: регулярно обнаруживаются скудные положительные результаты? 4. Исключают другие причины
Редкие НЛП	Ошибки ВОК	Игнорируют, если их частота сравнима у разных контролеров
Частые НЛП с или без частых ВЛП	<ol style="list-style-type: none"> 1. Плохой внутренний контроль качества 2. Нет понимания того, что такое КУБ 3. Контаминированный раствор карболового фуксина 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Почти нет НЛО? Возвращают мазки в лабораторию, просят показать в них КУБ 2. Перекрестная проверка особенно большой выборки скудных мазков 3. Тестируют окраску с использованием заведомо отрицательных мазков
Единичные ВЛО (2+ - 3+)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Административные ошибки, как для единичных ВЛП 2. Очень толстый мазок и/или плохое освещение 3. Результаты были выданы без просмотра мазка 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Исключают другие причины, проверяют лабораторный журнал, бланки, маркировку контейнеров с мокротой 2. Оценивают мазки в лаборатории: слишком толстые? слишком темно-синие? 3. КУБ обнаруживаются в толстых участках мазка? Оценивают положение конденсора и диафрагмы? 4. Исключают другие причины
Больше ВЛО и/или много НЛО, количество КУБ занижено	<ol style="list-style-type: none"> 1. Плохая краска и/или окрашивание (мазки перекрашивались) 2. Плохое качество приготовления мазков 3. Проблемы с микроскопом 4. Невнимательное микроскопирование 5. Контаминированный метиленовый синий или вода для промывания (мазки перекрашивались) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проверяют карболовый фуксин: темно-красный, яркий (= хорошая концентрация)? 2. Проверяют, хорошо ли окрашиваются КУБ в свежих заведомо положительных мазках: сплошной, яркий красный цвет? Наблюдают процедуру окрашивания: достаточное время, нагревание? 3. Как для единичных ВЛО (см. выше) 4. Используют тот же микроскоп для просмотра заведомо положительных мазков: светлые, яркие? четкое изображение? (см. выше) 5. Исключают другие причины 6. Типичные КУБ? Используют метиленовый синий (дистиллированную воду для промывания) для окраски заведомо отрицательных мазков в течение нескольких циклов окрашивания, затем проверяют на нетипичные КУБ
Очень высокая пропорция НЛО	Контаминированный метиленовый синий или вода для промывания (мазки перекрашивались)	Как выше

Серьезные ошибки оценки количества (количество КУБ занижено)	1. Плохие красители/окрашивание (мазки перекрашивались) 2. Проблемы с микроскопом	Как выше
--	--	----------

В [приложении 1](#) приведены формы протоколов для регистрации результатов внешней оценки качества микроскопического исследования по Цилю-Нильсену.

12.2.2. Профессиональное тестирование

Лаборатория, проводящая профессиональное тестирование, не реже 1 раза в полгода рассылает в периферийные лаборатории набор стандартных мазков с известными результатами. Набор должен включать 5 окрашенных и 5 неокрашенных препаратов, количество КУБ в которых охватывает весь диапазон от отрицательного до резко положительного результатов, например,

КУБ не обнаружены: два препарата;

<10 КУБ: один препарат;

КУБ 1+: один препарат;

КУБ 2+ или 3+: один препарат.

Совпадение результатов лаборатории с контрольным результатом должно составлять не менее 90 %.

12.3. Внешняя оценка качества культуральных исследований, идентификации микобактерий и детекции МБТ с использованием амплификационных методов

Внешняя оценка качества проводится ежегодно путем анализа контрольных панелей образцов. Ниже перечислены варианты контрольных панелей:

1. 5 образцов мокроты для детекции микобактерий методом посева и дифференциации между МБТ и НТМ;

2. 5 суспензий штаммов микобактерий для идентификации микобактерий;

3. 5 образцов мокроты для детекции МБТ с использованием амплификационных методов, например, ПЦР.

В настоящее время контрольные панели образцов для внешней оценки качества культуральных исследований и идентификации микобактерий доступны на платной основе.

