



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НАКАЗ

27.06.2019 № 1462

Зареєстровано в Міністерстві
юстиції України
08 серпня 2019 р.
за № 886/33857

**Про затвердження Інструкції з мікробіологічної
діагностики туберкульозу**

Відповідно до [підпункту 2](#) пункту 1 статті 6 Закону України «Про протидію захворюванню на туберкульоз», [пункту 4](#) Положення про Міністерство охорони здоров'я України, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 25 березня 2015 року № 267, та з метою ефективної діагностики випадків туберкульозу **НАКАЗУЮ:**

1. Затвердити [Інструкцію з мікробіологічної діагностики туберкульозу](#), що додається.
2. Визнати таким, що втратив чинність [наказ Міністерства охорони здоров'я України від 06 лютого 2002 року № 45](#) «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу»
3. Директорату громадського здоров'я (Скіпальський А.) забезпечити подання цього наказу в установленому законодавством порядку на державну реєстрацію до Міністерства юстиції України.
4. Контроль за виконанням цього наказу покласти на заступника Міністра з питань європейської інтеграції Стефанишину О.А.
5. Цей наказ набирає чинності з дня його офіційного опублікування.

В.о. Міністра	У. Супрун
ПОГОДЖЕНО:	
Президент Національної академії медичних наук України	В. Цимбалюк
Голова Державної регуляторної служби України	К. Ляпіна
Уповноважений Верховної Ради України з прав людини	Л. Денісова

	ЗАТВЕРДЖЕНО Наказ Міністерства охорони здоров'я України 27 червня 2019 року № 1462
	Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 08 серпня 2019 р. за № 886/33857

ІНСТРУКЦІЯ **з мікробіологічної діагностики туберкульозу**

I. Загальні положення

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

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

3. У цій Інструкції терміни вживаються у таких значеннях:

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

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

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

кислотостійкі організми, у тому числі *M. tuberculosis*, - організми, що зберігають забарвлення карболовим фуксином після знебарвлення розчином сірчаної кислоти або солянокислого спирту; метод NALC-NaOH є методом деконтамінації, оскільки застосовується у разі посівів на щільних та рідких поживних середовищах, у тому числі в автоматизовані системи детекції мікобактерій. Під час правильного використання цей метод дозволяє отримати більше позитивних результатів культурального дослідження, ніж будь-який інший метод;

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

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

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

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

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

II. Діагностичний матеріал для дослідження на туберкульоз

1. Для отримання достовірних результатів дослідження діагностичного матеріалу потрібно дотримуватися таких умов:

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

матеріал для дослідження має збиратися рано-вранці;

під час дослідження мокротиння потрібно зібрати дві проби ранкового мокротиння впродовж двох послідовних днів;

зібраний матеріал потрібно якнайшвидше доставити до лабораторій; у разі неможливості негайної доставки матеріал зберігається в холодильнику за температури +2-8 °C не більше ніж 72 год;

під час перевезення матеріалу потрібно особливо ретельно стежити за збереженням флаконів і правильністю їх маркування.

За відсутності можливості доставки зразків мокротиння для дослідження бактеріоскопії потрібно приготувати і доставити до лабораторії зафіксовані мазки.

Контейнер з порцією мокротиння достатнього об'єму (не менше ніж 3,0-5,0 мл), що містить ущільнені або гнійні грудочки без слини, ретельно закривають кришкою, що загвинчується, потім контейнер маркують і поміщають у спеціальний бікс для транспортування до лабораторії.

2. Для збору діагностичного матеріалу повинні використовуватись спеціальні контейнери, які:

прозорі, виготовлені з ударостійкого і прозорого матеріалу, що не допускає протікання рідини та дозволяє оцінити кількість і якість зібраної проби, не відкриваючи кришки;

легко піддаються маркуванню і надійно зберігають його протягом періоду зберігання, транспортування та проведення дослідження;

мають кришки, що загвинчуються з ущільненням (не використовувати флаконів, що мають кришки, які щільно закупорюють його: під час відкриття таких кришок у контейнері виникає розріджений простір, який призводить до утворення аерозолу, створюючи потенційну небезпеку внутрішньолабораторного зараження);

мають об'єм 30,0-50,0 мл;

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

Використання таких контейнерів дає можливість оцінити якість і об'єм зібраного матеріалу, а в разі приготування мазків з нативного мокротиння - проводити відбір гнійних грудочок приготування мазка безпосередньо з контейнера, запобігаючи етапу виливання

мокротиння в чашку Петрі, надзвичайно небезпечного через утворення аерозолю. У цьому разі ефективність прямої мікроскопії може не поступатися ефективності мікроскопії з осаду.

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

мокротиння;

виділення верхніх дихальних шляхів, після подразнюючої інгаляції;

промивні води бронхів;

бронхоальвеолярні змиви;

бронхоальвеолярний лаваж;

матеріал, отриманий під час бронхоскопії;

транстрахеальний та внутрішньолегевий біоптати;

промивні води шлунка;

сечу;

пунктати із закритих порожнин (спинномозкову рідину, ексудати і трансудати з плевральної та черевної порожнин, гній, гнійно-некротичні маси, виділення ран, виділення відкритих порожнин тощо).

Якщо хворий не може відкашляти мокротиння, потрібно застосовувати інші методи (відхаркувальні препарати, подразнювальні аерозольні інгаляції, промивання трахеїв, бронхів тощо).

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

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

Під час дослідження промивних вод шлунка, щоб уникнути змішування мокротиння, що було проковтнуто з їжею, потрібно брати натщесерце. Останній прийом їжі має бути не менше ніж за 12 годин до взяття промивних вод шлунка.

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

Сеча (середня частина ранкової порції або вся ранкова порція) збирається в стерильний посуд після ретельного туалету зовнішніх статевих органів. Аналіз сечі на мікобактерії здійснюється тричі. У лабораторії сечу центрифугують за 3 000 g, використовуючи метод накопичення осаду.

Бактеріологічного дослідження добової сечі не проводять.

Асептично зібрані рідини (ліквор, перикардiальна, синовiальна, асцитична рiдина, кров, кiстковий мозок) мають збиратися лiкарем в асептичних умовах у стерильний контейнер з використанням вiдповiдних методик. До рiдин, що мають схильнiсть до згортання, додають стерильнi гепарин (0,2 мг на 1,0 мл) або оксалат калiю (0,01-0,02 мл 10,0 % нейтрального оксалату на 1,0 мл матерiалу). Матерiал має бути доставлено до лабораторiї негайно.

Асептично зібрані тканини поміщаються в стерильні контейнери без додавання будь-яких консервантів. У разі тривалого транспортування тканини потрібно помістити в стерильний ізотонічний розчин, обкласти сухим льодом або охолодити за температури +4-8 °С. Матеріал має бути доставлено до лабораторії негайно.

Матеріал відразу після збору слід відправляти до лабораторії (протягом декількох годин). У разі віддаленості лабораторії від місця взяття матеріалу його відправка в лабораторію може здійснюватися два рази на тиждень. У цьому разі контейнери із зібраним матеріалом мають зберігатися в холодильнику за температури +4-8 °С не довше ніж 72 год. За потреби зберігання понад 72 год до діагностичного матеріалу додають консервант. У цьому разі термін зберігання збільшується до 5 діб.

Для інших матеріалів, якщо їх транспортування передбачається за високої температури навколишнього середовища або їх доставка до лабораторії більше, ніж через 24-72 год після збору (взяття), рекомендується використовувати такі хімічні консерванти:

10,0 % розчину тризаміщеного фосфату натрію;

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

подвійний об'єм 2,0-3,0 % розчину борної кислоти.

Зазначені розчини рекомендується застосовувати для збереження зразків мокротиння. У разі їх застосування матеріал може зберігатися за кімнатної температури. Однак консерванти токсичні для мікобактерій і їх застосування може знижувати висіюваність мікобактерій. Для зниження токсичності консервантів проби рекомендується зберігати в холодильнику за температури від +4 до +8 °С.

Діагностичний матеріал може бути заморожений, а в разі, якщо він не буде піддаватись розморожуванню і повторному заморожуванню, життєздатність мікобактерій збережеться.

4. Для безпечного транспортування дослідний матеріал має бути упаковано у водонепроникну ємність, що не б'ється, а також захищену від струсів, ударів та інших можливих пошкоджень.

Для транспортування матеріалу потрібно мати в лабораторії кілька спеціальних металевих або пластикових транспортувальних ящиків, які влаштовано так, щоб у вертикальному положенні фіксувати 20-30 контейнерів з діагностичним матеріалом. Кришка ящиків має надійно закриватися, щоб виключити можливість самовільного відкривання кришки і висипання контейнерів зі зразками. Для транспортування можна використовувати металеві бікси. Під час транспортування матеріал не повинен знаходитись на сонці.

На зразки, залежно від мети дослідження, та контейнери заповнюються направлення відповідно до чинного законодавства.

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

Перед відправкою зібраного матеріалу медичний працівник повинен перевірити:

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

відповідність номера кожного контейнера номерам, зазначеним у направленні.

Після перевірки даних супроводжувальної документації медпрацівник зазначають дату відправлення матеріалу на дослідження, ставить свій підпис та вкладає у файл (конверт, поліетиленовий пакет) супроводжувальний лист і заповнені бланки направлень на

мікроскопічне дослідження на кожен пробу матеріалу та прикріплює конверт до транспортного контейнера (бікса, ящика) зовні.

5. Прийом матеріалу має забезпечуватися в спеціально відведеному місці. Бікси / транспортувальні ящики з контейнерами повинні відкривати у витяжній шафі або на спеціально виділеному столі з дотриманням таких вимог:

одягнути одноразові рукавички, контейнер відкривати у шафі біологічної безпеки;

провести зовнішню обробку бікса відповідним дезінфектантом;

обережно відкрити бікс і перевірити цілісність контейнерів. Биті контейнери знезаражують шляхом занурення в дезінфектант, кип'ятіння або автоклавування. Матеріал з таких зразків не досліджується. У цьому разі потрібно запросити новий зразок на аналіз;

витягнути контейнери з матеріалом із бікса. Провести обробку дезінфектантом зовнішніх поверхонь усіх контейнерів, що знаходяться у біксі;

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

перевірити відповідність номерів у супроводжувальній документації номерам, що позначені на контейнерах із матеріалом;

присвоїти матеріалу лабораторний порядковий номер. Позначити відповідним номером контейнер (на бічній стінці) і внести номер до бланка направлення;

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

У лабораторії має бути розроблено документально оформлені правила вибракування матеріалу, що передбачають:

відмову від під часйому первинних проб без потрібної ідентифікаційної документації та маркування;

належну поведінку стосовно проб незадовільної якості;

заходи в разі виявлення пошкоджених або негерметично закритих контейнерів.

Задовільна якість матеріалу передбачає наявність у матеріалі слизового або слизово-гнійного мокротиння. Об'єм зібраного матеріалу має коливатися в межах 3,0-5,0 мл, хоча в разі задовільної якості прийнятна і менша кількість. Потрібно відзначити якість отриманого матеріалу в журналі реєстрації досліджень і в бланку видачі результатів дослідження. У разі вибракування матеріалу потрібно запросити нову порцію на дослідження.

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

Усі отримані первинні проби має бути зареєстровано у формах первинної облікової документації відповідно до направлення.

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

III. Мікроскопічне дослідження для виявлення кислотійких бактерій

1. Метод мікроскопії є найбільш швидким, простим і менш витратним методом виявлення КСБ в нативному матеріалі (найчастіше в мокротинні) без попередньої його обробки й гомогенізації. Мікроскопічне дослідження мазків мокротиння, забарвлених за методом Ціля-Нільсена, дозволяє виявити КСБ за умови, що їх кількість буде складати 10 000 і більше в 1,0

мл мокротиння. Негативний результат не виключає діагнозу «туберкульоз», оскільки в мокротинні може міститися кількість мікобактерій нижча, ніж межа виявлення методом мікроскопії.

Основним діагностичним матеріалом для мікроскопії на КСБ слугує мокротиння.

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

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

За потреби виявлення збудника туберкульозу в різних біологічних матеріалах рекомендується використовувати культуральний метод дослідження.

2. Процедура приготування мазка розпочинається з підготовки предметних скельць. Потрібно використовувати тільки одноразові, нові, без подряпин і сколів, знежирені у спирті або суміші Нікіфорова (96° етиловий спирт + ефір у співвідношенні 1 : 1). Скло підписують простим олівцем по матовій смузі або алмазним олівцем по склу. Номер, проставлений на скельці, має відповідати номеру дослідження в лабораторному реєстраційному журналі.

Під час приготування мазків із нативного матеріалу контейнер відкривають акуратно, уникаючи розбризкування аерозолу, що містить мікобактерії.

Мікобактерії частіше виявляються в щільних гнійних грудочках мокротиння.

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

Товщина мазка у висушеному незабарвленому стані має бути такою, щоб можна було прочитати газетний шрифт, розміщений за скельцем на відстані 5,0-10,0 см. Якщо мазок занадто тонкий, під час мікроскопічного дослідження можна отримати хибнонегативний результат. Якщо мазок занадто товстий, він може бути змитий з предметного скельця в разі забарвлення.

На одному предметному склі можна робити тільки один мазок.

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

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

У разі якщо мазок готують за допомогою бактеріологічної петлі, потрібно обпалювати петлю після кожної маніпуляції в полум'ї спиртового чи газового пальника доти, доки вона не стане червоного кольору. Перед повторним використанням петлю ретельно прожарюють в полум'ї пальника, яке під час цього має бути безбарвним чи блакитним. Прийнятніше використовувати одноразові бактеріологічні петлі.

Мазки з осаду отримують після центрифугування діагностичного матеріалу. Для приготування мазка до осаду додають 1,0 мл фосфатного буфера, ресуспендують. На скельце наносять 1-2 краплі ресуспендованого осаду, розподіляючи його тонким шаром у центрі скла на площі близько 1,0-2,0 см x 2,0-3,0 см.

Мазки з осаду рідкого матеріалу легко змиваються в процесі забарвлення, тому їх потрібно готувати на скельцях, заздалегідь оброблених сироваткою чи бичачим сироватковим

альбуміном, який наносять ватним тампоном на чисті знежирені предметні скельця, рівномірно розподіляючи на 2/3 їх поверхні. Оброблені сироваткою скельця висушують за кімнатної температури. Скельця готують заздалегідь. Термін зберігання таких скелець - до 5 діб.

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

Приготовані мазки висушують за кімнатної температури до висихання у витяжній шафі або шафі біологічної безпеки.

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

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

3. Для фіксації мазків можна використовувати такі прийоми:

скельця з мазками, що висушили, фіксують триразовим проведенням їх упродовж 3-5 с через верхню третину полум'я спиртівки до зникнення ознак запотівання скелець;

скельця з мазками, що висушили, поміщають на електронагрівач для просушування предметних скелець за температури +65-75 °С не менше ніж на 1 год;

скельця з мазками, що висушили, поміщають у сушарну шафу за температури +105 °С на 10 хв.

4. Барвники, які використовуються, нерідко містять різні домішки, тому під час приготування розчинів барвників потрібно враховувати вміст фарбувальної речовини. Наважку розраховують шляхом ділення потрібної кількості фарби на десятковий еквівалент вмісту фарбувальної речовини.

Якщо вміст фарбувальної речовини становить 88,0 % і більше, перераховувати наважку не потрібно.

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

Реактиви:

Забарвлюючий розчин (3,0 % розчин фуксину).

Розчин 1. Розчин основного фуксину:

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

Розчиняють основний фуксин у спирті.

Розчин 2. Розчин фенолу 5,0 % водний.

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

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

Робочий розчин:

Змішують 10,0 мл розчину 1 і 90,0 мл розчину 2, переливають у ємність із темного скла. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати за кімнатної температури впродовж шести місяців. Перед використанням розчин слід профільтрувати.

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

Концентрована соляна кислота - 3,0 мл

96° етиловий спирт - 97,0 мл.

Акуратно додають концентровану соляну кислоту до спирту у флакон з темного скла. Забороняється вливати спирт у кислоту. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати за кімнатної температури впродовж шести місяців.

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

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

Концентрована сірчана кислота - 25,0 мл

Дистильована вода - 75,0 мл

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

Забороняється вливати воду в кислоту. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати за кімнатної температури впродовж шести місяців.

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

Хлорид метиленового синього - 0,3 г

Дистильована вода - 100 мл

Розчиняють хлорид метиленового синього в дистильованій воді.

На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати за кімнатної температури впродовж шести місяців.

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

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

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

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

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

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

Обережно промивають кожне предметне скельце, як зазначено вище. Знебарвлений мазок дофарбовують 0,3 % розчином метиленового синього впродовж 60 с.

Промивають скельця водою, видаляючи залишки вологи. Залишають препарат на повітрі за кімнатної температури у вертикальному або похилому положенні для висихання. Не слід промокати препарат.

6. Для налаштування мікроскопа і методики дослідження препаратів шляхом обертання макрогвинта віддаляють об'єктив від предметного столика. Обертаючи револьвер, встановлюють об'єктив із малим збільшенням (5 хв або 10 хв) точно над конденсором. Предметне скельце розміщують на предметному столику власне під об'єктивом. Дивлячись збоку для контролю відстані між склом і лінзою об'єктиву, повільно обертаючи мікрогвинт, опускають об'єктив до предметного скельця, не торкаючись лінзою препарату.

Дивлячись через окуляри, регулюють інтенсивність світлового потоку джерела світла.

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

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

Для перегляду мазка під час мікроскопічного дослідження ([додаток 1](#)), забарвлених за методом Ціля-Нільсена, слід використовувати світловий бінокулярний мікроскоп з об'єктивом (100х) з масляною імерсією та окуляром (10х) (загальне збільшення 1 000х). Слід використовувати тільки синтетичну імерсійну олію з коефіцієнтом заломлення $n_D = 1,5$.

Відповідними вважають поля зору, у яких видно клітинні елементи бронхіального походження (лейкоцити, слизові тяжі, клітини епітелію). Поля зору, що не містять таких елементів, не враховуються. Кількості полів зору якщо довжині мазка близько 2,0 см відповідає щонайменше 100-120. У разі якщо результат такого дослідження виявляється негативним, для підтвердження рекомендується проглянути додатково ще 200 полів зору. Таким чином, вивчається 300 полів зору. У разі значної кількості КСБ у мазку (2+) досить дослідити 50 полів зору, а для мазка КСБ (3+) - досить проглянути 20 полів зору (додаток 1).

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

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

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

Кислотостійкість, що виявляється під час забарвлення за Цілем-Нільсеном, властива не тільки різним видам мікобактерій, але й іншим мікроорганізмам, наприклад, *Rhodococcus*,

Nocardia, Legionella, а також цистам Cryptosporidium та Isospora. Мікобактерії, що швидко ростуть, можуть розрізнятися за мірою кислотостійкості. Іноді вони можуть забарвлюватися у фіолетово-малиновий колір. У сумнівних випадках рекомендується тривало (впродовж 45-60 хв) знебарвлювати мазок у солянокислому спирті. Сапрофіти під час цього втрачають забарвлення і виглядають як палички блакитного кольору.

7. Кількість виявлених КСБ визначає тяжкість захворювання і міру епідемічної небезпеки хворого. Підраховують кількість КСБ у мазку. Отже, дослідження має бути не тільки якісним, але й кількісним. Реєстрація результатів із зазначенням кількості виявлених КСБ проводиться відповідно до градації результатів мікроскопічного дослідження під час забарвленні за методом Ціля-Нільсена ([додаток 2](#)).

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

Результати мікроскопії слід повідомляти до відділення, яке надало проби, якнайшвидше, бажано впродовж 24 год з моменту отримання проб мокротиння. У бланку результату дослідження має бути зазначено такі відомості:

паспортні дані пацієнта;

найменування установи виконавця і відправника;

характеристика якості матеріалу;

використаний метод забарвлення;

кількість КСБ у мазку;

дата дослідження і прізвище співробітника, який проводив дослідження.

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

9. Флуорохромні барвники (аурамін О, родамін С тощо) зв'язуються з воскоподібними структурами бактерійних клітин, які під час опромінення ультрафіолетовими променями візуалізуються як палички жовтого або помаранчевого кольору на темному фоні.