12.4. Внешняя оценка качества тестирования лекарственной чувствительности МБТ

Для стандартизации методов контроля качества и профессионального тестирования была создана международная сеть Супранациональных референс-лабораторий (СРЛ), которые гарантируют сопоставимость результатов, полученных в лабораториях разных стран. Для проведения внешней оценки качества ТЛЧ микобактерий туберкулеза СРЛ ежегодно высылают в РРЛ панель, содержащую 20 штаммов *M. tuberculosis* (коллекция международного контроля качества) с типичными свойствами данного вида и с различной чувствительностью к ПТЛС. Высылаемая панель штаммов используется далее для проведения республиканского контроля качества лабораторной диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза.

Лаборатории проводят оценку устойчивости к четырем ПТЛС первого ряда: изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу. Эти ПТЛС широко используются во всем мире, устойчивость к ним может быть определена стандартизированными методами и изучается в течение многих лет. Кроме того, в последние годы в исследовании оценивается устойчивость к ПТЛС второго ряда, включенных в систему международного контроля качества: амикацину, капреомицину, офлоксацину, канамицину, что позволяет оценивать уровень ШЛУ МБТ.

Контрольные штаммы должны быть протестированы как любые клинические изоляты с использованием стандартной процедуры исследования.

Полученные результаты вносятся в отчетную форму, которая прилагается к образцам. Каждая лаборатория получает индивидуальные кодированные номера штаммов, которые можно увидеть в отчетной форме.

Основной индикатор ВОК тестирования лекарственной чувствительности МБТ - совпадение результатов определения чувствительности к изониазиду и рифампицину (маркерам множественной лекарственной устойчивости) - должен составлять не менее 95 %. Совпадение результатов определения чувствительности к остальным ПТЛС, включенным в контроль качества, должно составлять не менее 90 %.

При обращении с панелью необходимо соблюдать осторожность, поскольку в нее включены штаммы *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (М/ШЛУ).

13. ИНДИКАТОРЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЛАБОРАТОРИЙ, ПРОВОДЯЩИХ ДИАГНОСТИКУ ТУБЕРКУЛЕЗА

13.1. Общие положения

Индикаторы деятельности лаборатории используются для оценки и улучшения деятельности лабораторной службы. Целями использования индикаторов являются:

- оценка функционирования лаборатории;
- сравнение функционирования разных лабораторий одного уровня;
- выявление проблем в лабораториях;
- определение приоритетов, на которые должны быть направлены лабораторные ресурсы;
- мотивация персонала;
- уверенность персонала в правильности выполняемых видов исследований.

Проводится анализ результатов, полученных в течение определенного промежутка времени (месяца, квартала, года) с целью обнаружения систематических ошибок.

Если лаборатория выполняет исследования для разных районов, следует систематически (ежеквартально, ежегодно) оценивать результативность исследования для каждого района, чтобы выявить возможные проблемы в назначении исследования, организации сбора и доставки диагностического материала.

Компьютерные базы данных позволяют проводить такой анализ более эффективно по сравнению с бумажной документацией, поэтому данные лабораторных исследований должны вноситься в электронную базу данных.

13.2. Микроскопическое исследование на КУБ

Таблица 13.1 - Индикаторы эффективности микроскопического исследования на КУБ

Общее количество образцов для исследования на КУБ			
Количество образцов для диагностики		Процент образцов для диагностики от общего количества образцов	
Количество образцов для мониторинга лечения		Процент образцов для мониторинга лечения от общего количества образцов	
Количество образцов КУБ+		Процент образцов КУБ+ от общего количества образцов	
Количество образцов КУБ+ для диагностики		Процент образцов КУБ+ для диагностики от общего количества образцов для диагностики	
Количество образцов КУБ+ для мониторинга лечения		Процент образцов КУБ+ для мониторинга лечения от общего количества образцов для мониторинга лечения	
Количество образцов некачественного материала		Процент образцов некачественного диагностического материала от общего количества образцов	