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

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

Під час забарвлення мазків флуорохромними барвниками потрібно:

уникати неповного знебарвлення;

готувати досить тонкі мазки, оскільки зайва товщина мазка перешкоджає якісному знебарвленню, а додаткове дофарбовування може під часховати наявність мікобактерій. Окрім цього, товсті мазки погано фіксуються на предметному скельці, а тому можуть бути змиті в процесі фарбування;

уникати надмірно інтенсивного дофарбовування, яке приховує наявність мікобактерій.

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

Реактиви:

1. Забарвлюючий розчин

Розчин 1. Спиртовий розчин аураміну O:

аурамін	- 0,1 г
Аурамін розчиняють у 96° етиловому спирті	- 10,0 мл

Розчин 2. Розчин фенолу:

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

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

Робочий розчин:

У витяжній шафі змішують розчини 1 і 2, переливають у ємність із темного скла, що щільно закривається. На етикетці зазначають назву реактиву, дату притування і термін зберігання.

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

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

Концентрована соляна кислота - 0,5 мл
96° етиловий спирт - 100,0 мл

Акуратно додають концентровану соляну кислоту в етиловий спирт. Слід обережно влити кислоту в спирт, але не навпаки. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування, термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла за кімнатної температури впродовж трьох місяців.

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

Розчин перманганату калію:

Перманганат калію (KMnO ₄) - 0,5 г
Дистильована вода - 100 мл

Перманганат калію розчиняють у дистильованій воді і переливають у бутель з темного скла, який щільно закривається. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла за кімнатної температури впродовж трьох місяців.

Розчин акридинового помаранчевого:

Безводний двозаміщений фосфат натрію (Na ₂ HPO ₄) - 0,01 г;
Акридиновий помаранчевий - 0,01 г;
Дистильована вода - 100 мл.

Фосфат натрію розчиняють у дистильованій воді. Додають акридиновий помаранчевий. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла за кімнатної температури впродовж трьох місяців.

Розчин метиленового синього:

Метиленовий синій хлорид - 25,0 мг;

Вода дистильована - 100 мл.

25,0 мг метиленового синього хлориду розчиняють у 100 мл дистильованої води. На етикетці зазначають назву реактиву, дату приготування і термін зберігання. Розчин можна зберігати в ємності з темного скла за кімнатної температури впродовж трьох місяців.

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

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

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

На скельце наливають знебарвлювальний розчин і залишають на 2 хв.

Промивають мазок дистильованою водою.

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

Промивають мазок дистильованою водою.

Залишають препарат на повітрі за кімнатної температури у вертикальному або похилому положенні для висихання. Не слід промокати препарат. Можливе висушування мазків у сухожаровій шафі малого об'єму впродовж 10 хв за температури +110 °С.

Під час використання перманганату калію час його дії не повинен перевищувати 2 хв.

Точність експозиції має вирішальне значення, оскільки в разі перевищення часу експозиції інтенсивність флуоресценції може зменшуватися.

11. Облік результатів мікроскопічного дослідження під час забарвлення флуорохромними барвниками здійснюється при значно меншому збільшенні (зазвичай 400х), ніж збільшення, яке використовується для перегляду мазків, забарвлених за методом Ціля-Нільсена (1000х). Тому поле зору, що переглядається під люмінесцентним мікроскопом, має значно більшу площу, ніж поле зору світлового мікроскопа. Отже, кількість КСБ у 100 полях зору препарату, забарвленого флуорохромами і переглянутого у разі збільшення в 400 разів, буде значно вищою, ніж під час дослідження цього самого препарату, забарвленого за Цілем-Нільсеном і переглянутого в разі збільшення в 1 000 разів.

Під час мікроскопії препарату, забарвленого флуорохромними барвниками, слід переглядати не менше ніж 40 полів зору. Переглянута площа мазка під час мікроскопії 40 полів зору зі збільшенням 400х дорівнює площі 100 полів зору зі збільшенням 1 000х або одній лінії мазка, рівній 2 см.

12. Внутрішній контроль якості мікроскопічного дослідження проводиться під час фарбування кожної партії мазків.

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

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

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

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

Позитивні і негативні контрольні мазки включають до кожної партії мазків, що будуть забарвлюватися. Мікроскопію контрольних мазків слід проводити перед мікроскопією мазків від пацієнтів.

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

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

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

фон позитивного контрольного мазка залишається червоним;

у негативному контрольному мазку виявляються КСБ;

у мазках наявні конгломерати барвника.

Незадовільними результатами контролю мікроскопічного дослідження із забарвленням флуорохромами є такі:

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

фон негативного контрольного мазка залишається яскраво-жовтим після знебарвлення;

фон занадто темний або містить надто багато флуоресціюючих артефактів;

у негативному контрольному мазку виявляються КСБ.

Якщо під час проведення контролю якості відзначаються проблеми принаймні в одному із вищезазначених пунктів, слід з'ясувати, чи мали місце проблеми з притуванням розчинів, і повторити забарвлення двох негативних і двох позитивних контрольних мазків, зважаючи на можливі помилки. Якщо в разі повторного фарбування мають місце незадовільні результати, слід приготувати нові розчини барвників.

13. Причини, що знижують результативність мікроскопічного дослідження:

неправильне маркування флаконів із мокротинням (наприклад, під час маркування кришки флакона, а не власне флакона);

відсутність маркування на склі або пошкодження його в процесі забарвлення, помилки під час маркування зразків;

відсутність бінокулярного мікроскопа, поганий стан або погане налаштування мікроскопа;

недостатня підготовка персоналу;

технічні помилки під час запису або передачі результатів дослідження;

неправильна реєстрація результатів.

Неправильні результати можуть бути обумовлені помилками лабораторних працівників, пов'язаними переважно із фізичними і психологічними причинами (так званий «людський фактор»). Багато помилок, що виникають у разі неправильного обліку результатів мікроскопії мазків мокротиння, можна попередити під час здійснення постійного централізованого контролю роботи з мікроскопічної діагностики ТБ курируючими бактеріологічними лабораторіями за умови правильного навчання та періодичної перепідготовки лабораторних працівників.

14. Можливі причини хибнопозитивних результатів:

повторне використання контейнерів або предметних скелець;

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

використання непрофільтрованого розчину або забарвлюючого розчину, що зберігався впродовж тривалого часу;

недотримання методики фарбування мазків;

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

неадекватне знебарвлення;

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

поганий стан або погане налаштування мікроскопа;

контамінація імерсійної олії.

Можливі причини хибнонегативних результатів:

низька якість зразка мокротиння;

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

неправильний вибір грудочок мокротиння для приготування мазка;

порушення методики приготування мазка (занадто тонкий або товстий), погана його фіксація;

погана якість барвників;

недотримання методики приготування розчинів;

недостатній час експозиції із забарвлюючим розчином;

надмірне знебарвлення;

занадто сильне дофарбовування;

перегрівання в ході фарбування;

читання менше ніж 100 полів зору, хаотичний або недостатньо ретельний перегляд;

занадто тривала експозиція забарвлених мазків за денного освітлення;

занадто довгий інтервал між фарбуванням і читанням, особливо якщо мазки були погано забарвлені і не зберігалися в темряві.

IV. Обробка діагностичного матеріалу, деконтамінація та концентрація зразків

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

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

Усі препарати, що використовуються в певний час для розрідження і деконтамінації діагностичного матеріалу, мають виражену токсичність стосовно мікобактерій. Щоб забезпечити виживання достатньої частини мікобактеріальної популяції, потрібно використовувати бережні методи обробки, які дозволяють, з одного боку, подавити гнійні і гнилісні мікроорганізми, що швидко ростуть, а з другого - максимально зберегти життєздатність наявних у матеріалі мікобактерій.

Частота контамінації посівів (кількість проростів) у лабораторіях, де проводяться дослідження свіжозібраних проб, під час культивування мокротиння на щільних яєчних середовищах зазвичай становить 2,0-5,0 %. Якщо клінічний матеріал до надходження до лабораторії зберігався протягом декількох днів у нерегламентованих умовах, частота контамінації може досягати більше ніж 5,0 %, що припустимо. Якщо кількість проростів менше ніж 2,0 %, це свідчить про надмірно жорсткий режим деконтамінації, що може призвести до загибелі значної кількості *M. tuberculosis*, які містяться в діагностичному матеріалі. Для уніфікації результатів дослідження потрібно, щоб мікробіологічні лабораторії використовували для гомогенізації й деконтамінації діагностичного матеріалу один зі стандартних методів, зазначених нижче.

Під час здійснення посівів на *M. tuberculosis* потрібно мати на увазі такі важливі аспекти:

клінічні зразки мають бути гомогенізовані, щоб звільнити *M. tuberculosis* з тканин, в яких вони можуть міститися;

ні гомогенізація, ні деконтамінація не повинні істотно зменшувати кількості життєздатних *M. tuberculosis* в діагностичному матеріалі;

успіх гомогенізації й деконтамінації залежить від ряду чинників, зокрема:

підвищеної стійкості мікобактерій до різко лужної або кислої реакції розчинів, які використано для гомогенізації матеріалу;

тривалості обробки матеріалу цими речовинами;

температури зразка в процесі його центрифугування;

ефективності центрифугування, яке використовується для осадження мікобактерій.

2. Процедура передпосівної обробки має бути максимально щадною й забезпечувати частоту контамінації не більше ніж 5,0 % для щільних середовищ і 8,0-10,0 % - для рідких.

Усю процедуру деконтамінації проводять тільки у шафах біологічної безпеки 2 класу. Оскільки потрібно суворо дотримуватися певної тривалості обробки матеріалу, доцільно одночасно обробляти не більше ніж 8-12 проб.

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

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

3. Усі реактиви, які використовують під час приготування розчинів для обробки діагностичного матеріалу, повинні мати ступінь очищення не менше ніж категорія «хімічно чисті» (ХЧ).

Для передпосівної обробки діагностичного матеріалу рекомендується використовувати нижчезазначені методи й реагенти.

4. Застосування муколітичного препарату NALC, що використовується для швидкого розрідження мокротиння, прискорює процес деконтамінації та зменшує концентрацію деконтамінуючої речовини (NAOH) до 1,0 %. NALC швидко втрачає свою активність в розчиненому вигляді, тому його розчин має готуватися щодня і вживатися свіжим. У муколітичну суміш входить цитрат натрію для зв'язування іонів важких металів, що можуть бути наявні в пробі й інактивувати дію N-ацетил-L-цистеїну.

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

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

Розчини готують так:

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

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

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

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

гідроксид натрію (NAOH) - 20,0 г

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

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

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

У разі значного забруднення зразків сторонньою мікрофлорою концентрацію гідроксиду натрію у вихідному розчині можна збільшити до 3,0 %.

5. Для отримання фосфатного буфера (pH = 6,8) готують два розчини:

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

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

Потім для приготування буфера з рН = 6,8 обидва приготовані розчини змішують у рівній кількості й перевіряють рівень рН за допомогою рН-метра або індикаторної паперової смужки. Потрібного значення рН досягають, додаючи розчин а чи б. Розчин а підвищує значення рН, розчин б - знижує.

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

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

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

Стерилізація буфера проводиться в автоклаві за температури +121 °С протягом 15 хв у ємності з кришкою, що частково відкручена. Після охолодження розчину до кімнатної температури кришку слід щільно закрити.

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

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

щільно заклавши кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за допомогою вортексу (протягом 5-20 с) до повного розрідження;

перевернути пробірку, щоб усі ділянки її внутрішніх поверхонь і кришки піддалися дії розчину.

Потрібно уникати посиленого струшування, щоб запобігти окисленню й інактивації NALC. Необхідний ступінь інтенсивності змішування деконтамінуючого розчину з оброблюваним матеріалом забезпечується під час центрифугування, для чого потрібно:

залишити зразок на 15 хв за кімнатної температури для деконтамінації (у разі якщо потрібно збільшити ступінь деконтамінації, час експозиції може бути продовжено до 25 хв);

додати до пробірки стерильний фосфатний буфер (рН = 6,8) до відмітки «50,0 мл» (для зниження дії NAOH і зменшення щільності розчину перед центрифугуванням);

щільно закрити кришку й перемішати вміст пробірки струшуванням, щоб змити всі внутрішні поверхні пробірки і кришки;

центрифугувати зразок протягом 15-20 хв за 3 000 г в антиаерозольній центрифугі для осадження 95,0 % наявних у матеріалі мікобактерій;

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

Потрібно додати до осаду 0,5-2,0 мл нової порції стерильного фосфатного буфера, а потім ресуспендувати осад і використовувати його для інокуляції.

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

Тризаміщений фосфорнокислий натрій (Na_3PO_4) добре пригнічує супутню флору і навіть при 2-3-денному зберіганні матеріалу за температури +4 °С не пошкоджує мікобактерій і мало впливає на їх здатність до росту на живильних середовищах.

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

часом. Цей метод обробки матеріалу використовується тільки для посіву на щільні живильні середовища.

6. Для приготування розчину потрібно розчинити у 800 мл дистильованої води 100 г тризаміщеного фосфату натрію, довести об'єм розчину до 1 л і стерилізувати автоклавуванням протягом 15 хв за температури +121 °С.

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

Пробірку або флакон з матеріалом, залитим деконтамінантом, помістити на 18-20 год у термостат за температури +37 °С.

Після цього пробірки, не відкриваючи, помістити у відповідну центрифугу, урівноважити їх і центрифугувати під за 3 000 g протягом 15 хв. При зазначеному режимі відбувається осадження 95,0 % наявних у матеріалі мікобактерій.

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

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

Використану піпетку опустити в ємність з дезінфікуючим розчином.

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

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

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

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

Під час проведення процедури деконтамінації потрібно пам'ятати, що центрифугування є однією з найбільш небезпечних процедур стосовно ризику утворення інфекційного аерозолі.

Процедури піпетування, переливання з ємності в ємність також має бути скорочено до мінімуму і здійснено у шафі біобезпеки.

Загальний час обробки матеріалу за методом Петрова не повинен перевищувати 40 хв.

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

7. Розчин їдкого натру токсичний відносно як супутніх мікроорганізмів, так і *M. tuberculosis*. Тому під час використання цього методу потрібно суворо дотримуватися зазначених термінів обробки.

Приготування розчинів:

4,0 % розчин їдкого натру (NaOH):

40,0 г їдкого натру заливають дистильованою водою до об'єму 1 000 мл;

10,0 % розчин соляної кислоти:

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

Розчини стерилізують в автоклаві за температури +121 °С протягом 20 хв.

Для обробки досліджуваній матеріал, який перебуває в стерильному контейнері, залити подвійним об'ємом 4,0 % розчину їдкого натру і помістити на 10-30 с на струшувач.

Витримати отриману суміш 15 хв за кімнатної температури з періодичним ручним струшуванням. При цьому не варто перевищувати часу експозиції.

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

Пробірки врівноважити і центрифугувати матеріал за 3 000 g протягом 15 хв.

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

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

Пробірки врівноважити і повторно центрифугувати матеріал за 3 000 g протягом 15 хв.

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

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

Закрити пробірку і струснути її вміст. Пробірку з осадом помістити в штатив, розмістивши її у порядку реєстраційних номерів матеріалу.

8. Стерильним пінцетом вносять тампон з мазком із носоглотки в стерильну пробірку для центрифугування (50,0 мл). Додають 2,0 мл стерильної дистильованої води. Проводять обробку матеріалу NALC-NaOH. Перед додаванням фосфатного буфера тампон виймають із пробірки.

9. Дослідження промивних вод шлунка має бути проведено впродовж перших 4 год після їх отримання від пацієнта, оскільки через високу кислотність *M. tuberculosis* можуть швидко загинути. Зазвичай під час дослідження промивних вод шлунка немає потреби здійснювати деконтамінацію, якщо пробу було взято в стерильний контейнер з дотриманням правил асептики. Увесь об'єм проби центрифугують за 3 000 g впродовж 30 хв. Відразу ж після цього роблять посів матеріалу на живильне середовище.

10. З метою виділення мікобактерій із сечі до зразка рекомендують додавати:

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

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

на об'єм 30,0-50,0 мл - 1 краплю 1,0 % Твін 80, 3 краплі 20,0 % сульфосаліцилової кислоти і 0,5 мл білкового розчину (7,0-8,0 % стерильного бичачого сироваткового альбуміну, сироватки або плазми).

Проби сечі залишають на 2 год у холодильнику за температури +2 °С. Зразки, об'єм рідини в яких перевищує 30,0 мл, слід розділити порівну на дві пробірки. Зразки центрифугують за 3 000 g впродовж 20 хв, зливають надосадову рідину. Потім обробку матеріалу проводять за методикою деконтамінації мокротиння (NALC-NaOH), після чого негайно роблять посів на живильне середовище. Дослідження бактеріоскопії осаду сечі на КСП проводити недоцільно.

10. Лімфатичні вузли, біоптати та інші тканини, резецировані під час хірургічного втручання, потрібно подрібнити за допомогою стерильного скальпеля або ножиць і пінцета. Зразок гомогенізують у стерильній фарфоровій ступці або в гомогенізаторі тканин, додавши 0,5-1,0 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію і, за потреби, невелику кількість стерильного піску. Цю суспензію можна використати для посіву на живильне середовище у тих випадках, коли зазначені вище маніпуляції було проведено з дотриманням правил асептики. Якщо правил асептики не дотримувалися, проводять деконтамінацію проби 4,0 % розчином сірчаної кислоти, як це рекомендують робити під час обробки сечі. Якщо отриманий матеріал не може бути відпрацьований у день отримання проби, до зразка потрібно додати рівну за об'ємом кількість (не менше ніж 1,0 мл) стерильного ізотонічного розчину, щоб запобігти висиханню тканини. Зберігати матеріал у такому вигляді можливо не більше ніж 48 год у холодильнику за температури +4 °С.

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

12. Стерильно взяту спинномозкову рідину засівають без попередньої обробки.

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

13. Слизово-гнійні рідини обробляють так само, як і мокротиння, коли об'єм проби становить 10,0 мл або менше.

14. Якщо матеріал отримано з дотриманням правил асептики, його центрифугують за 3 000 g впродовж 15 хв і відразу ж роблять посів осаду на живильне середовище. Якщо об'єм проби перевищує 10,0 мл, її обробляють так само, як промивні води шлунка.

15. Кров та інші рідкі матеріали з великою домішкою крові після додавання 3,0 % розчину лимоннокислого натрію центрифугують за 3 000 g, а осад тричі відмивають стерильною дистильованою водою.

M. tuberculosis можуть «приклеюватися» до скла або пластику. Щоб досягти максимального витягання мікобактерій, контейнер обполіскують стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію. Центрифугують розчин за 3 000 g впродовж 15 хв і роблять посів 2-3 крапель осаду на живильне середовище.

16. Близько 5,0 г калу переносять у пробірку. Заливають гіпернасиченим розчином NaCl (у розчині має міститися нерозчинена сіль) і залишають на 4 год у ШББ. Зразок фільтрують через стерильну марлю в центрифужну пробірку, центрифугують за 3 000 g упродовж 20 хв, зливають надосадову рідину. До осаду додають 0,3 % розчин хлорамфеніколу в пропорції 1 : 3. Зразок поміщають на ніч у холодильник за температури +2 °С. Потім проводять обробку матеріалу за методикою деконтамінації мокротиння (NaLC-NaOH). Посів проводять як на щільні, так і в рідкі живильні середовища. Дослідження бактеріоскопії осаду калу на КСБ проводити недоцільно.

17. Під час внутрішньолабораторного контролю якості деконтамінації та оцінки можливих причин контамінації зразка, слід уточнити, чи не був занадто великим інтервал між збором зразка і його обробкою. Якщо це так, потрібно вжити заходів для організації транспортування зразків.

Потрібно суворо дотримуватися часу контакту зразка з деконтамінантом. Короткий час контакту призводить до високої частоти контамінації, занадто тривалий контакт викликає втрату життєздатності мікобактерій.

Потрібно переконатися, що ротор досягає необхідну відносну силу центрифугування 3 000 g і підтримує її впродовж 15 хв.

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

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

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

чи мають пацієнти, які отримали позитивний результат культурального дослідження, клінічні симптоми туберкульозу;

чи отримано позитивний результат культурального дослідження під час дослідження інших зразків від тих самих пацієнтів;

чи не було оброблено один або декілька зразків із ростом одиничних колоній *M. tuberculosis* відразу після зразків із великою кількістю КСБ.

Якщо крос-контамінацію не може бути виключено, слід переконатися, що процедури виконуються правильно, зокрема такі:

деконтамінації зразків не проводиться паралельно з посівом культур мікобактерій;

під час внесення розчинів у пробірки не відбувається торкання шийки;

розчини реагентів діляться на аліквоти;

аліквотів розчинів, відкритих упродовж робочого дня, не використовують повторно;

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

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

контейнери або пробірки зі зразками не відкриваються безпосередньо після діставання із центрифуги;

надсадова рідина акуратно зливається в контейнер, що містить дезінфікуючий розчин, уникаючи розпліскування, наприклад, через воронку;

рукавички в ході роботи змінюють часто і ніколи не використовують повторно.

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

Прийнятніше використати швидкорослі НТМБ (*M. fortuitum* тощо). Під час проведення тестування оцінюється швидкість і рясність зростання деконтамінованої й необробленої суспензії мікобактерій.

Тестування проводиться щомісяця, кожного разу під час зміни реагентів, в разі незадовільних результатів контролю якості - щотижня.

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

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

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

Засівають по 0,2 мл суспензії 1 у дві пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена. Засівають по 0,2 мл суспензії 2 у дві пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена.

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

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

Засівають по 0,2 мл суспензії 4 у дві пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена.

18. Через 5-7 днів інкубації оцінюють ясність росту *M. fortuitum*.

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

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

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

Процедурам деконтамінації й центрифугування піддають пробірку із середовищем Middlebrook 7H9 чи ізотонічним розчином хлориду натрію, засіяну *E. coli*. Через 3 дні оцінюють наявність росту *E. coli* в контрольній пробірці та інших пробірках, оброблених одночасно, з метою встановлення можливої крос-контамінації.

Можна піддати процедурам деконтамінації й центрифугування незасіяну пробірку із середовищем Middlebrook 7H9 чи ізотонічним розчином хлориду натрію. Через 3 дні оцінюють наявність росту в контрольній пробірці.

19. Для оцінки рівня контамінації визначають питому вагу контамінованих пробірок від загального числа засіяних пробірок для кожного живильного середовища. Така оцінка проводиться щомісяця, а в разі неадекватного рівня контамінації чи незадовільних результатів контролю якості - щотижня. Розрахунок рівня контамінації проводять за такою формулою:

Допустимий рівень контамінації для посівів у рідкі живильні середовища становить 6,0-8,0 %.

Високий рівень контамінації може бути викликано такими причинами:

недостатній час деконтамінації;

низька концентрація NaOH, NALC;

розчин NALC-NaOH приготований більше ніж 24 год тому;

незадовільна якість реагентів;

проблеми з референс-штамом (нежиттєздатний, неправильна каламутність суспензії);

нестерильні розчини.

Низький рівень контамінації, відсутність росту або незначний ріст культур мікобактерій може бути спричинено такими факторами:

перевищення часу деконтамінації зразків більше ніж на 20 хв;

завищена концентрація NaOH, NALC;

незадовільна якість реагентів;

проблеми з референс-штамом (нежиттєздатний, неправильна каламутність суспензії);

не належний рівень рН (вище ніж 8);

не належний режим центрифугування (час, швидкість, температура).

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

належні якість, термін придатності, концентрації реагентів і розчинів;

приготований робочий розчин використовується впродовж 24 год;

рН розчинів і зразка після деконтамінації не перевищує 8,0;

термін експозиції з деконтамінуючим розчином не перевищує 20 хв;

розчини і живильні середовища стерильні;

належна якість стерилізації в автоклаві й сухожаровій шафі;

належна якість контрольного штаму *M. fortuitum*.

У разі будь-якого відхилення від задовільних показників деконтамінації слід проаналізувати отримані результати й можливі причини цього.

Якщо в період, за який зареєстровано відхилення рівня контамінації, результати внутрішнього контролю якості живильних середовищ, обладнання і внутрішнього контролю якості деконтамінації, проведеної з використанням тест-штаму, були задовільними, змін до методики деконтамінації не вносять, а спостерігають за рівнем контамінації під час використання нової партії середовища.

Якщо мають місце незадовільні результати внутрішнього контролю якості деконтамінації, негайно здійснюють заходи для підвищення якості методу.

V. Живильні середовища, посіви та культивування

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

щільні живильні середовища на яєчній основі;

щільні або напіврідкі живильні середовища на агаровій основі;

рідкі живильні середовища;

рідкі синтетичні й напівсинтетичні живильні середовища.

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

2. Переваги яєчних середовищ:

економічність (найбільш дешеві зі всіх середовищ, що використовуються для виділення мікобактерій) і простота приготування;

можуть зберігатися в холодильнику до 4 тижнів;
добре підтримують ріст більшості штамів *M. tuberculosis*;
дозволяють проводити попередню ідентифікацію мікобактерій за морфологією колоній;
малахітовий зелений, що входить до складу середовищ, пригнічує ріст супутньої мікрофлори, яка швидко росте, зменшуючи вірогідність контамінації посівів.

3. Недоліки яєчних середовищ:

поява росту мікобактерій упродовж 2-12 тижнів і довше;

у процесі культивування з'являється ріст супутньої мікрофлори, який спостерігається на всій поверхні живильного середовища, внаслідок чого ці пробірки потрібно відбракувати. Для бактеріологічної діагностики ТБ потрібно використовувати щонайменше два різні за складом живильні середовища - Левенштейна-Єнсена і Фінна-П.

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

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

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

6. Вода для приготування живильних середовищ має бути дистильованою, вільною від речовин, що можуть сповільнити ріст мікроорганізмів.

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

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

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

Під час приготування середовища потрібно використовувати хімічно чистий лабораторний посуд, а також щойно приготовлену дистильовану воду. Усі живильні середовища чутливі до нагрівання, тому не потрібно нагрівати їх довше, ніж цього потребує така процедура.

Для отримання якісного середовища й уникнення забруднення його сторонньою мікрофлорою рекомендують дотримуватися таких основних правил:

приміщення, де готують живильні середовища, утримують у максимальній чистоті. Рекомендують регулярно мити підлогу з додаванням дезінфікуючого засобу, а також протирати дезінфектантом обладнання й робочі поверхні. Перед приготуванням середовищ потрібно обробити приміщення УФ-опромінювачем;

використовувати тільки стерильний посуд;
використовувати потрібну кількість реагентів;
правильно проводити приготування розчинів, тобто використовувати мірний посуд, доводити об'єм розчину по нижній межі меніска;
постійно контролювати температуру у згортувачі;
не допускати перегріву середовищ у згортувачі;
суворо дотримуватись вимог асептики;
ретельно обробляти поверхню яєць перед їх розбиванням для приготування яєчної маси;
не піддавати готового середовища дії УФ променів;
зберігати готові середовища у темному прохолодному місці;
проводити контроль якості кожної партії приготованих середовищ;
розливати в пробірки по 5,0 мл середовища.

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

7. Нижче зазначено склад і рекомендації щодо приготування найбільш поширених щільних яєчних середовищ - Левенштейна-Єнсена та Фінна-П.

Левенштейна-Єнсена

Склад середовища

Розчин мінеральних солей:

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

Зазначені інгредієнти розчиняють у теплій дистильованій воді в зазначеній послідовності за слабого підігрівання (не доводячи до кипіння) на водяній бані. L-аспарагін рекомендують розчиняти окремо і вносити останнім. Потім сольовий розчин стерилізують в автоклаві за 1 атм. (121 °C) протягом 30 хв. Термін зберігання розчину становить 3-4 тижні за кімнатної температури.

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

Розчин малахітового зеленого:

Малахітовий зелений	2,0 г
Стерильна дистильована вода	100 мл

Наважку порошку малахітового зеленого потрібно розчинити в стерильній теплій дистильованій воді й помістити розчин у термостат на 1,0-2,5 год для більшого розчинення (рекомендують часте помішування, оскільки порошок розчиняється дуже погано). Потім профільтрувати розчин через паперовий фільтр, розлити по флаконах або невеликих колбах і стерилізувати за 1 атм. (+121 °С) протягом 30 хв. Приготований розчин не підлягає тривалому зберіганню в разі появи осаду або зміни забарвлення його слід замінити свіжим розчином.

Для приготування яєчної маси свіжі (що зберігаються не довше ніж 7 днів) дістичні курячі яйця без тріщин і дефектів шкаралупи ретельно відмивають у теплій проточній воді за допомогою ручних щіток і лужного мила. Потім яйця занурюють у 70,0 % етиловий спирт на 30 хв.

Перш ніж почати роботу з чистими й сухими яйцями, рекомендують ретельно вимити руки з милом і щіткою. Потім у стерильному боксі розбивають яйця стерильним ножом у стерильний посуд, доводячи загальний об'єм яєчної маси до 1 000 мл (для цього потрібно в середньому 20-25 яєць залежно від їх розміру).

Потрібна кількість яєчної маси визначається за об'ємом, а не за кількістю яєць. Ретельно перемішують яєчну масу стерильним вінчиком або в стерильному міксері за мінімальної швидкості. Потрібно мінімізувати утворення піни.

Для приготування середовища у велику стерильну ємність, дотримуючись правил асептики, поміщають такі розчини:

розчин мінеральних солей - 600 мл;

гомогенізована яєчна маса - 1 000 мл.

Суміш ретельно перемішують і фільтрують через стерильний марлевий фільтр, що має не менше ніж чотири шари марлі. Додають 20,0 мл розчину малахітового зеленого, ретельно перемішують, уникаючи утворення піни. Одразу розливають у пробірки приблизно по 5,0 мл, стежачи за тим, щоб у розчині не сформувалося осаду. Не допускати потряпляння піни в пробірки.

8. Для згортання середовища використовуються спеціальні апарати-згортувачі. Пробірки з розлитим у них середовищем поміщають у спеціальні касети з підібраним кутом нахилу для формування скошу середовища заввишки 8,0-10,0 см. Штативи встановлюють у згортувач і проводять коагуляцію за температури +80-85 °С протягом 30 хв.

Згортання не є процедурою стерилізації, а тільки коагуляції.

Стерильність середовища забезпечується стерильними умовами його приготування і розливу.

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

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

9. Середовище Фінна-II:

Розчин мінеральних солей:

Магній сірчаноокислий $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,5 г
Натрій лимоннокислий $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5,5H_2O$	- 1,0 г
Галун залізоамонійний $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	- 0,05 г
Калій однозаміщений фосфорнокислий KH_2PO_4	- 20,0 г
Амоній лимоннокислий однозаміщений $C_8H_{11}O_7N$	- 5,0 г
Натрій глютаміновоокислий однозаміщений $C_5H_9NNaO_4 \cdot H_2O$	- 10,0 г
Гліцерин	- 20,0 мл
Вода дистильована	- до 1 000 мл

Перелічені інгредієнти розчиняють у дистильованій воді в зазначеній послідовності за слабого підігрівання (не доводячи до кипіння) на водяній бані. Кислотність не коригують. Стерилізують в автоклаві за 1 атм. (+121 °C) протягом 30 хв. Термін зберігання розчину становить 3-4 тижні за кімнатної температури.

10. Приготоване яєчне середовище після його коагуляції має бути візуально оцінено. Правильно приготоване середовище має бути щільним і міцно прилипати до стінок пробірки. Вміст конденсату в пробірці із середовищем не повинен перевищувати 0,2 мл. Знебарвлення середовища або поява поглиблень чи бульбашок усередині середовища та на його поверхні свідчить про надмірну температуру коагуляції. Партію середовища з виявленими недоліками не можна використовувати для посіву і має бути знищено.

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

Після згортання кожна приготована партія середовища спочатку піддається контролю на стерильність. Із цією метою шість пробірок зі свіжоприготовленої партії середовища поміщають у термостат за температури +37 °C і витримують протягом трьох діб, що достатньо для росту забруднюючих мікроорганізмів.

Якщо принаймі 1 пробірка проростає супутньою мікрофлорою, аналогічним чином має бути перевірено 10 додаткових пробірок. Якщо хоча б в одній із цих 10 пробірок з'являється ріст, аналогічним чином має бути перевірено всі пробірки цієї партії. Усі пробірки з ростом забруднюючої мікрофлори слід видалити. Решту неконтамінованих пробірок може бути використано.

Потрібно проводити тестування ростових якостей кожної партії середовища за допомогою стандартного тест-штаму. Як тест-штам рекомендується використовувати лабораторний (музейний) штам *M. tuberculosis* H₃₇R_v. Для приготування суспензії потрібно зробити змив чотирьохтижневої культури зі всієї поверхні щільного середовища, гомогенізувати суспензію за допомогою струшування на струшувачі (вортексі) протягом 1 хв і приготувати кілька її розведень.

Щоб утворити суспензію № 1, потрібно розвести бактеріальну суспензію за стандартом мутності 1 McF (3×10^8 КУО/мл).

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

Засіяти по 0,2 мл кожної із суспензій (3×10^3 і 3×10^4) на дві пробірки приготованої партії середовища. Розподілити інокулят по поверхні пробірок. Подальша інкубація - у звичайному

порядку. Реєструвати щотижня ріст і відносний розмір колоній у пробірках, порівнюючи ріст на новоприготованій партії середовища з результатами росту, одержаними на попередній партії середовища й зафіксованими в журналі приготування середовищ (термін появи росту, кількість і розмір колоній).

Посів розведень 3×10^3 і 3×10^4 має дати ріст 1-10 і 10-100 колоній відповідно. За таких результатів росту на середовищах, що контролюються, їх якість вважають задовільною.

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

11. Результати контролю якості середовищ фіксують у журналі приготування середовищ. У цьому журналі мають бути зазначені дата приготування середовища, об'єм приготованого середовища або кількість розлитих пробірок, ПІБ лаборанта, що приготував середовище, результати тесту на стерильність і на ростові якості (час появи росту для обох штамів, кількість колоній в різних розведеннях), дата проведення контролю, ПІБ лаборанта, що проводив контроль якості середовища, висновок про придатність середовища. Нове середовище придатне до вживання, якщо ріст на ньому еквівалентний або кращий, ніж на попередньому середовищі. Не використовувати партії середовища, якщо ріст на ньому гірший, ніж на попередній партії.

12. Мікроскопічне та бактеріологічне дослідження мають проводитися паралельно з однієї й тієї самої проби діагностичного матеріалу.

Перед процедурою посіву потрібно підготувати пробірки із живильними середовищами, пронумерувати їх відповідно до реєстраційних номерів зразків і послідовно розміщувати у вертикальному штативі. Так само потрібно підготувати й пронумерувати предметні скельця.

Осад, одержаний після попередньої обробки діагностичного матеріалу одним із вищезазначених методів, потрібно піддати паралельно бактеріологічному й мікроскопічному дослідженням.

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

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

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

пробірки із живильним середовищем під час посіву мають знаходитися в похилому положенні (під кутом 40-45°);

посівний матеріал нанести на середовище у верхню третину скосу живильного середовища;

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

залишок осаду забрати тією самою піпеткою й нанести на заздалегідь підготоване і пронумероване предметне скло 2-3 краплі осаду для отримання мазка для мікроскопічного дослідження, розподіливши матеріал рівномірним шаром у центрі скла на площі близько $1,0 \times 2,0$ см;

використану для посіву і приготування мазка піпетку опустити в ємність із дезінфікуючим розчином;

після закінчення посіву всіх проб засіяні пробірки перемістити в горизонтальні штативи і помістити в термостат за температури $+37^{\circ}\text{C}$ (при цьому поверхня скосу живильного середовища має знаходитися в горизонтальній площині, а нахил штатива має виключати змочування пробки матеріалом посіву в разі використання ватно-марлевих пробок).

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

Оптимальна температура інкубації - 37°C .

У разі первинного посіву мікроскопічно негативного матеріалу середня тривалість росту мікобактерій на щільних живильних середовищах може становити 20-46 діб. Ріст окремих штамів спостерігається через 60 діб і більше. Це обумовлює необхідність, за відсутності росту мікобактерій, витримувати посіви в термостаті до 10 тижнів для видачі негативного результату.

У процесі інкубації посівів потрібно дотримуватися таких рекомендацій:

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

пробірки переводять у вертикальне положення;

інкубацію проводять протягом 10 тижнів за обов'язкового щотижневого перегляду пробірок із посівами;

для полегшення процедури щотижневого перегляду та обліку, посіви, здійснені протягом одного дня, розміщувати в окремих ящиках із матеріалу, який піддається обробці дезінфектантами й автоклавуванню, або штативах у порядку номерів реєстрації. При цьому кожен штатив або ящик слід забезпечити етикеткою, на якій зазначаються дата посіву, перший та останній реєстраційні номери партії.

13. Під час оцінювання результатів культурального дослідження діагностичного матеріалу потрібно дотримуватися таких правил:

спостереження за посівами і перегляд пробірок з посівами слід проводити щотижня;

за відсутності росту посіви мають витримуватися в термостаті протягом 10 тижнів. Негативний результат бактеріологічного дослідження може бути видано тільки після закінчення цього терміну інкубації;

під час чергового перегляду слід відбирати всі пробірки, у яких є ріст колоній, розставляючи їх у порядку номерів реєстрації матеріалу;

реєструвати такі параметри:

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

«інтенсивність росту» - число колоній, що виросли в кожній із пробірок. За наявності одночасного росту у пробірках рекомендується оцінити кількість КУО в кожній пробірці, що

засіяна таким матеріалом. Цей показник має важливе діагностичне і прогностичне значення, особливо якщо посіви здійснюють у динаміці спостереження за хворим у процесі хіміотерапії;

«проріст» сторонньою мікрофлорою або грибами (за наявності такого);

«відсутність росту» (зазначений параметр реєструється через 10 тижнів культивування).

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

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

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

Під час щотижневих переглядів посівів за підозри на забруднення сторонньою мікрофлорою потрібно видалити і знешкодити ті пробірки, у яких спостерігається забруднення всієї поверхні живильного середовища чи зміна живильного середовища (розрідження або знебарвлення).

Мікроорганізми, які забруднюють посіви, мають здатність розкласти інгредієнти середовища з утворенням кислоти, що призводить до зниження рН-середовища. На такому середовищі мікобактерії не ростуть, а ці пробірки підлягають видаленню.

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

У всіх випадках отримання росту, щоб уникнути невірного результату, відповідь про виділення кислотостійких мікобактерій видається тільки після мікроскопії мазка з колоній, що вирости, забарвленого за методом Ціля-Нільсена.

14. Вірулентні культури *M. tuberculosis* ростуть на щільних живильних середовищах у вигляді R-колоній різного розміру та вигляду, мають жовтуватий або злегка креманий відтінок (колір слонової кістки), шорстку поверхню, що нагадує манну крупу або цвітну капусту. Колонії сухі, зморшкуваті, але в разі дисоціації можуть траплятися й вологі, злегка пігментовані колонії, рожево-жовтий пігмент яких суттєво відрізняється від оранжевого чи жовтого пігменту сапрофітних або деяких нетуберкульозних мікобактерій. Останні ростуть у S-формі. Слід зазначити, що на середовищі Фінна-Пі колонії часто виглядають вологішими, ніж на середовищі Левенштейна-Єнсена.

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

Під час приготування мазків для мікроскопічного дослідження колоній *M. tuberculosis* проявляють свої фізико-хімічні особливості: вони не емульгуються в ізотонічному розчині, а утворюють зернисту крихтоподібну суспензію.

Під час мікроскопічного дослідження мазків із колоній, забарвлених за Цілем-Нільсеном, виявляються яскраві малиново-червоні паличкоподібні бактерії, що розміщуються поодинокі або групами. Під час культивування на рідких середовищах або в умовах підвищеної вологості

M. tuberculosis утворюють скупчення чи переплетення у вигляді «кіс» - феномен «корд-фактора».

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

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

Остаточний висновок про належність виділеної культури до комплексу *M. tuberculosis* можна зробити тільки після первинної диференціації культури, що здійснюється в ході проведення тесту на медикаментозну чутливість. Потрібно здійснити подальшу ідентифікацію виділеної культури, що дасть можливість віднести мікобактерії до того чи іншого виду.