13.3. Культуральное исследование на туберкулез

Таблица 13.2 - Индикаторы эффективности культурального исследования

Общее количество образцов			
Количество образцов для диагностики		Процент образцов для диагностики от общего количества образцов	
Количество образцов для мониторинга лечения		Процент образцов для мониторинга лечения от общего количества образцов	
Количество образцов П+		Процент образцов П+ от общего количества образцов	
Количество образцов П+ для диагностики		Процент образцов П+ для диагностики от общего количества образцов для диагностики	
Количество образцов П+ для мониторинга лечения		Процент образцов П+ для мониторинга лечения от общего количества образцов для мониторинга лечения	
Количество образцов М+П+		Процент образцов М+П+ от общего количества образцов	
Количество образцов М-П+		Процент образцов М-П+ от общего количества образцов	
Количество образцов М+П-		Процент образцов М+П- от общего количества образцов	
Количество образцов М-П-		Процент образцов М-П- от общего количества образцов	
Количество образцов «Микроскопия не проводилась П+»		Процент образцов «Микроскопия не проводилась П+» от общего количества образцов	
Количество образцов «Микроскопия не проводилась П-»		Процент образцов «Микроскопия не проводилась П-» от общего количества образцов	
Количество образцов М-К		Процент образцов М-К от общего количества образцов	
Количество образцов М+К		Процент образцов М+К от общего количества образцов	
Количество образцов «Микроскопия не проводилась К»		Процент образцов «Микроскопия не проводилась К» от общего количества образцов	
Чувствительность микроскопического исследования (процент образцов М+П+ от общего количества образцов П+) рассчитывается по формуле $M+P+ / ((M+P+) + (M-P+)) \times 100 \%$			
Специфичность микроскопического исследования (процент образцов М-П- от общего количества образцов П-) рассчитывается по формуле $M-P- / ((M+P-) + (M-P-)) \times 100 \%$			
Среднее время до детекции роста микобактерий для образцов М+ П+, дней			
Среднее время до детекции роста микобактерий для образцов М-П+, дней			
Количество контаминированных пробирок		Процент контаминированных пробирок от общего количества засеянных пробирок	
		Среднегодовой процент контаминированных пробирок от общего количества засеянных пробирок	
Количество культур <i>M. tuberculosis complex</i>		Процент культур <i>M. tuberculosis complex</i> от общего количества образцов П+	
Количество культур нетуберкулезных микобактерий		Процент культур нетуберкулезных микобактерий от общего количества образцов П+	

М - микроскопия

П - посев

К - контаминация

Данные индикаторы рассчитываются для культурального исследования на плотных и на жидких питательных средах отдельно.

13.4. Основные индикаторы, используемые для выявления существенных проблем в лаборатории

Таблица 13.3 - Основные индикаторы

Индикатор	Значение индикатора		
	нормальное (%)	более высокое	более низкое
Общая высеваемость микобактерий	не ниже 10	А	Б и В
Процент образцов М+К-	2-3	В и Г	не является проблемой
Контаминация пробирок	2-5 (плотная среда) 6-8 (жидкая среда)	Д	Е

Таблица 13.4 - Основные причины отклонения основных индикаторов от оптимальных значений

А	значительный удельный вес образцов от пациентов с бактериовыделением (не является проблемой)
Б	неадекватное назначение культурального исследования для пациентов без ТБ
В	<ul style="list-style-type: none"> - чрезмерная задержка между сбором и обработкой диагностического материала - слишком жесткая обработка образца (слишком высокая концентрация и/или длительная экспозиция с деконтаминантом) - низкая относительная сила центрифугирования или перегревание центрифуги - низкая чувствительность среды (недостаточная однородность, перегрев в процессе свертывания, слишком высокая концентрация малахитовой зелени, слишком кислый рН) - инкубация при слишком высокой или переменной температуре
Г	ложноположительная микроскопия
Д	<ul style="list-style-type: none"> - хранение образцов без холодильника - чрезмерная задержка между сбором и обработкой диагностического материала - слишком слабая обработка образца (слишком низкая концентрация и/или короткая экспозиция с деконтаминантом) - недостатки в процедуре стерилизации - неаккуратное использование спиртовки, активное движение людей в рабочей зоне, создание воздушных потоков вентиляторами или кондиционерами и т.д.
Е	<ul style="list-style-type: none"> - слишком жесткая обработка образца (слишком высокая концентрация и/или длительная экспозиция с деконтаминантом) - недостаточная нейтрализация образца - слишком высокая концентрация малахитовой зелени в среде - инкубация при слишком высокой или переменной температуре

Формы протоколов для внешней оценки качества микроскопического исследования на КУБ