15. Під час виділення культури кислотостійких мікобактерій відповідають певним характеристикам, а саме:

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

наявність колоній характерної морфології й забарвлення;

мікроскопічне підтвердження кислотостійкості виділеного мікроорганізму в разі забарвлення за методом Ціля-Нільсена потрібно провести напівкількісне оцінювання інтенсивності росту.

Усі характеристики мікобактерій, що вирости на щільних живильних середовищах, заносяться до лабораторного журналу обліку результатів культуральних досліджень, до бланків відповідей, а також до картотеки. Результати дослідження реєструються та зберігаються в лабораторному модулі Реєстру хворих на ТБ.

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

Аналізатор ВАСТЕС MGIT 960/320 є єдиною повністю автоматизованою системою для визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів, яка забезпечує прискорене тестування культури до майже всіх препаратів, у тому числі й до піразинаміду.

Матеріалом дослідження на аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960/320 можуть бути респіраторні зразки, насамперед мокротиння, будь-які біологічні рідини (крім крові й сечі), а також виділення ран, промивні води шлунка і тканини організму, отримані під час хірургічних втручань. Умови збору діагностичного матеріалу і його якість мають відповідати існуючим вимогам, оскільки преаналітичний етап значно впливає на результати дослідження. Найбільш зручною ємністю для збору клінічних зразків вважають стерильну градуйовану пробірку на 50,0 мл з кришкою, що загвинчується і перешкоджає розбризкуванню матеріалу під час відкривання. Оптимальна кількість рідкого діагностичного матеріалу має становити близько 5,0 мл.

Перед інокуляцією в рідкі середовища розрідження й деконтамінацію матеріалу рекомендується проводити з використанням NALC-NAOH (за методом Kubika) з подальшим отриманням осаду в результаті центрифугування (за 3 000 g протягом 15 хв).

Цей метод дозволяє перетворити зразок у сконцентровану гомогенну суспензію, у якій практично знищена будь-яка мікрофлора, крім мікобактерій, що зберегли життєздатність. За такої обробки одним із факторів збільшення ефективності культурального (як і мікроскопічного) дослідження є збереження реакції середовища, близького до нейтрального (рН 6,8).

Виявлення мікобактерій із використанням системи бульйонного культивування обов'язково передбачає паралельний посів зразка на щільне яєчне середовище. Інокуляцію діагностичного матеріалу в рідке середовище проводять одночасно з посівом на щільне яєчне середовище, що потрібно для більш повного задоволення живильних потреб мікобактерій, які можуть дати ріст тільки на одному із середовищ. Цей принцип дозволяє також уникнути деяких помилок, пов'язаних із технічними похибками, неправильною інтерпретацією росту в позитивній пробірці.

З метою підтвердження належності культури, що виросла на рідкому середовищі будь-якого аналізатора, до комплексу *M. tuberculosis* потрібно проводити бактеріоскопію за Цілем-Нільсеном і субкультивування на щільному яєчному середовищі вмісту позитивної процесорної ємності. Використання ПЛР-аналізу (ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція) з метою диференціювання комплексу *M. tuberculosis* і НТМБ у разі отримання позитивних результатів в автоматизованій системі може на 7 днів і довше скоротити час бактеріологічної діагностики туберкульозу.

17. Аналізатор ВАСТЕС MGIT 960/320 працює на принципах технології MGIT: індикаторні пробірки після внесення до них діагностичного матеріалу інкубуються у приладі й періодично піддаються УФ-тестуванню.

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

Прискорення росту мікобактерій і зниження контамінації забезпечується доповненням бульйону 7Н9 рідкою живильною добавкою OADC і п'ятьма ліофілізованими антибіотиками PANTA, які вносять до індикаторної пробірки перед посівом. OADC містить чотири живильні компоненти: олеїнову кислоту, бичачий сироватковий альбумін, декстрозу і каталазу.

Суміш PANTA містить препарати, що пригнічують життєдіяльність Грам+, Грам-, анаеробних бактерій, а також грибів. Вона складається з поліміксину В, амфотерицину В, налідиксової кислоти й азлоциліну. Прилад ВАСТЕС 960 оцінює пробірку як позитивну, якщо кількість живих мікроорганізмів у ній досягла 10^5 - 10^6 на 1,0 мл середовища.

Таким чином, прилад ВАСТЕС MGIT 960/320 здійснює комп'ютерний моніторинг стану бактеріальної популяції у збагаченому рідкому живильному середовищі Middlebrook 7Н9 і сигналізує про розмноження мінімальної кількості мікроорганізмів.

Пробірки MGIT на 7,0 мл призначені для культивування мікобактерій із використанням приладу ВАСТЕС 960/320. У кожній пластиковій пробірці з кришкою, що загвинчується, міститься 7,0 мл середовища Міддлбука 7Н9, яке перед інокуляцією збагачується живильними добавками й антимікробними речовинами для запобігання контамінації. Інокулятом можуть слугувати заздалегідь оброблені (розріджені, деконтаміновані й концентровані) клінічні зразки, за винятком сечі, стерильні біологічні рідини (виключаючи кров) та культури мікобактерій. Пробірки також призначені для визначення медикаментозної чутливості мікобактерій, за винятком піразинаміду. Пробірки поставляються у картонній коробці, що містить 100 пробірок. Температура зберігання +2-25 °С.

Набір MGIT 960/320 Supplement складається із шести флаконів із 15,0 мл ростової добавки OADC, що містить олеїнову кислоту, бичачий альбумін, глюкозу і каталазу, а також із шести флаконів із ліофілізованою сумішшю антибіотиків PANTA, що містять поліміксин Б, амфотерицин Б, налідиксову кислоту, триметопід часм і азлоцилін. Кожен набір розрахований приблизно на 100 пробірок, температура зберігання +2-8 °С.

Набір MGIT 960/320 IRE Kit призначений для визначення чутливості культури мікобактерій до критичних концентрацій ізоніазиду, рифампіцину й етамбутолу, містить по одному флакону кожного з препаратів (стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин та етамбутол) у ліофілізованому стані, а також вісім флаконів по 20,0 мл збагачувальної добавки MGIT 960 AST supplement (OADC), яка відрізняється від аналогічної добавки, призначеної для виявлення мікобактерій, за кількісним співвідношенням компонентів. Перед додаванням до пробірок MGIT, препарати слід розчинити у 4,0 мл стерильної деіонізованої води. Набір розрахований на 40 тестів, температура його зберігання +2-8 °С.

Набір BACTEC MGIT 960/320 PZA Kit призначений для визначення чутливості мікобактерій до піразинаміду, містить два флакони з ліофілізованим піразинамідом і шість флаконів живильної добавки.

Перед додаванням піразинаміду до пробірок MGIT з пониженим рН (5,9) його слід розчинити в 2,5 мл стерильної дейонізованої води. Набір розрахований на 50 тестів, температура його зберігання - 2-8 °С.

Пробірки MGIT 960/320 PZA призначені для визначення чутливості мікобактерій до PZA. Пробірка містить 7,0 мл модифікованого бульйону Міддлбука 7Н9 зі зниженим значенням (рН = 5,9). Пробірки поставляються в картонній коробці по 25 штук. Температура зберігання пробірок - 2-25 °С.

Набір MucosPrep призначений для розрідження й деконтамінації клінічних зразків, направлених для мікроскопічного та культурального досліджень з метою виявлення кислотостійких мікобактерій. Набір складається з десяти флаконів (по 75,0 мл або по 150 мл) 2,0 % розчину NaOH, де в кожному флаконі міститься скляна ампула з порошкоподібним муколітиком NALC, а також із пакетів фосфатного буфера.

Безпосередньо перед використанням розчину NALC-NaOH (перед додаванням в його в рівному об'ємі до досліджуваного зразка) ампулу слід розчавити всередині флакона. Кожен пакет із солями для фосфатного буфера розчиняють у 0,5 л очищеної води й заздалегідь стерилізують автоклавуванням. Температура зберігання набору +2-25 °С.

Реагенти для обробки клінічних зразків можна приготувати в умовах лабораторії.

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

гідроксид натрію (NaOH) - 20,0 г

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

Перед обробкою додають порошок муколітичного (розріджувального) агента NALC до розчину NaOH-цитрат із розрахунку 0,5 г на 100 мл. Після додавання NALC суміш NALC-NaOH може бути використано тільки протягом 24 год, оскільки після закінчення зазначеного терміну розчин швидко втрачає муколітичну активність.

Цитрат натрію додають до розчину NaOH, щоб зв'язати іони важких металів, що можуть бути наявні у зразку й інактивувати NALC.

У разі високого забруднення зразків сторонньою мікрофлорою концентрацію гідроксиду натрію в початковому розчині можна збільшити до 3,0 %.

Для отримання фосфатного буфера в 1 л дистильованої води потрібно розчинити:

двозаміщений фосфат натрію (Na_2HPO_4)	- 4,74 г
однозаміщений фосфат калію (KH_2PO_4)	- 4,54 г

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

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

до зразка (під часблизно 5,0 мл), що міститься в пластиковій градуйованій пробірці об'ємом 50,0 мл, додати рівний об'єм NALC-NaOH або препарату Mucoprep;

щільно закрити кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за допомогою вортексу 15-30 с, прагнучи досягти повного розрідження, і залишити на 15 хв за кімнатної температури, перевертаючи для змішування кожні 5 хв;

додати фосфатний буфер до відмітки «50,0 мл» і змішати струшуванням (після додавання фосфатного буфера рН досліджуваного матеріалу відповідає значенню 6,8;

центрифугувати зразок протягом 15 хв за 3 000 g, залишивши у шафі біологічної безпеки на 5 хв для осадження аерозолів;

видалити надосадову рідину;

додати до осаду 1,0 мл фосфатного буфера, загальний вміст має скласти 1,5-2,0 мл.

Використовувати отриманий матеріал для:

посіву в пробірці MGIT;

посіву на щільне середовище;

приготування мазків;

молекулярно-генетичних досліджень (GeneXpert тощо).

Якщо матеріал не використовують негайно, його потрібно заморозити ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

19. Інокуляцію осаду обробленого матеріалу в індикаторні пробірці MGIT проводять за допомогою одноразової пастерівської піпетки. Для цього потрібно:

зняти кришку, що відкручується, з пробірки MGIT;

додати вміст флакона зі збагачувальною добавкою MGIT (Growth supplement) (15,0 мл) до флакона з ліофілізованими антибіотиками PANTA;

перенести 0,8 мл отриманої суміші до пробірки MGIT;

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

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

Для інкубації пробірок у системі потрібно відкрити один із ящиків приладу ВАСТЕС MGIT 960/320 і натиснути кнопку «Tube enter», що з'явилася на екрані («завантаження пробірки»). При цьому загоряється лампа сканера для зчитування штрих-коду з пробірки.

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

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

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

У разі появи інформації про позитивний результат потрібно відкрити зазначений ящик, натиснути кнопку «positive», що з'явилася на екрані, витягнути відповідну пробірку з гнізда і відсканувати штрих-код.

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

У разі появи інформації про негативний результат потрібно відкрити зазначений ящик, натиснути кнопку «negative», що з'явилася на екрані, витягнути зазначену пробірку з гнізда і просканувати її штрих-код.

20. Позитивний результат, що свідчить про зростання культури в індикаторній пробірці, може реєструватися із четвертого дня після інокуляції, а позитивний сигнал у першу - третю добу може бути розцінений як мікробна контамінація зразка.

Для підтвердження росту мікобактерій, а також ідентифікації *M. tuberculosis* у позитивній пробірці проводять певні процедури.

Видаливши позитивну пробірку з приладу, слід візуально оцінити прозорість бульйонного середовища для визначення можливого росту мікобактерій.

Зазвичай ріст культури *M. tuberculosis* виявляється у вигляді характерних придонно розміщених пластівців, які за незначного струшування піднімаються й поширюються по всьому середовищу, а рідке середовище зберігає прозорість. Помутніння середовища в позитивній пробірці свідчить про можливу контамінацію сторонньою флорою.

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

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

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

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

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

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

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

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

позитивний сигнал під час ладу + відсутність кислотостійких бактерій і мікроколоній контамінуючої мікрофлори під час бактеріоскопії + характерний ріст колоній на щільному середовищі + відсутність росту на середовищі Левенштейна-Єнсена, що містить 500 мкг/мл саліциловокислого натрію;

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

позитивний сигнал приладу + кислотостійкі бактерії або відсутність кислотостійких бактерій і мікроколоній контамінуючої мікрофлори під час бактеріоскопії + позитивний результат ПЛР із праймерами для *M. tuberculosis* із позитивної процесорної ємності.

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

Контроль якості виконується під час отримання кожної нової партії пробірок з використанням колекційних штамів таких мікобактерій: *M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478 і *M. fortuitum* ATCC 6841. Контроль якості можна проводити за допомогою інших лабораторних штамів. Зокрема, штам *M. tuberculosis* H₃R, (під час посіву в пробірку MGIT 0,5 мл мікробної суспензії, приготованої по 0,5 стандарту McFarland і розведенню 1 : 100) має дати ріст, підтверджений позитивним сигналом BACTEC 960, на 7-9 день після внесення до приладу.

Прийнятним для збагаченого рідкого середовища вважається рівень контамінації, що досягає 5,0-8,0 % від загального числа посівів. У разі підвищення рівня контамінації більше ніж на 10,0 % потрібно терміново виявити причини і вжити заходів щодо їх усунення.

У разі отримання позитивного результату під приладу BACTEC 960 (із 4 по 42 день) потрібно переконатися, що в рідкому середовищі позитивної пробірки не міститься контамінуючих мікроорганізмів. Якщо в результаті мікроскопії за Цілем-Нільсеном виявлено мікобактерії, а під час посіву на кров'яний агар контамінація матеріалу в пробірці підтверджена, за потреби можна провести повторну деконтамінацію і спробувати виділити чисту культуру мікобактерій. Із цією метою потрібно зробити таке:

перенести увесь контамінований вміст із позитивної пробірки MGIT до стерильної об'ємом 50,0 мл;

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

зробити посів на щільне яєчне середовище.

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

збільшення концентрації лугів під час первинної обробки матеріалу (не більше ніж до 1,5 % після з'єднання зі зразком);

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

збільшення концентрації PANTA шляхом зменшення кількості рідкої добавки, яку використовують для розчинення ліофілізованої PANTA (більш концентрований розчин PANTA можна одержати під час розчинення PANTA у 10,0 мл (замість 15,0 мл) збагачувальної добавки, де перед інокуляцією до пробірки MGIT додають звичайний об'єм - 0,8 мл розчину отриманої суміші).

Зміни параметрів обробки мокротиння рекомендують проводити в зазначеному порядку. Слід пам'ятати, що в разі надмірного збільшення концентрації PANTA може спостерігатися пригнічення росту деяких видів мікобактерій (але не *M. tuberculosis*). Не варто змінювати відразу декілька параметрів одночасно.

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

Загальним правилом є аліквотування розчинів невеликими об'ємами. Таким чином, кожного разу використовують свіжий розчин, а розчину, що залишився від аліквоти, не зберігають.

Важливим фактором боротьби з контамінацією є скорочення часу зберігання мокротиння, чим попереджається його забруднення сторонньою мікрофлорою. За потреби, зберігати мокротиння слід у холодильнику за температури +4 °С.

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

VI. Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу, видова ідентифікація мікобактерій

1. У бактеріологічних лабораторіях II-III рівнів має проводитися попередня ідентифікація комплексу *M. tuberculosis* (родова ідентифікація).

Основою ідентифікації є такі характеристики:

швидкість росту бактерій довше ніж 10 днів;

морфологія і забарвлення колоній;

результати дослідження мазків, приготованих із виділеної культури й забарвлених за методом Ціля-Нільсена.

Під час перегляду посівів проводиться вивчення усіх культур, що вирости. На підставі морфологічних ознак колоній здійснюється попередній розподіл культур на ті, що належать до *M. tuberculosis complex*, нетуберкульозні мікобактерії та споріднені таксони.

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

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

M. bovis на середовищі Левенштейна-Єнсена показує дисгонічний ріст, що стелиться.

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

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

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

2. Потрібно приготувати мазки з усіх культур, відібраних під час перегляду посівів.

Забарвити мазки за методом Ціля-Нільсена.

Провести мікроскопію мазків.

У разі забарвлення методом Ціля-Нільсена КСБ виглядають червоними на синьому фоні. Мікобактерії мають вигляд тонких, ледь зігнутих паличок, коротких, завдовжки 1-10 (частіше 1-4) мкм, завширшки 0,2-0,6 мкм, гомогенних або зернистих із трохи заокругленими кінцями. У мазках культури *M. tuberculosis*, що виросла на напіврідкому або рідкому середовищі, можна побачити мікроколонії мікобактерій у вигляді кіс і джгутів, феномен «корд-фактора».

У разі приготування мазків для мікроскопічного дослідження колоній *M. tuberculosis* проявляють свої фізико-хімічні особливості: вони не емульгуються в ізотонічному розчині, а утворюють зернисту крихтоподібну суспензію.

Під час перегляду мазка слід звернути увагу на морфологічні особливості паличок і розміщення їх у препараті. НТМБ у мазку з культури можуть розміщуватись у вигляді частоколу, паркету або мати форму кокобацил. Незважаючи на те, що морфологічна характеристика паличок може асоціюватися з певним видом мікобактерій, це не є підставою для видової ідентифікації.

У разі підтвердження кислотостійкості культур, що виросли, їх відносять до роду мікобактерій і проводять подальше вивчення.

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

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

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

Мікобактерії мають дуже слабке забарвлення за Грамом. Нокардії, родококи та коринебактерії, що добре сприймають забарвлення за Грамом, - грампозитивні.

На підставі властивостей мікобактерій і споріднених таксонів ([додаток 3](#)) та швидкості росту проводиться визначення роду виділеної культури. У споріднених мікроорганізмів відзначається слабка або часткова кислотостійкість, швидкий ріст на простих і яєчних

середовищах, виражене забарвлення за методом Грама і значний поліморфізм у разі мікроскопічного дослідження мазка. Нокардії й родококи не мають важливого клінічного значення і можуть досліджуватися в наукових лабораторіях.

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

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

3. Диференціація *M. tuberculosis complex* від НТМБ має проводитися в лабораторіях II і III рівнів. Культури, віднесені за морфологічними властивостями до *M. tuberculosis complex*, потрібно диференціювати від НТМБ.

У роботі лабораторії трапляються культури, які за морфологічними ознаками не вкладаються в характеристику *M. tuberculosis*, але показують кислотостійкі властивості під час забарвлення мазка. І навпаки: у разі зовнішньої схожості вирощених колоній із колоніями *M. tuberculosis* мікроскопічна картина (дрібні палички, кокобацили) викликають сумніви щодо належності культури до цього виду. У подібних випадках не можна видавати відповіді про виділення *M. tuberculosis* до проведення диференціальної діагностики з НТМБ.

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

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

Бактеріологічна характеристика *M. tuberculosis*:

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

ріст можливий за температури +35-37 °С;

ріст на щільних живильних середовищах можливий не раніше ніж через 3 тижні. Ріст субкультури може з'явитися через 10-14 днів;

відсутність росту на середовищі з 500 мкг/мл саліциловокислим натрієм або 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти (ПНБК), а також із 1 000 мкг/мл тіоацетазону (тібону).

Реактиви:

середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл саліциловокислого натрію - 100 мл (до згортання);

натрій саліциловокислий - 50,0 мг.

4. Для приготування до наважки натрію саліциловокислого 50,0 мг потрібно додати 1,0 мл етилового спирту для дезінфекції, 2,0 мл стерильної дистильованої води та 97,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання). Ретельно розмішати. Середовище із вмістом 500 мкг/мл саліциловокислого натрію розлити в пробірки по 5,0 мл і згортувати за температури +85 °С протягом 30 хв.

Реактиви:

середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл ПНБК - 100 мл (до згортання);

ПНБК - 50,0 мг;

4,0 % розчин NaOH;

10,0 % розчин HCl.

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

M. tuberculosis та *M. bovis* чутливі до тіоацетазону (тіосемікарбазону парацетамінобензальдегіду), тоді як інші мікобактерії, за винятком *M. kansasii*, до нього стійкі.

Реактиви:

тіоацетазон (тібон) - 10,0 мг;

Етиловий спирт 96°.

Готують розчин тіоацетазону з 1 000 мкг/мл препарату. Для цього до наважки 10,0 мг тібону, висипаної у пробірку, додають 1,0 мл етилового спирту і 9,0 мл стерильної дистильованої води. Отримують розведення 1 000 мкг/мл. 1,0 мл цього розведення додають до 99,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена, одержують концентрацію тібону 10,0 мкг/мл і розливають у пробірки по 5,0 мл. Середовище в пробірках згортають у скошеному вигляді за температури 85 °С протягом 30 хв.

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

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

У деяких випадках під час постановки тесту спостерігається почорніння, побуріння середовища із саліциловокислим натрієм без зміни кольору середовища в контролі. Здатність викликати деградацію саліциловокислого натрію є відмінною особливістю *M. fortuitum* і *M. chelonae*.

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

Інгредієнти:

NaCl;

сольова основа середовища Левенштейна-Єнсена;

яєчна суміш середовища Левенштейна-Єнсена.

До сольової основи середовища Левенштейна-Єнсена додають NaCl із розрахунку 5,0 г на 100,0 мл сольової основи (5,0 %). Отриманий розчин стерилізують за температури +121 °С 20 хв. Потім готують середовище, як зазначено в рецепті приготування середовища Левенштейна-Єнсена.

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

На підставі відсутності росту на діагностичних середовищах із саліциловокислим натрієм або ПНБК утворення сформованих непігментованих колоній протягом 3-4 тижнів за температури +37 °С досліджену культуру можна віднести до *M. tuberculosis complex*.

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

Для того, щоб відрізнити *M. tuberculosis* від інших мікобактерій (*M. bovis* і НТМБ), використовують різноманітні біохімічні методи.

Видова ідентифікація *M. tuberculosis complex* має проводитися в усіх лабораторіях II і III рівнів. Найбільш актуальними представниками цього комплексу є *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caneti*.

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

тесту на наявність здатності продукувати нікотинову кислоту;

тесту на наявність нітратредуктазної активності;

тесту визначення здатності росту культури на середовищі з гідразид-тіофен-2-карбоксиловою кислотою (ТСН);

тесту визначення здатності до росту на середовищі з нікотинамідом;

тесту визначення чутливості до циклосерину;

тесту визначення каталазної і пероксидазної активності одночасно;

тесту на наявність термостабільної каталази;

реакції гідролізу твіну-80.

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

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

Зазначений метод визначення ніацину потребує для роботи застосування ціаністого калію, робота з яким має проводитися під витяжною шафою і потребує певних умов, що обмежує широке застосування цього тесту. У зв'язку із цим, на особливу увагу заслуговує метод визначення ніацину паперовими смужками, запропонований Кубика і Кильбурн, у модифікації Бараускене.

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

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

Приготування реактивів:

20,0 % розчин пара-аміносаліцилової кислоти (ПАСК):

у пробірку наливають 1,75 мл 95,0 % спирту, 0,25 мл диметилсульфоксиду (димексиду) і додають 400,0 мг ПАСК. Суміш підігрівають на водяній бані за температури 56 °С протягом 5-10 хв з періодичним струшуванням до повного розчинення ПАСК;

60,0 % розчин роданистого калію:

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

50,0 % розчин хлораміну «Б»:

3,125 г хлораміну «Б» розчиняють у 6,25 мл дистильованої води на водяній бані за температури 56-60 °С зі струшуванням. Гарячий розчин капають на смужки.

Індикаторні смужки готують із фільтрувального паперу Filtrak 11. Один кінець смужки, розміром 60,0 × 8,0 мм, позначають простим олівцем. Пастерівськими піпетками на папір наносять по одній краплі свіжоприготованих реактивів у такому порядку: 20,0 % розчин ПАСК - на позначений олівцем кінець, 60,0 % розчин роданистого калію - посередині смужки і 50,0 % розчин хлораміну «Б» - на інший кінець. Між краплями мають залишатися сухі проміжки. Папірці висушують за кімнатної температури в темряві протягом 24 год, після чого зберігають їх у холодильнику в пробірках, що закриваються, або закритих гумовими корками. Індикаторні смужки залишаються активними протягом трьох місяців. Для одержання більш чіткої реакції рекомендують наносити повторно одну краплю хлораміну «Б» на вже висохлу краплю.

Для тесту використовують 3-4-тижневі життєздатні культури (не менше ніж 50 колоній) у середовищі Левенштейна-Єнсена.

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

Індикаторну смужку поміщають кінцем, поміченим олівцем, до пробірки з 0,6 мл досліджуваного екстракту мікобактерій. Пробірку закривають пробкою та витримують за кімнатної температури, періодично струшуючи, поки вся смужка не просочиться екстрактом. У разі позитивного ніацинового тесту через 15-30 хв рідина забарвлюється в яскраво-жовтий колір. Дегазація пробірки після проведення реакції здійснюється шляхом додавання 10,0 % розчину нашатирного спирту.

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

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

Потрібно пам'ятати, що ряд НТМБ - *M. simiae*, *M. chelonae* і деякі штами *M. marinum* також блокують ніацин. Хромогенні штами НТМБ можуть давати хибнопозитивні реакції.

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

5. Для внутрішнього контролю якості (далі - ВКЯ) як позитивний контроль слід використовувати штам *M. tuberculosis*, а як негативний - *M. bovis*.

ВКЯ ніацинового тесту проводиться щоразу під час проведення тестування. Як позитивний контроль використовують ідентифікований або референс-штам (музейний) *M. tuberculosis*. Як негативний контроль використовують ідентифікований або референс-штам (музейний) НТМБ, наприклад, *M. fortuitum*, або дистильовану воду. Слід переконатися в чистоті дослідних штамів, строго дотримуватися правил зберігання і термінів використання розчинів, реагентів і паперових смужок.

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

Активність нітратредуктази визначається за кількістю відновленого з нітрату нітриту, що дає кольорову реакцію з пара-диметиламінобензальдегідом.

Реактиви:

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

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

10,0 % розчин НСІ.

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

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

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

M. tuberculosis резистентні до ТСН і дають хороший ріст на середовищі з гідразид-тіофен-2-карбоксиліною кислотою. *M. bovis* і *M. bovis*-BCG чутливі до ТСН і не ростуть на середовищі, що містить цю сполуку.

Реактиви:

середовище Левенштейна-Єнсена - 600 мл (до згортання);

гідразид-тіофен-2-карбоксиліної кислоти.

Приготувати наважку ТСН 20,0 мг, розчинити у 20,0 мл стерильної дистильованої води. Одержали розведення 1 000 мкг/мл (розчин А). До 12,0 мл стерильної дистильованої води додати 3,0 мл розчину А. Отримали розведення 200 мкг/мл (розчин Б).

Приготування середовища Левенштейна-Єнсена з ТСН:

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

2) розведення - 195 мл середовища + 5,0 мл розчину Б - розведення 5,0 мкг/мл;

3) контрольна пробірка із середовищем без реактиву.

Досліджуване і контрольне середовище розлити в пробірки по 5,0 мл, згортати за температури 85 °С протягом 30 хв.

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

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

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

Реактиви:

середовище Левенштейна-Єнсена (до згортання);

нікотинамід.

Для приготування основного розчину нікотинаміду потрібно наважку нікотинаміду 1 000 мг розчинити в 10,0 мл стерильної дистильованої води, стерилізувати через бактерійний фільтр або кип'ятінням на водяній бані за температури 100 °С протягом 30 хв.

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

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

Приготування середовища з нікотинамідом:

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

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

одночасно приготувати 100 мл контрольного середовища Левенштейна-Єнсена.

Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортати за температури +85 °С протягом 30 хв.

По 0,2 мл досліджуваної культури в стандартному розведенні засівається на приготовані середовища; інкубація - за температури +37 °С протягом трьох тижнів.

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

Реактиви:

середовище Левенштейна-Єнсена (200 мл до згортання);

циклосерин.

Наважку циклосерину 20,0 мг потрібно розчинити в 5,0 мл дистильованої води, розведення - 4 000 мкг/мл.

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

Одночасно приготувати 100 мл контрольного середовища.

Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортати за температури +85 °С протягом 45 хв.

По 0,2 мл досліджуваної культури в стандартному розведенні засівається на приготовані середовища; інкубація - за температури 37 °С протягом трьох тижнів.

8. *M. tuberculosis* і *M. bovis* чутливі до циклосерину, а вакцинний штам BCG росте на середовищі із циклосерином.

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

9. Принцип каталазної реакції полягає в розщепленні перекису водню ферментом каталази на воду й атомарний кисень, що супроводжується виділенням пухирців кисню та переходом пірогалолу в пурпурогалін за наявності перекису водню під впливом пероксидази.

Реактиви:

0,5 % пірогалол: 50,0 мг чистого пірогалолу розчинити в 10,0 мл дистильованої води;

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

Обидва розчини готують безпосередньо перед дослідом, змішуючи й наливаючи отриману суміш у пробірку так, щоб покрити культуру.

Обидва розчини зливають у колбу в рівній кількості і наливають по 6,0-8,0 мл суміші у пробірку з культурою. Залежно від кількості культур, що перевіряють, об'єм розчинів, які готують, відповідно збільшують.

Облік реакції активності каталази проводять через 5 хв після активного виділення пухирців кисню. Реакцію на пероксидазу враховують через 1,5-2 год після забарвлення колоній у темно-коричневий колір.

Ступінь активності каталази оцінюють за трибальною системою:

(3+) - рясне виділення пухирців кисню в першу хвилину;

(2+) - помірне виділення пухирців кисню;

(1+) - поодинокі пухирці.

За відсутності пухирців реакція вважається негативною (-).

Активність пероксидази також оцінюється за трибальною системою:

(3+) - темно-коричневе забарвлення колоній;

(2+) - коричневе забарвлення колоній;

(1+) - блідо-коричневе забарвлення колоній.

У разі негативної реакції колір колоній не змінюється.

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

Каталаза у кислотостійких мікобактерій різна. У вірулентних мікобактерій вона швидко й легко руйнується під час нагрівання до температури 65-68 °С. У НТМБ і кислотостійких сапрофітів вона термостабільна.

Готують 3,0 мл густої зависі мікобактерій. 1,5 мл зависі переносять до центрифужної пробірки, яку нагрівають на водяній бані за температури +68 °С протягом 10 хв. Потім пробірку охолоджують і наносять на предметне скло по 1 краплі зависі: на один кінець - непрогріту (служить контролем), а на другу - завись після нагрівання. До цих двох зависів додають по 1 краплі пергідролу. Утворення пухирців свідчить про активність ферменту, а відсутність - про пригнічення.

На підставі цієї реакції легко відрізнити *M. tuberculosis*, у яких каталаза завжди термостабільна, від більшості НТМБ і кислотостійких сапрофітів із різко термостабільною каталазою.

Термостабільність каталази, так само як і її активність, оцінюють за трибальною системою.

10. Важливою реакцією для ідентифікації мікобактерій всередині і груп (за Раньоном) є реакція гідролізу твіну-80. Твін-80 зв'язує нейтральний червоний, а суміш до реакції має солом'яно-жовтий колір.

Принцип реакції - в ензимному гідролізі твіну-80. Під час цього відбувається звільнення нейтрального червоного і забарвлення відновлюється від рожевого до червоного.

Позитивна реакція спостерігається у *M. aquae* (на відміну від *M. scrofulaceum*, у яких реакція негативна), а з групи вона позитивна тільки у *M. terrae*.

Реактиви:

1 : 15 М фосфатний буфер (рН-7) - 100,0 мл;

твін-80 - 0,5 мл;

0,1 % основний нейтральний червоний - 2,0 мл.

Краще розчинити 0,1 г нейтраль-рот не в 100,0, а у 85,0 мл дистильованої води.

Змішати усі три реагенти. Розлити по 4,0 мл у пробірки й автоклавувати за температури +120 °С 15 хв. Протягом доби перевіряють на стерильність у термостаті і зберігають у холодильнику. Стабільність розчину - не більше двох тижнів.

Емульгують три бактеріологічні лопатки культури в пробірках із підготованим субстратом (твін-80 із нейтральним червоним). Пробірки поміщають у термостат. Реакцію перевіряють через 4 год на п'яту й десяту добу. Тест вважають позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до десятої доби, а негативним - якщо забарвлення не з'явилося (модифікована методика Вайна). Контролем є пробірка із середовищем без реактивів.

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

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

У випадках, коли ідентифікації не відбулося (один з тестів позитивний, а інший - негативний), слід пересіяти культуру, дочекатися отримання пишного росту й поставити обидва тести знову. Для отримання правильного результату ідентифікації можна додати ще один (третій із перелічених) тест.

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

Культури, що не піддаються ідентифікації в умовах лабораторії протитуберкульозного диспансеру, рекомендують направляти до Центральної референс-лабораторії для проведення поглибленої ідентифікації.

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

Остаточну біохімічну ідентифікацію із застосуванням складних біохімічних досліджень проводять у лабораторіях III рівня.

11. Під час диференціації мікобактерій, крім використання комплексу тестів, застосованих під час вивчення НТМБ культур, потрібно користуватися обов'язковими ключовими тестами для диференціації окремих видів мікобактерій ([додаток 4](#)), проведення яких полегшує ідентифікацію культур.

Для клініки особливе значення мають такі види НТМБ: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*.

Для НТМБ, крім зазначених особливостей (швидкості росту, пігментоутворення, морфології колоній і паличок, температурного оптимуму), характерними є негативна ніацинова проба, відсутність пероксидазної активності в разі високої активності каталази, виражена термостабільність каталази у більшості мікобактерій, ріст на живильних середовищах із ПНБК і саліциловокислим натрієм, відсутність у більшості випадків корд-фактора. Характерною для НТМБ також є первинна стійкість до більшості ПТП. Для диференціації *M. tuberculosis* і *M. bovis* від НТМБ, відмінності їх один від одного, а також для розрізнення НТМБ всередині груп є основні тести для відрізнення *M. tuberculosis*, *M. bovis* від інших мікобактерій ([додаток 5](#)).

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

12. Для забезпечення якості досліджень потрібно регулярно контролювати якість і придатність реактивів та обладнання, правильність реєстрації результатів.

Під час проведення процедур ВКЯ досліджень водночас із діагностичними пробами потрібно тестувати контрольні культури *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* і *M. fortuitum* або *M. gordonae*. У зв'язку із цим потрібно вести музей таких культур.

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

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

M. tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), як відомо, продукують, тобто виділяють в живильне середовище, більше ніж 30 різних білків, де один із переважаючих - МРТ64 (МРВ64). Було встановлено, що НТМБ не продукують цього білка, тому виявлення МРТ64 (МРВ64) у пробі свідчить про належність дослідного штаму до комплексу *M. tuberculosis*.

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

Тест-системи, що базуються на цьому принципі, мають високу специфічність. Такий метод може бути використано для швидкої ідентифікації комплексу *M. tuberculosis*, отриманих із рідких і твердих живильних середовищ.

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

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

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

Внутрішній контроль якості досліджень проводиться щоразу під час проведення тестування.

Як позитивний контроль може бути використано:

музейний штам Н₇Р₆ або клінічний ізолят *M. tuberculosis*;

суспензію 1,0 мкл (еквівалент 1 петлі діаметром 1,0 мм) колоній *M. bovis* BCG в 0,2 мл 10 ммоль/л фосфатно-сольового буфера, що містить 0,1 % твіну-80;

рідку культуру *M. bovis* BCG (McFarland 1 ($3-6 \times 10^7$ КУО/мл), вирощену в рідкому середовищі.

Слід мати на увазі, що деякі штами *M. bovis* BCG (Глахо, пастерівський, тайський) не експресують МРТ64 або МРВ64. Тому тільки бразильський, японський (Токіо), російський, шведський штами *M. bovis* BCG можна використовувати як позитивний контроль.

Як негативний контроль може бути використано:

незасіяне рідке середовище;

10,0 ммоль/л фосфатно-сольового буфера, що містить 0,1 % твіну-80;

будь-яку НТМБ, наприклад, *M. smegmatis* або *M. gordonae*.

14. Диференціацію *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*) й ідентифікацію НТМБ рекомендують проводити з використанням молекулярно-генетичних методів дослідження.

Використання молекулярно-генетичних методів для ідентифікації мікобактерій базується на гібридизації ДНК дослідного штаму зі специфічними для виду мікобактерій ДНК-зондами. Застосування молекулярно-генетичних методів дозволяє проводити ідентифікацію мікобактерій упродовж декількох робочих днів.

14. Найбільш ефективними визнано молекулярно-генетичні методи, що базуються на гібридизації з ДНК-зондами (Line Probe Assay, LPA), зокрема GenoType Mycobacterium CM/AS, GenoType MTBC, INNO-LiPA Mycobacteria. Технологія проведення досліджень із використанням цих методів включає такі етапи:

виділення ДНК з культур мікобактерій;

ПЛР для ампліфікації фрагментів генів мікобактерій;

гібридизацію ПЛР-продуктів із ДНК-зондами, які іммобілізовані на смужці;

візуалізацію результатів гібридизації (при цьому визначається належність мікобактерій до певного виду).

Тест GenoType Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) ґрунтується на технології DNA-STRIP, що дає змогу ідентифікувати такі види мікобактерій: *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, комплекс *M. tuberculosis* та *M. xenopi*.

Процедура проведення тесту складається з таких етапів:

виділення ДНК із культур, що виростили на щільному або рідкому поживному середовищі;

мультиплексна ампліфікація з біотинильованими праймерами;

реверс-гібридизація.

Гібридизація охоплює такі етапи:

хімічна денатурація продуктів ампліфікації;

гібридизація одноланцюгових ампліконів, які помічені біотином, на мембранозв'язаних зондах;

ретельне промивання;

додавання кон'югату стрептавідину / лужної фосфатази (реакція забарвлення).

Вихідним матеріалом для тесту виділення ДНК можуть бути бактерії, які виростили на щільному живильному середовищі (наприклад, Левенштейна-Єнсена) або на рідкому середовищі (наприклад, у системі ВАСТЕС).

Тест не підходить для детекції мікобактерій із прямого матеріалу пацієнтів.

Методика виконання:

під час роботи з бактеріями, які виростили на щільному середовищі, потрібно зняти колонії аплікатором і перенести їх до 300 мкл деіонізованої води до пробірки з кришкою, що загвинчується;

під час роботи з бактеріями, які вирости в рідкому середовищі, потрібно відібрати 1 мл, центрифугувати протягом 15 хв за 10 000 g у центрифугу з аерозоль-непроникним ротором. Супернатант злити, а осад із бактеріями ресуспендувати на вортексі в 300 мкл деіонізованої води в пробірці з кришкою, що загвинчується;

інкубувати пробірки з бактеріями на водяній бані 20 хв за температури +95 °С;

обробляти пробу в ультразвуковій бані протягом 15 хв;

центрифугувати пробу на максимальній швидкості 5 хв, а для ПЛР використовувати 5,0 мкл супернатанту. Якщо передбачається більш тривале зберігання, розчин ДНК потрібно перенести до нової пробірки.

Можна використовувати інші методи виділення ДНК, які дають змогу отримати з бактерій ДНК для ампліфікації.

Готувати ампліфікаційну суміш (по 45,0 мкл) потрібно в чистій від ДНК кімнаті. Зразки ДНК треба вносити до пробірки із сумішшю також в окремому приміщенні.

Мікс на одну пробірку:

35,0 мкл PNM;

5,0 мкл 10-кратного полімеразного буфера для інкубації;

x мкл розчину MgCl₂;

1-2 одиниці термостабільної ДНК-полімерази;

у мкл води для доведення об'єму до 45,0 мкл;

для отримання кінцевого об'єму 50,0 мкл додати 5,0 мкл розчину ДНК (20,0-100 нг ДНК).