Форма 1

Слепой пересмотр мазков мокроты на КУБ

Лаборатория _____ Лаборант(ы) _____
 Период контроля _____ Дата отбора _____
 Контролер I _____ Лаборатория _____
 Контролер II _____ Лаборатория _____

Лаборатория		Результат контроля		Обра-зец	Раз-мер	Тол-щина	Ок-раска	Ком-мен-тарии	Лаборатория		Результат контроля		Обра-зец	Раз-мер	Тол-щина	Ок-раска	Ком-мен-тарии
№ мазка	результат	пер-вого	вто-рого						№ мазка	результат	пер-вого	вто-рого					

Образец, размер, толщина, окраска: Х - хорошо, П - плохо

% мазков из некачественных образцов мокроты		% мазков неправильного размера	
% мазков неправильной толщины		% мазков, некачественно окрашенных	
Всего результатов			
положительных	скудных	отрицательных	
Истинно положительные результаты			
число ИП, обнаруженных лабораторией		% ИП среди всех положительных результатов лаборатории	
Идентифицированные ошибки			
Значительные		Незначительные	
ВЛП	ВЛО	НЛП	НЛО
ВОО		ООК	
Всего значительных ошибок		Всего незначительных ошибок	

Всего	ЛП	ЛО	ВЛП	НЛП	ВЛО	НЛО	ООК	ИП	% ИП					

Форма 4

Результаты ВОК микроскопии на КУБ

Регион _____ Год _____

Показатель	Число	Процент
Число лабораторий, проводящих микроскопию на КУБ		
Число лабораторий, принявших участие в ВОК микроскопии на КУБ		
Средняя результативность микроскопии на КУБ в регионе (% КУБ+ результатов)		
Число пересмотренных положительных мазков		
Число пересмотренных отрицательных мазков		
Средний % мазков из некачественных образцов мокроты		
Средний % мазков, некачественно окрашенных		
Средний уровень ложноположительных мазков в регионе		
Средний уровень ложноотрицательных мазков в регионе		
Лаборатории с более чем 1 ВЛП		
Лаборатории с более чем 1 ВЛО		
Лаборатории с 95-100 % истинно положительных мазков		
Лаборатории с 85-94 % истинно положительных мазков		
Лаборатории с <85 % истинно положительных мазков		

Приложение 2

Протокол мониторингового визита в бактериологическую лабораторию

Раздел 1. Бактериологическое исследование на туберкулез,
исследование с использованием Xpert MTB/RIF

Дата визита _____

Область _____

Организация здравоохранения _____

Руководитель организации _____

Куратор _____

Руководитель лаборатории _____

Оцениваемый период _____

Выполнение рекомендаций, данных в ходе предыдущего мониторингового визита (подчеркнуть): да нет частично

1.1. ПЛАНИРОВАНИЕ					
№	индикатор	да	нет	расчет	баллы
1	Лаборатория расположена в отдельном здании или изолированной части здания			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
2	Наличие отдельных входов для персонала и для доставки материала			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
3	Наличие достаточного количества помещений			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
4	Лаборатория планировочно разделена на «чистую» и «контаминированную» зоны			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
5	Организация помещений лаборатории обеспечивает технологическую поточность в движении материала			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
6	Наличие функционирующей приточно-вытяжной вентиляции			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
7	Стены, полы, потолки лаборатории гладкие и легко моющиеся			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
8	Рабочие поверхности лабораторной мебели непроницаемые для воды и устойчивые к химическим веществам и дезинфицирующим средствам			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
9	Помещения лаборатории аккуратные, чистые и свободные от неиспользуемых материалов и оборудования			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
10	Наличие достаточного количества БББ 2 класса, находящихся в рабочем состоянии			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
11	Наличие центрифуг(и) с антиаэрозольной защитой, находящихся в рабочем состоянии			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
12	Наличие договоров на сервисное обслуживание оборудования			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
13	Своевременная поверка оборудования			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
14	Наличие запаса реактивов, предметных стекол на 6 месяцев			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
15	Наличие достаточного количества одноразовых расходных материалов (пробирки для сбора мокроты, пипетки)			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
16	Растворы и реагенты хранятся в надлежащих условиях			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
17	Реагенты и растворы красителей надлежащим образом промаркированы			да - 5 баллов нет - 0 баллов	