Залежно від системи фермент/буфер, що використовується, оптимальна концентрація MgCl₂ може коливатися між 1,5 та 2,5 мМ (деякі інкубаційні буфери вже містять MgCl₂).

Під час використання HotStar ДНК-полімерази від Qiagen для одного зразка потрібно взяти такі реагенти:

35,0 мкл PNM;

5,0 мкл 10-кратного ПЛР буфера для HotStar Tag (містить 15 мМ MgCl₂);

2,0 мкл 25 мМ розчину MgCl₂;

0,2 мкл (1,0 од) HotStar Tag;

3,0 мкл води (для молекулярно-біологічних досліджень);

5,0 мкл розчину ДНК.

Кінцева концентрація MgCl₂ у цій ампліфікаційній суміші становить 2,5 мМ.

Визначають кількість зразків для ампліфікації (кількість дослідних проб + контрольні зразки). Проба контролю контамінації (негативний контроль) містить 5,0 мкл води замість розчину ДНК. Підготовляють мастер-мікс, що містить усі реагенти, за винятком розчину ДНК, і добре перемішують (не на вортексі!).

Аліквотують по 45 мкл до кожної підготовленої ПЛР-пробірки.

Програма ампліфікації:

15 хв 95 °С 1 цикл

30 с 95 °С } 10 циклів

2 хв 58 °С }

25 с 95 °C }

40 с 53 °C } 20 циклів

40 с 70 °C }

8 хв 70 °C 1 цикл

Продукти ампліфікації можуть зберігатися за температури від +8 °C до +20 °C.

Процедура виконання гібридизації:

попередньо нагріти водяну баню із шейкером/TwinCubator до температури 45 °C, до максимально допустиме відхилення від заданої температури ± 1 °C. Попередньо підігріти розчин НУВ та STR до температури 37-45 °C перед використанням. Реагенти мають бути вільні від осаду. Нагріти всі інші реагенти, за винятком CON-C та SUB-C, до кімнатної температури. За допомогою відповідного дозуючого приладдя розчинити концентрат кон'юганта (CON-C, помаранчевий) та концентрат субстрату (SUB-C, жовтий) у співвідношенні 1 : 100 у відповідних буферах (CON-C у CON-D та SUB-C у SUB-D) у потрібній кількості. Добре перемішати та довести до кімнатної температури. Із розрахунку на кожну смужку додати 10 мкл концентрату до 1 мл відповідного буфера. Розводити CON-C потрібно перед кожним використанням. Розчинений SUB-D можна зберігати протягом чотирьох тижнів за кімнатної температури в захищеному від світла місці;

розлити по 20,0 мкл розчину для денатурації (DEN, блакитного кольору) в куток кожної лунки;

додати 20,0 мкл продукту ампліфікації, перемішати піпетуванням та інкубувати 5 хв за кімнатної температури;

витягти смужку з пробірки за допомогою пінцета та помітити її олівцем на зворотному боці в забарвленому місці. Під час роботи зі смужками завжди використовувати рукавички;

обережно додати до кожної лунки 1,0 мл попередньо нагрітого буфера для гібридизації (НУВ, зелений). Перемішати лоток до отримання гомогенного забарвлення. Потрібно дотримуватись обережності, щоб не пролити розчин у сусідні лунки;

помістити смужки до лунки. Смужки мають бути повністю занурені в розчин та розміщені лицьовим боком (можуть бути розрізнені за кольоровим маркером на нижньому краї) угору. Перегорнути стрічку, якщо зайняла хибне положення під час занурення, за допомогою пінцета. Потрібно обережно промивати пінцет після кожної операції для запобігання забрудненню. Це правило має бути обов'язковим для всіх наступних кроків;

помістити плашку на віброуючу водяну баню для перемішування/ TwinCubator та інкубувати 30 хв за температури 45 °C. Довести частоту вібрації у водяній бані до потрібного постійного та ретельного перемішування. Для досягнення відповідного передання тепла плашка має бути занурена у воду щонайменше на третину товщини;

повністю видалити буфер для гібридизації. Наприклад, використовуючи пастерівські піпетки, що під'єднані до вакуумного насоса;

додати 1,0 мл буфера для жорсткої відмивки (STR, червоний) до кожної лунки та інкубувати 15 хв за температури 45 °C у водяній бані із шейкером/ TwinCubator;

працювати за кімнатної температури у всіх наступних кроках.

Повністю видалити буфер для жорсткої відмивки.

Вилити відмиваючий буфер до широкого контейнера та видалити всі остаточні рідини способом перегортання плашки та обережним промокуванням її адсорбуючим папером. Ця процедура застосовується для всіх інших стадій промивання:

промити кожну смужку один раз із 1,0 мл відмиваючого розчину (RIN) на віброуючій платформі/ TwinCubator (вилити RIN після інкубації);

додати 1,0 мл розчиненого кон'юганта (див. вище) до кожної смужки та інкубувати 30 хв на віброуючій платформі/TwinCubator;

видалити розчин та промити кожну смужку двічі протягом 1 хв у відмиваючому розчині та 1 хв у дистильованій воді (тобто струменем із пластикової пляшки) на віброуючій платформі/TwinCubator (видаляти розчин кожного разу). Переконайтеся, що видалено будь-які залишки води після останнього промивання;

додати 1,0 мл розведеного субстрату (див. вище) до кожної смужки та інкубувати в захищених від світла умовах без вібрації.

Залежно від умов тестування (кімнатної температури) час інкубації субстрату може змінюватися від 3 хв до 15 хв. Збільшений час інкубації субстрату призведе до збільшення фонового сигналу та може вплинути на інтерпретацію результатів;

зупиняти реакцію швидким подвійним відмиванням дистильованою водою;

за допомогою пінцета дістати смужки з плашки та висушити їх між двох шарів адсорбуючого паперу.

Для оцінки та інтерпретації результатів смужки потрібно наклеїти на бланк-шаблон і зберігати в захищеному від світла місці. Еталон для оцінки додається до набору.

15. Дозволяється зберігати культури мікобактерій за температури 2-8 °C на щільних живильних середовищах упродовж одного року або за кімнатної температури (не вище ніж 20 °C) у темному провітрюваному місці до шести місяців.

Зберігати культури в рідкому живильному середовищі дозволяється довше ніж один місяць за температури 2-8 °C.

Клінічні ізоляти й референс-штами для контролю якості мають бути збережені/заархівовані в належних умовах для забезпечення життєздатності й специфічних характеристик штаму. Щоб уникнути багатократного субкультивування, що може спричинити генетичні зміни, які призводять до зміни фенотипічних і біологічних характеристик штаму, доцільно заморожувати культури мікобактерій, що можуть зберігатися в таких умовах упродовж декількох років (-20 °C) або десятиліть (-70 °C). Слід мати на увазі, що життєздатність *M. tuberculosis* знижується набагато швидше за температури -20 °C, ніж за температури -70 °C, а також те, що велика щільність замороженої суспензії сприяє підтриманню життєздатності культури мікобактерій. Штами для контролю якості бажано зберігати за температури -70 °C і використовувати їх упродовж одного року, оскільки після закінчення цього терміну життєздатність може значно знизитися.

Використовують один із таких варіантів середовища для заморожування:

10,0 % розчин молока, стерилізований за температури 110 °C упродовж 10 хв (можливе використання сухого молока або комерційного реагенту Skimmed Milk Powder);

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

5,0 % гліцерин у 0,9 % розчині NaCl, стерилізований за температури 110 °C упродовж 10 хв.

Використовують тільки свіжі культури мікобактерій, що виростили на щільному яєчному середовищі. Якщо культура є старою (більше трьох тижнів), її пересівають на свіже середовище й культивують за температури 37 °C. Як тільки спостерігається хороший ріст, цю культуру використовують для заморожування.

Бактеріологічною петлею знімають максимально можливу кількість колоній, намагаючись не захоплювати живильного середовища, і вносять їх до кріопробірки, що містить 1,5 мл одного з вищезазначених середовищ.

Пробірки маркують із зазначенням дати приготування суспензії, вносячи запис до журналу.

VII. Бактеріологічна ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій

1. До НТМБ належать усі культури, що дали ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена із саліциловокислим натрієм або на середовищі з ПНБК, і підлягають ідентифікації до виду.

Первинна ідентифікація заснована на морфологічних і фенотипічних властивостях мікобактерій. Знання видової належності мікобактерій визначає подальшу тактику лікаря. Наприклад, однократне виділення з діагностичного матеріалу патогенних мікобактерій потребує повторного бактеріологічного обстеження хворого. Часті знахідки в матеріалі від хворих сапрофітних мікобактерій, широко поширених у природі, особливо *M. goodii*, можуть вказувати на контамінацію матеріалу під час забору, на забруднення водопровідної чи дистильованої води.

Остаточна ідентифікація ґрунтується на поглибленому вивченні біохімічних властивостей і культуральних потреб мікобактерій.

Первинна ідентифікація ґрунтується на таких ознаках, як:

швидкість росту;

здатність до утворення пігменту;

здатність до росту за різних температур.

Для виявлення цих ознак не потрібно спеціального обладнання й реактивів, тому їх можна вивчати в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ. Рекомендовано мати додатковий термостат із температурою 45 °С.

Швидкість росту мікобактерій - це час, потрібний для формування видимих зрілих колоній на щільному середовищі.

2. Мікобактерії, які формують такі колонії протягом 7 днів, називаються швидкозростаючими. До групи швидкозростаючих мікобактерій належать *M. fortuitum* і *M. chelonae*, для повного росту яких потрібно не більше ніж 5 діб. Однак, під час виділення з патологічного матеріалу швидкозростаючі мікобактерії можуть мати триваліший період росту.

Мікобактерії, яким для формування колоній потрібний триваліший період часу, називаються повільнозростаючими. До них належать *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* та ін. Тоді як, надлишок посівного матеріалу може бути причиною швидкої появи росту повільнозростаючих мікобактерій. Крім того, облік швидкості росту потрібно проводити із часу утворення сформованих колоній, а не за появою ініціального росту. Швидкість росту мікобактерій оцінюють за швидкістю росту субкультури.

Методика виконання:

0,1 мл суспензії досліджуваної культури в стандартному розведенні засівають на середовище Левенштейна-Єнсена, інкубують за температури 37 °С. Спостереження за культурою перші 5-7 діб щоденне, далі - щотижня, до моменту появи сформованих колоній.

За швидкістю росту культури можна спостерігати під час визначення чутливості мікобактерій до ПТП. Враховувати результати чутливості швидкозростаючих мікобактерій до ПТП можна через 5-7 діб, повільнозростаючих - через 21 добу.

Для визначення здатності до росту за різних температур застосовують таку методику виконання:

приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5;

розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду);

засіяти по 0,2 мл суспензії у 4 пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена;

інкубувати засіяні пробірки за температури 22, 28, 37 і 45 °С.

3. Майже всі види НТМБ добре ростуть за температури 22 °С. За температури 45 °С ростуть 86,0 % культур *M. avium* і всі культури *M. xenopi*.

Колонії НТМБ можуть мати забарвлення від кремового до інтенсивного жовто-помаранчевого. Залежно від забарвлення колоній і здатності утворення пігменту під дією світла НТМБ розподіляються на 3 групи:

фотохромогенні мікобактерії. Продукують жовтий пігмент тільки під дією світла, а в темряві вони мають кремовий колір. Типовим представником цієї групи є *M. kansasii*;

скотохромогенні мікобактерії. Продукують пігмент від інтенсивно жовтого до помаранчевого кольору під час росту як при світлі, так і в темряві. До них належать *M. gordonae* і *M. xenopi*;

нехромогенні мікобактерії. Не утворюють пігменту, а їх колонії мають тільки білуваті або кремові відтінки. До цієї групи належать *M. avium*, *M. malmoense*, *M. terrae complex* тощо. Серед них зустрічаються культури, які змінюють забарвлення у процесі старіння або за несприятливих умов росту (22 °С).

Методика визначення фотохромогенних властивостей мікобактерій:

приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5;

розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду);

засіяти по 0,2 мл суспензії у 2 пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена. Загорнути обидві пробірки в алюмінієву фольгу (для захисту від дії світла в термостаті);

інкубувати за температури 37 °С;

через 8-10 діб з'являється ініціальний ріст культури. Взяти одну з пробірок, звільнити від фольги й помістити на 2 год під яскраве сонячне чи електричне світло. Після закінчення дії світла пробірку помаркувати написом «світло» й продовжити інкубацію в термостаті за температури 37 °С;

через 1-2 доби перевіряти забарвлення культури. Якщо під впливом світла культура в пробірці «світло» набула жовтого забарвлення, а в контрольній пробірці залишилася кремовою, то це фотохромогенна культура.

На підставі застосування найпростіших бактеріологічних методів, що дають змогу виявити специфічні ознаки НТМБ, а також використовуючи зазначені вище саліцилатний тест і визначення нітратредуктази, можна провести первинну ідентифікацію мікобактерій ([додаток 6](#)).

Наприклад, якщо швидкозростаюча мікобактерія має позитивний результат стосовно деградації саліциловокислого натрію, це може бути *M. fortuitum* або *M. chelonae*.

Слід визначити наявність нітратредуктази: позитивна реакція у *M. fortuitum*, негативна - у *M. chelonae*.

За здатністю росту за температури 45 °С можна розрізнити предстаників *M. avium* (ростуть) і представників *M. terrae complex* (не ростуть).

Таким чином, на підставі знання кількох властивостей мікобактерій можна провести первинну ідентифікацію. Для остаточної ідентифікації виділені культури направляють до лабораторії вищого рівня.

Остаточна ідентифікація із застосуванням складних біохімічних досліджень проводиться у лабораторіях III рівня. Ідентифікація проводиться на підставі визначення активності ферментів (амідази, арилсульфатази, каталази), толерантності до різних хімічних агентів, здатності до гідролізу Твіну 80, відновлення нітратів і телуриту калію, засвоєння заліза, росту на середовищі з хлоридом натрію.

Результати первинних досліджень мікобактерій дають змогу вибрати біохімічні тести, потрібні для остаточної ідентифікації НТМБ.

VIII. Дослідження за визначенням медикаментозної чутливості мікобактерій туберкульозу

1. Для дослідження медикаментозної чутливості (далі - МЧ) мікобактерій до ПТП потрібно дотримуватись певних стандартів досліджень. Дослідження МЧ *M. tuberculosis* потрібно проводити в ШББ другого класу, які забезпечують не тільки захист оператора, але й збереження від контамінації біологічного об'єкта.

У разі отримання від хворого культур *M. tuberculosis* з різного дослідного матеріалу (мокротиння, лаважної рідини, сечі, гною, біопсії, післяопераційного матеріалу тощо) потрібно досліджувати кожний виділений штам.

У разі одночасного отримання від хворого двох і більше культур *M. tuberculosis* з однорідного діагностичного матеріалу достатньо досліджувати один штам, який отримано з одного зразка дослідного матеріалу.

У разі незначного росту культури (1-2 колонії в пробірці) потрібно зібрати бактеріальну масу з різних пробірок однорідного дослідного матеріалу та здійснювати визначення МЧ.

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

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

Істотно впливають на стабільність ПТП умови їх стерилізації та зберігання.

Багато ПТП є солями, тобто біологічно активні субстанції є тільки частиною загальної маси молекули, тоді як інші радикали (наприклад, сульфати, гідрохлориди тощо) можуть становити значну частку загальної маси. У зв'язку із цим, під час приготування живильних середовищ із препаратами потрібно враховувати кількість активної речовини й молекулярну формулу препарату.

Для визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП застосовується середовище Левенштейна-Єнсена. Це середовище рекомендують до використання всі мікробіологічні лабораторії ПТС України для отримання порівняних результатів. Дотримання стандартної технології приготування живильного середовища з препаратами має найважливіше значення для отримання достовірних результатів тестування. Як уже зазначалося, для приготування живильних середовищ із метою визначення чутливості *M. tuberculosis* до ПТП мають використовуватися тільки ХЧ субстанції препаратів. Під час приготування робочих розчинів

із потрібними концентраціями активної субстанції розрахунки розміру наважки слід проводити з урахуванням відсотка активності препарату, яка може варіювати від серії до серії.

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

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

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

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

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

правильно вести лікування пацієнтів;

інтерпретувати й порівнювати дані, одержані з різних джерел;

проводити оцінення рівнів МС *M. tuberculosis* до ПТП, а також тенденцій, які спостерігаються в різних регіонах або країнах.

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

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

Усі наявні методи визначення МЧ *M. tuberculosis* можна умовно розділити на дві категорії:

методи прямого визначення МЧ *M. Tuberculosis*;

методи непрямого визначення МЧ *M. tuberculosis*.

Під час використання методів прямого визначення МЧ *M. tuberculosis*, мокротиння чи інші клінічні матеріали, що заздалегідь знезаражені й гомогенізовані, висіваються

безпосередньо на середовища, що містять відповідний препарат. Кількість інокуляту визначається залежно від кількості КСБ, отриманої під час мікроскопії мазка.

Методи прямого визначення МЧ мають низку недоліків:

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

під час проведення цього дослідження підвищується ризик контамінації;

може спостерігатися недостатній ріст культури, що не дозволяє зробити достовірних висновків;

неможливість стандартизувати методику.

У разі використання методів непрямого визначення МЧ *M. tuberculosis* проводиться виділення мікроорганізмів з клінічних зразків під час культивування, а потім на середовище, що містить препарат, висівається гомогенна суспензія або культура, що виросла на бульйоні.

3. Модифікований метод Канетті широко застосовується в усьому світі, є коректним, інформативним і точним.

Принцип методу полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими й стійкими особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на ТБ, до ПТП у «критичних» концентраціях. «Критична» концентрація - один із критеріїв резистентності. Це чітко визначена кількість кожного медикаментозного препарату, яку має містити середовище для постановки ТМЧ. «Критична» пропорція - також один із критеріїв стійкості - відсоток стійких особин у бактеріальній популяції, за якого або вище якого штам вважається стійким до певного медикаментозного препарату. Якщо кількість стійких особин до якогось антибактеріального препарату в популяції буде меншою, ніж 1,0 %, такий штам вважається чутливим до цього препарату. Якщо стійкість особин у популяції більша, ніж 1,0 %, - штам вважається стійким до цього препарату.

Наразі в усьому світі застосовують модифікований метод пропорцій із двома контролями.

Переваги методу пропорцій:

завдяки постійному візуальному контролю за ростом та розподілом бактеріальної популяції у двох контрольних пробірках, підрахунку кількості колоній, що виросли, можна більш об'єктивно оцінити результати резистентності в пробірках із препаратами;

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

Середовища для дослідження МЧ *M. tuberculosis* до ПТП мають містити точні «критичні» концентрації антибактеріальних препаратів, які відповідають їх активності. Тому під час приготування розчинів препаратів потрібно враховувати їх антибактеріальну активність. Показники антибактеріальної активності має бути зазначено в паспорті до препарату.

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

Під час зберігання розведених препаратів за температури $+5$ °С і вище довше ніж 6 год може відбутися зниження їх активності. Тому розчини потрібно готувати безпосередньо перед приготуванням середовищ. У лабораторіях, де є морозильні камери, що підтримують температуру нижче ніж -20 °С, можна зберігати розведені препарати протягом шести місяців за умови недопущення їх відтанення й повторного заморожування. Така технологія дає певні переваги: приготування більшого об'єму розчину дозволяє зважувати велику наважку препарату, що, відповідно, зменшує похибку зважування, а також втрату речовини під час

зважування. У разі заморожування розчину препарату він має бути розлитий по кріопробірках в об'ємі, потрібному для додавання в одну порцію середовища.

Для дослідження МЧ *M. tuberculosis* до ПТП методом пропорцій застосовують щільне яєчне середовище Левенштейна-Єнсена. Після додавання препарату до середовища потрібно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни, щоб забезпечити рівномірний розподіл препарату в середовищі. Згортання середовища з препаратом має проводитися в тих самих умовах, що й середовища без препарату. Коагуляцію проводять за температури +85 °С протягом 30 хв.

Відбір препаратів, для яких визначається МЧ виділених штамів *M. Tuberculosis*, залежить від категорії захворювання, випадку та профілю МС *M. tuberculosis*, отриманого під час попередніх досліджень, якщо їх проводили.

4. Для приготування розведень протитуберкульозних препаратів використовують ХЧ субстанції препаратів.

Схема процедур:

ізоніазид (H) - 0,2 мкг/мл;

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення). Під час приготування наважки кожного з препаратів I та II ряду потрібно враховувати потенцію ПТП, яка залежить від фірми-виробника й хімічного складу ХЧ субстанції препарату. Щоразу потрібно робити відповідне перерахування на вміст активної речовини ХЧ субстанції препаратів;

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100,0 мкг/мл (третє розведення);

1,0 мл третього розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 10,0 мкг/мл (четверте розведення);

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

Рифампіцин (R) - 40,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 2,0 мл етилового спирту + 8,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл;

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

Етамбутол (E) - 2,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл;

1,0 мл другого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл (третє розведення);

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

Стрептоміцин (S) - 4,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 200 мкг/мл (третє розведення);

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

Амікацин (Am) - 30,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

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

Канаміцин (Km) - 30,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

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

Капреоміцин (Cm) - 40,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

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

Етіонамід (Et) - 40,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 2,0 мл димексиду (DMSO) + 8,0 мл дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

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

Протіонамід (Pt) - 40,0 мкг/мл:

50,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл димексиду (DMSO) + 8,0 мл дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

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

Левовфлоксацин (Lfx) - 2,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл (третє розведення);

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

Моксифлоксацин (Mfx) - 1,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH** = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл (третє розведення);

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

ПАСК (Pas) - 1,0 мкг/мл:

100,0 мг активної речовини ХЧ субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 10 000 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 1 000 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 100,0 мкг/мл (третє розведення);

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

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

Готують гомогенну бактеріальну суспензію культури *M. tuberculosis* в ізотонічному розчині натрію хлориду. Для цього культура, що виросла на щільному живильному середовищі Левенштейна-Єнсена, знімається тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду. При цьому тампон має торкатися всієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють у пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, культуру змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишають на 30 хв за кімнатної температури для осадження крупних часточок культури.

Суспензію культури стандартизують за бактеріальним стандартом мутності МакФарланда (1 McF) ([додаток 7](#)).

Як стандарт мутності МакФарланда застосовують суспензію слабозрочинної у воді солі сульфату барію. Для її приготування використовують такі два розчини: BaCl₂ × 2H₂O - 1,0 % розчин і H₂SO₄ - 1,0 % розчин.

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

Стабільність стандарту МакФарланда - шість місяців за зберігання в темряві.

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

Процедура приготування суспензії ([додаток 8](#)) призводить до утворення інфекційного аерозолю. Вона має проводитися тільки з використанням товстостінних (переважно боросилікатних) пробірок без видимих пошкоджень. Процедура має проводитися в ШББ другого класу.

Із розведення 10^{-2} вносимо по 0,1 мл бактеріальної суміші до одного з двох контролів (K_1) і до всіх пробірок із препаратами. Кінцева концентрація бактеріальної суміші в пробірках, що засіяні, дорівнює 10^{-3} .

Із розведення 10^{-4} вносимо по 0,1 мл бактеріальної суміші до другого контролю (K_2). У пробірках із середовищем кінцева концентрація бактеріальної суспензії дорівнює 10^{-5} .

Після закінчення посіву засіяні пробірки переміщують у горизонтальні штативи і поміщають для інкубації в термостат за температури 37°C . При цьому поверхня скосу живильного середовища має знаходитися у горизонтальній площині, а нахил штатива має виключити торкання пробки з матеріалом посіву. Суспензія, що засівається, має рівномірно покривати всю поверхню скосу середовища.

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

Посіви переглядають щотижня. За наявності росту в контрольних пробірках через чотири тижні після посіву (щонайменше - шість тижнів) реєструють отримані результати. Кількість колоній, що виростили в контрольній пробірці K_1 (вихідне розведення мікробної суспензії - 1 : 100), приймається за 100 %; кількість колоній, що виростили в K_2 , відповідає 1,0 % усіх бактерій популяції.

Якщо в контрольних пробірках K_1 і K_2 під час посіву досліджуваного штаму *M. tuberculosis* спостерігається ріст відповідно до вищезазначених пропорцій (100 : 1), можна робити облік результатів стійкості в пробірках із препаратами. Інтенсивність росту в контролях і в пробірках із препаратами оцінюють:

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

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

Дослідження потрібно повторити, якщо:

немає пропорційності росту між K_1 і K_2 ;

відсутній ріст у K_1 і K_2 або в одній із контрольних пробірок;

K_1 , K_2 або один із них забруднено;

забруднено пробірки з препаратами.

5. Суть методу визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів непрямим методом абсолютних концентрацій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена полягає в тому, що здійснюють дозований посів ретельно підготовленої мікобактеріальної суспензії з культури *M. tuberculosis* в пробірки із живильним середовищем Левенштейна-Єнсена, що містить певні концентрації ПТП і контрольні пробірки без препаратів. Зазвичай використовується «критична» концентрація препаратів, яка є

критерієм стійкості, пригнічує ріст всіх або майже всіх мікобактерій, що визначається як наявність 20 або менше колоній збудника та дає можливість визначити культуру *M. tuberculosis* як чутливу або стійку до цього ПТП.

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

Середовища, що входять до набору для тестування першого штаму, мають готуватися з однієї партії середовища Левенштейна-Єнсена в один день.

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

Приготування живильних середовищ із препаратами та розведення здійснюють так само, як під час визначення МЧ мікобактерій за методом пропорцій.

Готують гомогенну бактеріальну суспензію в ізотонічному розчині натрію хлориду. Для цього культура, що виросла на твердому живильному середовищі Левенштейна-Єнсена, знімається тампоном, попередньо змоченим у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду. При цьому тампон має торкатися всієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють у пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, культуру змивають у рідину, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишають на 30 хв за кімнатної температури для осадження крупних часточок культури.

Суспензію культури стандартизують за бактеріальним стандартом мутності (1 McF). Для цього суспензію (без осаду) обережно, не торкаючись дна пробірки, відсмоктують піпеткою до іншої пробірки з ізотонічним розчином натрію хлориду.

Із цієї суспензії готують таке розведення:

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

Із суспензії з мутністю 1 McF вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші до контролю (K_1). Із розведення 10^{-1} вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші до всіх пробірок із препаратами. Кожну пробірку із засіяною суспензією закривають кришками, що загвинчуються, і ставлять у вертикальний штатив, щоб за час досліду суспензія рівномірно стікала по поверхні косяка середовища до дна пробірки.

Після закінчення посіву всіх суспензій засіяні пробірки переміщують у горизонтальні штативи і поміщають для інкубації в термостат за температури 37 °С. При цьому поверхня косяка живильного середовища має знаходитися в горизонтальній площині, а нахил штатива має виключати торкання пробки до матеріалу засіву. Суспензія, що засівається, має рівномірно покривати всю поверхню косяка середовища.

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

Оцінення результатів визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП проводять через три тижні інкубації в термостаті. У разі поганого росту МБТ на контрольному живильному середовищі слід почекати ще 1-2 тижні до отримання вираженого росту в контролі, після чого видається остаточна відповідь.

Під час використання методу абсолютних концентрацій культура *M. tuberculosis* вважається стійкою, якщо на живильному середовищі з певним препаратом виростає 20 і більше колоній мікроорганізмів у разі рясного росту в контрольній пробірці (без препарату).

6. Загальнодоступні методи визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП I ряду досконало вивчено. При цьому було досягнуто консенсусу щодо відповідних методологій, «критичних» концентрацій препаратів та достовірності й відтворюваності результатів тестування. З іншого боку, у результаті проведення вибіркового обстежень діючої практики стосовно МЧ до ПТП II ряду було виявлено істотні відмінності щодо методів тестування, «критичних» концентрацій препаратів і гранично допустимих пропорцій для виявлення резистентності. На цій підставі достовірність досліджень МЧ до ПТП II ряду було поставлено під сумнів і стала очевидною крайня потреба у стандартизації методів, встановленні критеріїв визначення резистентності та проведенні професійного тестування.

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

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

Набір MGIT 960 SIRE Kit містить чотири флакони з основними ПТП і вісім флаконів зі збагачувальною рідиною. «Критичні» (низькі) концентрації препаратів досягаються в живильному бульйоні після розведення. Для цього до кожного флакона з ліофілізованим препаратом додають 4,0 мл стерильної дистильованої або деіонізованої води, а потім 100 мкл переносять із нього до пробірки MGIT з бульйоном. Інші набори дають можливість проводити тестування за наявності високих концентрацій ПТП. Для отримання високої концентрації медикаментозних препаратів, відповідно до інструкції, до кожного флакона, що містить ліофілізований препарат, потрібно додати 2,0 мл стерильної дистильованої або дейонізованої води.

Для визначення МЧ мікобактерій до Z як контроль використовують спеціальні пробірки MGIT із рН = 5,9. До набору ВАСТЕС MGIT 960 PZA входять два флакони з ліофілізованим Z і шість флаконів живильної добавки. Перед використанням до флакона ВАСТЕС MGIT 960 PZA, що містить ліофілізований препарат, слід додати 2,5 мл дистильованої/дейонізованої води, щоб одержати розчин, що містить 8 000 мкг/мл Z. Потім 100 мкл одержаного розчину переносять до пробірки MGIT (рН = 5,9) для досягнення «критичної» концентрації Z у бульйоні. Тривалість тестування становить 4-20 діб.

Визначення МЧ виділених культур *M. tuberculosis* у вперше захворівших та хворих на рецидив ТБ легень потрібно обов'язково проводити до S, H, E, R і Z. За наявності МС до цих препаратів або до H та R рекомендують проведення ТМЧ до Et, Pt, Cm, Lfx, Am, Km, Mfx, Ofx, лінезоліду (Lzd), клофазиміну (Cfz), бедаквіліну (Bdq) і деламаніду (Dlm).

7. У хворих із повторним курсом лікування (невдале лікування та лікування після перерви) і хворих із хронічним перебігом ТБ потрібно проводити визначення МЧ *M. tuberculosis* до всіх препаратів одразу з урахуванням результатів попередніх досліджень.

ТМЧ у системі MGIT мають проводитися за такою схемою:

позитивний результат у системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Культура MGIT → ТМЧ MGIT:

позитивний результат у системі MGIT + негативний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Культура MGIT → ТМЧ MGIT:

негативний результат у системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.

Культура Левенштейна-Єнсена → ТМЧ MGIT.

Розчинення препаратів першого ряду і підготовка пробірок із рідким середовищем для постановки ТМЧ ([додаток 9](#)) процедури здійснюють у ШББ.

8. Стандартні концентрації препаратів для використання в системі BACTEC MGIT (мкг/мл): S - 1,0; H - 0,1; R - 1,0; E - 5,0; Z - 100,0.

Схема процедур:

розчинити препарати (постачаються ліофілізованими у флаконах) шляхом додавання 4,0 мл стерильної дистильованої води до флаконів із S, H, R і E та 2,5 мл до флакона із Z;

промаркувати пробірки, зазначаючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки;

для постановки одного ТМЧ мікобактерій до препаратів I ряду потрібно підготувати сім пробірок: 1 пробірка - контроль SIRE, 1 пробірка - контроль Z, 5 пробірок із препаратами;

за допомогою піпетки-дозатора зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок до пробірок із препаратами й до контрольних пробірок (добавку PZA - до пробірки із Z і до Z контролю, добавку SIRE - до пробірок із S, H, R, E і до SIRE контролю);

за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (S, H, R, E і Z - до відповідних маркованих пробірок MGIT);

не додавати препаратів до пробірок, які буде використано для контролю росту мікобактерій.

9. Стандартні концентрації препаратів II ряду для використання в системі BACTEC MGIT 960 (мкг/мл): Lfx - 1,0; Mfx - 0,25 і 1,0; Ofx - 2,0; Am - 1,0; Km - 2,5; Cm - 2,5; Et - 5,0; Pt - 2,5; Lzd - 1,0; Cfz - 1,0; Bdq - 1,0; Dlm - 0,06.

Розчинення препаратів другого ряду і підготовка пробірок із рідким середовищем для постановки ТМЧ ([додаток 10](#)) процедури здійснюють у ШББ.

Розведення протитуберкульозних препаратів готують із ХЧ субстанцій препаратів II ряду з використанням стерильної дистильованої води чи інших розчинників.

Схема процедур:

Левофлоксацин (Lfx) - 1,0 мкг/мл:

8,4 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH = 840 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл (друге розведення);

внести 0,1 мл другого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) - 1,0 мкг/мл:

16,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH = 1 680 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,0 мкг/мл (друге розведення);

2,0 мл другого розведення + 2,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл (третє розведення);

внести 0,1 мл третього розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Моксифлоксацин (Mfx) - 0,25 мкг/мл:

Для приготування концентрації Mfx 0,25 мкг/мл використовуємо третє розведення, що було нами отримано під час приготування концентрації 1,0 мкг/мл (див. вище);

1,0 мл третього розведення з концентрацією Mfx 84,0 мкг/мл + 3,0 мл стерильної дистильованої води = 21,0 мкг/мл;

внести 0,1 мл розведення 21,0 мкг/мл до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 0,25 мкг/мл.

Амікацин (Am) - 1,0 мкг/мл:

16,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату (амікацин сульфат) + 10,0 мл дистильованої води = 1 680 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,0 мкг/мл (друге розведення);

2,0 мл другого розведення + 2,0 мл стерильної дистильованої води = 84,0 мкг/мл (третє розведення);

внести 0,1 мл третього розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Канаміцин (Km) - 2,5 мкг/мл:

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 2 100 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210 мкг/мл (друге розведення);

внести 0,1 мл другого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 2,5 мкг/мл.

Капреоміцин (Cm) - 2,5 мкг/мл:

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату (капреоміцин сульфат) + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 2 100 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 210 мкг/мл (друге розведення);

внести 0,1 мл другого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 2,5 мкг/мл.

Етіонамід (Et) - 5,0 мкг/мл:

21,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл димексиду (DMSO) = 4 200 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл DMSO = 420,0 мкг/мл (друге розведення);

внести 0,1 мл другого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 5,0 мкг/мл.

Протіонамід (Pt) - 2,5 мкг/мл:

10,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 5,0 мл DMSO = 2 100 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл DMSO = 210 мкг/мл (друге розведення);

внести 0,1 мл другого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 2,5 мкг/мл.

Лінезолід (Lzd) - 1,0 мкг/мл:

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату (наважка 5,0 мг – вміст упаковки) + 2,9 мл стерильної дистильованої води = 1 689 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,9 мкг/мл (друге розведення);

2,0 мл другого розведення + 2,0 мл дистильованої води = 84,5 мкг/мл (третє розведення);

внести 0,1 мл третього розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Клофазимін (Cfz) - 1,0 мкг/мл:

16,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл димексиду (DMSO) = 1 680 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл DMSO = 168,0 мкг/мл (друге розведення);

2,0 мл другого розведення + 2,0 мл DMSO = 84,0 мкг/мл (третє розведення);

внести 0,1 мл третього розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Бедаквілін (Bdq) - 1,0 мкг/мл:

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 2,9 мл димексиду (DMSO) = 1 689 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл DMSO = 168,9 мкг/мл (друге розведення);

2,0 мл другого розведення + 2,0 мл DMSO = 84,5 мкг/мл (третє розведення);

внести 0,1 мл третього розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 1,0 мкг/мл.

Деламанід (Dlm) - 0,06 мкг/мл:

4,9 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 2,9 мл димексиду (DMSO) = 1 689 мкг/мл (перше розведення);

1,0 мл першого розведення + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 168,9 мкг/мл (друге розведення);

1,0 мл другого розведення + 7,0 мл дистильованої води = 21,1 мкг/мл (третє розведення);

1,0 мл третього розведення + 3,0 мл дистильованої води = 5,28 мкг/мл (четверте розведення);

внести 0,1 мл четвертого розведення до 7,8 мл вмісту пробірки MGIT; кінцева концентрація в рідкому середовищі - 0,06 мкг/мл.

Промаркувати пробірки, зазначаючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки.

9. Для постановки ТМЧ для одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів II ряду потрібно підготувати п'ять пробірок: один контроль і чотири пробірки з препаратами II ряду (або вісім пробірок: один контроль і сім пробірок із препаратами II ряду залежно від того, чи має лабораторія штативи для ВАСТЕС MGIT 960 до ТМЧ II ряду на 8 гнізд.)

За допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок до пробірок із препаратами й до контрольних пробірок, а добавку SIRE - до контролю та пробірок із Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz.

За допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz) до відповідних маркованих пробірок MGIT.

Не додавати препаратів до пробірок, які буде використано для контролю росту мікобактерій.

Для постановки ТМЧ для одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів I та II ряду ([додаток 11](#)) потрібно використовувати 15 пробірок: 1 пробірка - контроль для препаратів I ряду (штатив із препаратами I ряду), 1 пробірка - контроль II ряду (штатив із препаратами II ряду), 1 пробірка - контроль Z, 12 пробірок із препаратами (SIRE та S, H, R, E, Z, Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Bdq і Cfz).

10. Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування в пробірці MGIT) для постановки ТМЧ в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT.

Важливим фактором є «вік» культури в днях, що пройшов з моменту, коли було отримано позитивну культуру в системі MGIT.

День, у який цю культуру було вперше ідентифіковано системою як позитивну, вважається «нульовим» (день 0).

Для одержання культури, придатної до подальших тестів на ТМЧ, пробірку потрібно інкубувати в системі щонайменше ще добу (тобто до дня 1). Якщо простір у системі є критичним чинником, що стримує швидкість роботи, пробірка може бути вилучена із системи після дня 0 (тобто після одержання позитивної відповіді) і культивуватися в наступні дні в термостаті за температури 37 °С.

Культура є придатною для посіву на ТМЧ протягом п'яти днів після дня 0 (тобто впродовж днів 1–5).

Якщо культура інкубувалась у системі або термостаті довше ніж 5 днів після повідомлення про позитивний результат (тобто починаючи із шостої доби і далі), вона непридатна для проведення ТМЧ у системі MGIT. Для того, щоб зробити ТМЧ із позитивної культури (MGIT «+»), що була витримана в термостаті довше ніж п'ять діб, потрібно здійснити її субкультивування, тобто 0,5 мл цієї культури потрібно посіяти у нову пробірку MGIT і культивувати в апараті до отримання позитивного результату.

Процедури підготовки культури для ТМЧ трохи розрізняються залежно від «віку» культури (тобто днів, що пройшли з моменту одержання позитивного результату).

Проведення ТМЧ із культури віком 1-2 дні ([додаток 12](#)):

струсити пробірку (бажано на вортексі) для гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);

залишити пробірку на 5-10 хв для осадження великих часток;

використовувати надосадову рідину для інокуляції пробірок із препаратами.

Проведення ТМЧ із культури віком 3-5 днів:

струсити пробірку (бажано на вортексі) для гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);

залишити пробірку на 5-10 хв для осадження великих часток;

до окремої стерильної пробірки перенести 1,0 мл надосадової рідини й додати 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl, щоб отримати, таким чином, розведення 1 : 5. Використовувати його для інокуляції пробірок із препаратами.

Приготувати розведення суспензії мікобактерій 1 : 100 для посіву контрольних пробірок SIRE. Для цього додати 0,1 мл суспензії мікроорганізмів (надосадової рідини 1-2-денної культури або розведення 1 : 5 3-5 денної культури) до пробірки з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl. Добре перемішати й використовувати для посіву в контрольні пробірки (без препаратів).

Під час тестування на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку Z готують розведення 1 : 10 (не 1 : 100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1 : 5 для 3-5-денної культури або суспензії 1-2-денної культури) до пробірки з 4,5 мл. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок під час тестування стійкості до Z.