18	Наличие квалифицированного (прошедшего обучение) персонала (врачи, лаборанты)			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
19	Наличие доступных пошаговых инструкций для персонала на используемые в лаборатории методы			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
20	Наличие плана обучения, включающего вопросы биобезопасности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
21	Наличие предупреждающих знаков о биологической опасности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
22	Наличие достаточного количества средств индивидуальной защиты (респираторы, перчатки)			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
23	Наличие достаточного запаса дезинфицирующих средств с туберкулоцидным действием			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
24	Наличие инструкции по применению используемого дезинфицирующего средства			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
25	Наличие инструкции по действиям в случае аварии			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
26	Наличие набора для аварийных ситуаций			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
27	Наличие достаточного количества автоклавируемых пакетов для утилизации материала			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
28	Наличие контейнеров для слива жидких отходов с крышкой			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
29	Наличие компьютера			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
30	Наличие постоянного доступа в интернет			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
31	Наличие достаточного количества картриджей Xpert MTB/RIF			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
	ИТОГО				
1.2. РЕАЛИЗАЦИЯ					
№	индикатор	да	нет	расчет	баллы
1	Оборудование размещено правильно			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
2	Прохождение врачами переподготовки, стажировки на рабочем месте в течение оцениваемого периода			% врачей, прошедших обучение, от общего числа врачей / 20	
3	Прохождение лаборантами переподготовки, стажировки на рабочем месте в течение оцениваемого периода			% лаборантов, прошедших обучение, от общего числа лаборантов / 20	
4	Образцы мокроты поступают в лабораторию в одноразовых контейнерах с завинчивающимися крышками			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
5	Образцы мокроты доставляются в день сбора или хранятся в холодильнике не более 72 часов			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
6	Бланки направления на исследование доставляются отдельно от образцов мокроты			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
7	Маркировка контейнеров с мокротой четкая			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
8	Образцы мокроты транспортируются в специальном контейнере			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
9	Информация о качестве образца отмечается в лабораторном журнале и на бланке			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
10	В лаборатории не используются реагенты с истекшим сроком годности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
11	В лаборатории не используются питательные среды с истекшим сроком годности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	

12	В лаборатории проводится внутренний контроль качества питательных сред			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
13	При проведении исследований используются одноразовые расходные материалы			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
14	Деконтаминация проводится с использованием стандартного метода			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
15	Центрифугирование проводится при 3000 g			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
16	Центрифужные стаканы загружаются и разгружаются в БББ			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
17	В лаборатории проводится внутренний контроль качества деконтаминации			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
18	В лаборатории проводится микроскопическое исследование осадка на КУБ			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
19	Мазки высушиваются при комнатной температуре в БББ			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
20	Мазки окрашиваются по стандартной методике			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
21	За один раз окрашивается не более 12 мазков, мазки при окрашивании не касаются друг друга			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
22	Отрицательный результат микроскопического исследования выдается после просмотра 100 полей зрения			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
23	Положительный результат микроскопического исследования выдается с количественной оценкой			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
24	В лаборатории проводится внутренний контроль качества микроскопии			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
25	В лаборатории проводилось панельное тестирование микроскопического исследования на КУБ			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
26	Надосадочная жидкость сливается в контейнер для жидких отходов с дезинфицирующим раствором			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
27	Надосадочная жидкость утилизируется автоклавированием			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
28	Просмотр посевов проводится еженедельно			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
29	Проводится микроскопия мазков из всех выделенных культур			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
30	После микроскопии мазков из выделенных культур выдается предварительный результат бактериологического исследования			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
31	Предварительный результат бактериологического исследования выдается с количественной оценкой роста микобактерий			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
32	Для всех культур микобактерий проводятся тесты для идентификации <i>M. tuberculosis</i>			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
33	Результаты исследования сообщаются своевременно			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
34	Культуры МБТ хранятся не менее 1 месяца после выдачи окончательного результата исследования			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
35	Персонал знает об опасности аэрогенной инфекции			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
36	Персонал обучен правилам использования СИЗ			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
37	В лаборатории проводится регулярный инструктаж по технике безопасности, что зарегистрировано в журнале			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
38	В лаборатории ведется электронный регистр			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
39	Картриджи Xpert MTB/RIF использованы до истечения срока годности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
	ИТОГО				

Рекомендации: _____

(подпись куратора)

(подпись руководителя лаборатории)

Протокол мониторингового визита в бактериологическую лабораторию

Раздел 2. Тестирование лекарственной чувствительности МБТ,
быстрые методы диагностики туберкулеза

Дата визита _____

Область _____

Организация здравоохранения _____

Руководитель организации _____

Куратор _____

Руководитель лаборатории _____

Оцениваемый период _____

Выполнение рекомендаций, данных в ходе предыдущего мониторингового визита (подчеркнуть): да нет частично

2.1. ПЛАНИРОВАНИЕ					
№	индикатор	да	нет	расчет	баллы
1	Наличие химически чистых веществ противотуберкулезных лекарственных средств			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
2	Наличие доступных пошаговых инструкций по выполнению исследования на лекарственную чувствительность МБТ с использованием среды Левенштейна-Йенсена			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
3	Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT960 в рабочем состоянии			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
4	Наличие достаточного запаса расходных материалов для автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT960 на 6 месяцев			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
5	Наличие доступных пошаговых инструкций по выполнению исследования с использованием ВАСТЕС MGIT960			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
6	Наличие доступных пошаговых инструкций по выполнению исследования на лекарственную чувствительность МБТ с использованием ВАСТЕС MGIT960, в т.ч. к ПТЛС 2 ряда			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
7	Наличие достаточного запаса расходных материалов для LPA			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
8	Наличие доступных пошаговых инструкций по выполнению исследования LPA			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
9	В лаборатории используются культуральные и биохимические методы идентификации микобактерий			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
10	В лаборатории используются молекулярно-генетические методы идентификации микобактерий			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
11	В лаборатории используются иммунохроматографические методы идентификации микобактерий			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
	ИТОГО				
2.2. РЕАЛИЗАЦИЯ					
№	индикатор	да	нет	расчет	баллы
1	В лаборатории используются стандартные концентрации ПТЛС			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
2	При приготовлении растворов ПТЛС учитывается содержание действующего вещества в химически чистом веществе ПТЛС			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
3	В лаборатории не используются химически чистые вещества ПТЛС с истекшим сроком годности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	

4	В лаборатории не используются питательные среды для ТЛЧ с истекшим сроком годности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
5	ТЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена проводится с использованием стандартной методики, суспензия микобактерий стандартизируется по мутности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
6	Результаты ТЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена учитываются через 28 дней			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
7	В лаборатории проводится внутренний контроль качества ТЛЧ на среде Левенштейна-Йенсена			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
8	Культуры МБТ, для которых выполнялось ТЛЧ, замораживаются для хранения			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
9	Бесперебойная работа автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT960			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
10	В лаборатории проводится внутренний контроль качества исследования с использованием ВАСТЕС MGIT960			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
11	ТЛЧ на ВАСТЕС MGIT960 проводится с использованием стандартной методики, суспензия микобактерий стандартизируется по мутности			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
12	В лаборатории проводится внутренний контроль качества ТЛЧ с использованием ВАСТЕС MGIT960			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
13	Еженедельно выполняется не менее 10 исследований LPA			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
14	Результаты LPA сообщаются не реже 1 раза в 7 дней			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
15	В лаборатории проводится внутренний контроль качества LPA			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
16	Все культуры микобактерий идентифицируются			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
	ИТОГО				

2.3. ПОКАЗАТЕЛИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

№	индикатор	да	нет	расчет	баллы
1	Уровень высеваемости для автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT960 составляет 10 % и выше			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
2	Уровень контаминации для автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT960 в пределах 6-8 %			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
3	Совпадение результатов ТЛЧ с использованием среды Левенштейна-Йенсена и ВАСТЕС MGIT960 составляет 90 % и выше			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
4	Совпадение результатов ТЛЧ с использованием LPA и среды Левенштейна-Йенсена составляет 90 % и выше			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
5	Совпадение результатов ТЛЧ с использованием LPA и ВАСТЕС MGIT960 составляет 90 % и выше			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
6	Неудачные LPA составляют не более 10 % от общего числа исследований			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
7	Уровень позитивности отрицательного контроля LPA (контаминация) не более 1 %			да - 5 баллов нет - 0 баллов	
	ИТОГО				
	ВСЕГО				

Комментарии: _____