11. Для приготування суспензії мікобактерій, що були культивовані на щільних середовищах для постановки ТМЧ MGIT ([додаток 13](#)), потрібно:

для постановки ТМЧ використовувати культуру із щільного живильного середовища Левенштейна-Єнсена не пізніше ніж через 15 діб із моменту появи росту мікобактерій;

дати до пробірки 4,0 мл ізотонічного розчину NaCl;

за допомогою традиційного способу зібрати максимальну кількість колоній із поверхні середовища в стерильний ізотонічний розчин NaCl, уникаючи при цьому потрапляння середовища до ізотонічного розчину NaCl;

щільно закрити пробку й суспендувати на вортексі протягом 1-3 хв для повного подрібнення згустків. Проконтролювати мутність суспензії за стандартом мутності McFarland (мутність суспензії має бути більшою, ніж 1,0);

залишити пробірку із суспензією на 20 хв для осадження великих часток;

акуратно перенести надосадову рідину піпеткою до іншої стерильної пробірки, не торкаючись осаду на дні пробірки. Залишити пробірку з надосадовою рідиною на 15 хв для осадження всіх часток, що залишилися;

акуратно перенести надосадову рідину до наступної стерильної пробірки, не торкаючись осаду;

проконтролювати мутність отриманої суспензії за стандартом мутності (має бути більшою, ніж 0,5). Довести мутність суспензії до значення 0,5 шляхом додавання до пробірки стерильного ізотонічного розчину. Стежити, щоб значення мутності не було меншим, ніж 0,5;

розвести отриману суспензію в співвідношенні 1 : 5 стерильним ізотонічним розчином NaCl. Для цього потрібно перенести 1,0 мл отриманої суспензії до пробірки із 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати отримане розведення (1 : 5) для інокуляції в пробірки MGIT із препаратами;

приготувати розведення отриманої суспензії (1 : 100) для посіву до контрольних пробірок. Для цього потрібно додати 0,1 мл отриманої суспензії до пробірки з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати таке розведення для посіву в контрольні пробірки.

Під час тестування на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку готують розведення 1 : 10 (не 1 : 100). Для одержання такого розведення потрібно додати 0,5 мл суспензії (розведення 1 : 5) до пробірки із 4,5 мл ізотонічного розчину NaCl. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок під час тестування стійкості до Z.

Для постановки ТМЧ одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів I ряду потрібно підготувати сім пробірок: одна пробірка - контроль SIRE, одна пробірка - контроль Z, чотири пробірки із препаратами та SIRE і Z.

Для постановки ТМЧ одного штаму *M. tuberculosis* одночасно до препаратів I та II ряду потрібно:

використовувати 15 пробірок: одна пробірка - контроль для препаратів I ряду (штатив із препаратами I ряду), одна пробірка - контроль II ряду (штатив із препаратами II ряду), одна пробірка - контроль Z, 12 пробірок із препаратами (SIRE та S, H, R, E, Z, Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Vdq і Cfz);

внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1 : 100 до контрольних пробірок, які використовують для контролю росту мікобактерій під час тестування на чутливість до препаратів I (SIRE) та/або II ряду;

внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1 : 10 до пробірок без препаратів, які використовують для контролю росту мікобактерій під час тестування на стійкість до Z;

внести по 0,5 мл суспензії мікобактерій 1 : 5, отриманої з культури, вирощеної на щільному середовищі, або суспензії 1-2-денної культури мікобактерій, або розведення 1 : 5 для 3-5-денної культури мікобактерій, вирощених у системі MGIT, до кожної з п'яти пробірок із препаратами I ряду (S, H, R, E і Z) та/або до пробірок із препаратами II ряду (Cm, Lfx, Lzd, Am, Mfx, Vdq і Cfz);

після інокуляції негайно щільно закрити пробки пробірок, перемішати перевертанням кілька разів, встановити пробірки в потрібному порядку в тримач MGIT і помістити їх у ящики приладу MGIT у гнізда, зазначені приладом. Переконайтеся в тому, що кришки пробірок щільно закриті. Не переміщувати й не рухати пробірок у процесі інкубації в приладі;

тривалість проведення ТМЧ у системі зазвичай становить від 4 до 21 доби.

12. Система MGIT проводить автоматичний моніторинг росту мікобактерій і повідомляє про завершення тесту в разі досягнення певного значення мутності середовища в контрольній пробірці. У разі одержання такого повідомлення всі пробірки, у які було посіяно такий матеріал, можуть бути витягнуті із приладу й відскановані для одержання остаточного результату дослідження. Результат видається системою у вигляді повідомлень «R-resistente» (стійкий), або «S-Sensitive» (чутливий). Визначення результатів системою здійснюється шляхом виміру оптичної щільності в пробірках із препаратами й порівняння її зі щільністю контрольної пробірки. За наявності росту в контрольних пробірках раніше ніж на четверту добу (що може свідчити про контамінацію) або за його відсутності після закінчення 21 доби система видає повідомлення «X-Error» («помилка»). Таке саме повідомлення може видаватися й під час виникнення інших обставин, що впливають на якість тесту.

Під час одержання повідомлення про помилку пробірки потрібно витягти із приладу, інокулювати нові порції суспензії мікобактерій до нових пробірок і повторити дослідження.

13. ВКЯ під час роботи на автоматизованій системі ВАСТЕС 960 здійснюється із кожною новою партією наборів для визначення МЧ *M. tuberculosis* до ПТП. Із цією метою проводять постановку тесту з використанням чутливого (H_rR_r) й стійкого до H штамів *M. tuberculosis* із колекції АТСС, а також завідомо чутливого й резистентного до H ізолятів *M. tuberculosis*, виділених від хворих на ТБ.

14. Окрім методу пропорцій на щільному та рідкому живильному середовищах і непрямого методу абсолютних концентрацій для визначення МЧ *M. Tuberculosis*, може бути використано такі альтернативні методи:

метод коефіцієнта стійкості;

прямий метод абсолютних концентрацій.

Суть методу коефіцієнта резистентності полягає у визначенні мінімальної інгібуючої концентрації ПТП для клінічних штамів мікобактерій і співвідношення МК тих самих препаратів для завідомо чутливого лабораторного штаму мікобактерій (як правило, H37Rv). Це найбільш трудомісткий і дорогий метод, оскільки вимагає використання великої кількості пробірок із живильним середовищем, тому його застосовують в основному для наукових досліджень.

Основним недоліком традиційних культуральних методів визначення МЧ *M. tuberculosis* є їх надзвичайна тривалість. Результати ТМЧ враховують через 3-4 тижні інкубації в термостаті, тому потрібну корекцію хіміотерапії може бути проведено в кращому разі лише через 2-2,5 місяця від моменту надходження до лабораторії діагностичного матеріалу.

Для прискорення досліджень може бути використано прямий метод абсолютних концентрацій. Під час постановки цього методу проводять прямий посів осаду, обробленого детергентами діагностичного матеріалу одночасно на контрольне живильне середовище, і середовища з відповідними ПТП. Паралельно проводять посів матеріалу на стандартні живильні середовища (з метою отримання культури).

Культура мікобактерій вважається стійкою, як і в разі непрямого методу абсолютних концентрацій, якщо на середовищі з ПТП виростає 20 і більше колоній.

Проте прямий метод абсолютних концентрацій може бути використано тільки для дослідження бактеріоскопічно позитивного матеріалу з масивністю бактеріовиділення не менше, ніж 2+. У такому випадку підвищується ризик контамінації. Крім того, слід враховувати, що в разі цього методу проводять недозований посів, що може ускладнити інтерпретацію результатів. Тому в ряді випадків отримані результати можуть виявитися недостовірними.

Метод носить попередній характер і збільшує вартість дослідження МЧ *M. tuberculosis* у цілому.

15. Для забезпечення достовірності одержаних результатів потрібно проводити контроль якості виконуваних лабораторією тестів стосовно дослідження МЧ мікобактерій до ПТП.

Потрібно перевіряти якість кожної партії середовищ для визначення МЧ мікобактерій до ПТП. Із цією метою кожен партію приготованого живильного середовища має бути перевірено на стерильність (інкубація у термостаті).

Також для кожної партії середовища під час тестування на МЧ клінічних зразків потрібно одночасно провести тест на чутливість контрольного штаму *M. tuberculosis* H₃₇R_v або контрольного штаму *M. tuberculosis* з відомою стійкістю до всіх досліджуваних ПТП. Якщо середовище з препаратами приготоване правильно, стійкість контрольної культури буде незмінною. Поява росту контрольного штаму в пробірках із ПТП, до яких він є чутливим, або відсутність його росту в пробірках із препаратами, до яких контрольний штам є стійким, указує на те, що під час приготування середовища з препаратом було допущено помилку, або на те, що бактерійну суспензію приготовано неправильно.

За відсутності у лабораторії контрольних (музейних) штамів лабораторія може використовувати виділені від пацієнтів штами, які у багатократних дослідженнях підтверджують свою чутливість та/або стійкість.

Ресстрація результатів ВКЯ кожної партії середовищ має фіксуватися в журналі приготування середовищ.

ВКЯ включає також регулярну перевірку використовуваного лабораторного обладнання - згортувачів, термостатів, рН-метра, автоматичних дозаторів, стандартів мутності тощо.

16. Під час реєстрації бактеріологічних досліджень кожному дослідженню діагностичного матеріалу присвоюється індивідуальний номер.

Усі зразки, що надійшли до лабораторії (за винятком відбракованих) має бути зареєстровано у формі № 252-2/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2» (далі - форма ТБ 04/2).

Форму ТБ 04/2 заповнюють відповідальні лікарі бактеріологічних відділів клініко-діагностичних лабораторій чи бактеріологічних лабораторій і ведуть у лабораторіях другого й третього рівнів ПТЗ. Форму ТБ 04/2 заповнюють на підставі [форми первинної облікової документації № 200-2/о «Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06»](#).

У формі реєструються пацієнти, яким призначено бактеріоскопічне та культуральне дослідження, а також тести на МЧ до ПТП.

Графи 1-19 заповнюються на основі [форми первинної облікової документації № 200-2/о «Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06»](#).

У графі 1 зазначають лабораторний реєстраційний номер пацієнта.

У графу 2 заносять номер проби.

У графу 3 записують цифрами число, місяць та рік збору біоматеріалу.

У графу 4 записують цифрами число, місяць та рік доставки біоматеріалу на дослідження.

У графу 5 вписують районний реєстраційний номер випадку ТБ (якщо він є), код району, дві останні цифри року, порядковий номер.

У графі 6 зазначають прізвище, ім'я та по батькові пацієнта.

У графі 7 скорочено зазначають стать особи, якій проводять дослідження (Ч - чоловіча, Ж - жіноча).

У графі 8 зазначають рік народження пацієнта.

У графі 9 зазначають місце проживання та район адміністративної території, де мешкає пацієнт.

Потрібно найбільш повно внести ці дані, оскільки лабораторний журнал може стати єдиним джерелом даних про хворого на бацилярний туберкульоз.

У лабораторіях додатково ведуть журнал виділених культур, до якого вносять усі дані про проби, з яких було виділено культури мікобактерій.

У графі 10 зазначають: у верхній клітинці графі назву закладу чи відділення, звідки було направлено біоматеріал, у нижній клітинці графі 10 - прізвище, ініціали й телефон лікаря, який направив на дослідження біоматеріал пацієнта.

Ці дані потрібні для того, щоб:

передати результати дослідження лікарю, який направив матеріал;

у разі вибраковки результатів (проріст, незадовільна деконтамінація тощо) повідомити про те, що трапилося, лікаря і разом прийняти рішення про доцільність повторного дослідження.

У графах 11 та 12 зазначають, який саме біоматеріал направляється на дослідження - мокротиння чи щось інше. Якщо направляється інший біоматеріал, потрібно зазначити, який саме (промивні води бронхів, плевральна рідина тощо).

У графах 13-18 зазначають мету проведення дослідження - діагностика, контроль хіміотерапії чи іншу.

Дані про вид діагностичного матеріалу й мети дослідження потрібні для проведення ретроспективного аналізу ефективності роботи лабораторії.

Якщо мета проведення дослідження - діагностика нового випадку, потрібно відмітити це знаком «V» у пункті 13, якщо діагностика рецидиву - відмітити це знаком «V» у пункті 14, інший випадок повторного лікування (невдале лікування, після перерви) - відмітити це знаком «V» у пункті 15.

Якщо мета проведення дослідження - контроль хіміотерапії, у пункті 16 потрібно це відмітити знаком «V». У пункті 17 зазначити цифрою, на якому місяці лікування проводиться дослідження.

Якщо мета проведення дослідження інша, у пункті 18 потрібно зазначити, яка саме, наприклад: диспансеризація, обстеження особи, яка контактувала з хворим на туберкульоз із бактеріовиділенням тощо.

У графі 19 записують цифрою категорію захворювання на туберкульоз (1-4).

У графі 20 записують цифрами число, місяць і рік проведення дослідження.

У графах 21-23 зазначають результат бактеріоскопічного дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо в пробі біологічного матеріалу знайдені кислотостійкі палички (КСП), поряд із відповідним номером зразка мокротиння (1, 2 або 3) у графі 21 потрібно зазначити ступінь позитивного результату; якщо КСБ не знайдено, зазначити, що результат негативний.

Якщо в полі зору більше ніж 10 КСБ, потрібно відмітити «3+».

Якщо в полі зору від 1 до 10 КСБ, потрібно відмітити «2+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 10 до 99 КСБ, потрібно відмітити «1+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 1 до 9 КСБ, потрібно записати точну цифру знайдених КСБ.

Якщо на 100 полів зору не знайдено КСБ, зазначити, що результат негативний.

У графі 22 записують цифрами число, місяць і рік видачі результатів бактеріоскопії.

У графі 23 ставиться підпис спеціаліста, який проводив бактеріоскопію.

У графах 24 та 25 зазначають результат культурального дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо на живильному середовищі:

немає росту *M. tuberculosis*, то зазначається термін: «негативний»;

виросли 1-19 колоній *M. tuberculosis*, то вказують точне число колоній *M. tuberculosis*.

виросло від 20 до 100 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «1+».

виросло 100-200 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «2+».

виросло 200-500 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «3+».

виросло більше ніж 500 колоній *M. tuberculosis*, то ставиться «4+».

Якщо на живильному середовищі проросла банальна мікрофлора, то ставиться «проріст».

У графі 25 записують цифрами число, місяць і рік видачі попереднього результату посівів.

У графах 26–34 зазначають результати тестів ідентифікації виділеної культури.

У графі 26 зазначають морфологію колоній: R або S.

У графі 27 знаками «-» або «+» позначають пігментоутворення: «-» - якщо колонії мають кремовий колір, характерний для мікобактерій туберкульозного комплексу; «+» - якщо колонії мають інший колір.

У графі 28 відмічають швидкість росту: «П» - повільний, «Ш» - швидкий.

У графі 29 позначають наявність чи відсутність корд-фактора знаками «+» або «-».

У графі 30 знаками «+» або «-» позначають ріст культури або відсутність росту на середовищі із саліциловокислим натрієм або з ПНБК.

У графі 31 позначають знаками «+» або «-» результати ніацинового тесту.

У графі 32 позначають знаками «+» або «-» результати нітратредуктазного тесту.

У графі 33 позначають знаками «+» або «-» наявність або відсутність термостабільної каталази.

У графі 34 позначають знаками «+» або «-» результати ТСН-тесту.

У графі 35 роблять висновок, а саме: виділена культура ідентифікована як: *M. tuberculosis*, інші мікобактерії (потрібно вписати).

У графах 36-40 зазначають результати тесту медикаментозної чутливості виділених мікобактерій до ПТП 1-го ряду. Якщо культура чутлива до певного препарату, вписується літера «Ч», а якщо стійка, - літера «С».

У графі 41 зазначають результати тесту чутливості мікобактерій до ПТП другого ряду та вказують через кому скорочені назви ПТП 2-го ряду, до яких мікобактерії є стійкими.

У графі 42 записують цифрами число, місяць і рік видачі остаточних результатів дослідження.

У графі 43 ставиться підпис спеціаліста, який проводив культуральне дослідження.

У графі 44 зазначаються спеціальні під примітки (за потреби).

Нумерація досліджень має починатися в перший робочий день року і тривати безперервно протягом усього року. Реєстраційний номер, присвоєний зразку, має бути нанесений на контейнер зі зразком і супроводжувати його на всіх етапах бактеріологічного дослідження: на центрифужній пробірці, в якій зразок центрифугують після деконтамінації, на пробірках із ростовим середовищем, на предметних скельцях, на які наноситься матеріал для мікроскопії перед посівом і для підтвердження належності культури, що виросла, до кислотостійких бактерій (фарбування за Цілем-Нільсеном).

ІХ. Молекулярно-генетичні методи діагностики туберкульозу

1. Детекція МБТ методом ПЛР. Для виявлення МБТ методом використовують мокротиння, бронхіальний секрет, плевральну та інші рідини й інші види діагностичного матеріалу.

Для цього з діагностичного матеріалу в першу чергу потрібно виділити ДНК. Потім до розчину отриманої ДНК додають реакційний буфер, суміш нуклеозидтрифосфатів, праймери, полімерази і проводять ампліфікацію в програмованому термостаті (термоциклері), а потім оцінюють результат. Наявність у пробі послідовності-мішені свідчить про наявність *M. tuberculosis* у дослідному зразку.

ПЛР не дає відповіді на питання про активність туберкульозного процесу, тому інтерпретувати отриманий результат потрібно з урахуванням клініко-рентгенологічних даних. Метод ПЛР може використовуватися як додатковий діагностичний метод під час диференціальної діагностики в комплексі з іншими методами лабораторної діагностики ТБ і

не застосовується як скринінговий метод для виявлення хворих на ТБ через можливість хибнопозитивних результатів.

2. Найбільш ефективними методами діагностики МЧ *M. tuberculosis* визнано молекулярно-генетичні методи, які ґрунтуються на гібридизації з ДНК-зондами (LPA), зокрема GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl та INNO-LiPA Rif TB Assay.

Технологія проведення досліджень із використанням цих методів охоплює такі етапи:

виділення ДНК з культур *M. tuberculosis* або безпосередньо з клінічного матеріалу;

ПЛР для ампліфікації фрагментів генів, що асоціюються з медикаментозною стійкістю мікобактерій;

гібридизація ПЛР-продуктів з ДНК-зондами;

візуалізація результатів гібридизації, за якої відбувається детекція мікобактерій комплексу *M. tuberculosis*, а також наявності або відсутності мутацій у дослідних генах.

До складу зондів належать специфічний зонд для ідентифікації мікобактерій комплексу *M. tuberculosis*, зонди «дикого типу» (без мутацій, WT), а також зонди для детекції мутацій (MUT), що найчастіше зустрічаються. Заміна хоча б одного нуклеотиду в послідовності ДНК-мішені призводить до порушення гібридизації із зондом, комплементарним відповідній ділянці ДНК-мішені «дикого типу», але при цьому відбувається гібридизація із зондом, що враховує цю заміну. Наявність мутацій визначається відсутністю сигналу одного або кількох зондів «дикого типу», а також наявністю сигналів від одного або кількох «мутантних» зондів. Також можливе виявлення гетерорезистентних штамів мікобактерій, у яких реєструються всі сигнали зондів «дикого типу» і один або кілька сигналів «мутантних» зондів.

Резистентність може існувати, незважаючи на наявність структури не мутантного типу. Можливі під причини гетерорезистентності: досліджуваний зразок містить штам, який має гетерорезистентність, викликану мутацією, яка не була виявлена мутаційними зондами, або досліджуваний зразок містить штам немутантного типу та резистентний штам (наприклад, внаслідок змішаної інфекції пацієнта), і ця резистентність викликана мутацією, яка не була виявлена мутаційними зондами.

Молекулярно-генетичні методи детекції мультирезистентних *M. tuberculosis* в цілому спрямовані на виявлення мутацій, що обумовлюють резистентність *M. tuberculosis* до рифампіцину (який є маркером множинної медикаментозної стійкості мікобактерій, оскільки резистентність до рифампіцину у 80,0-90,0 % штамів *M. tuberculosis* корелює зі стійкістю до ізоніазиду), а також до ізоніазиду. Генодіагностика резистентності до R ґрунтована на детекції мутацій, локалізованих у висококонсервативній області розміром 81 п.о. гена *rpoB*, що кодує β -субодиницю РНК-полімерази, оскільки 95,0-98,0 % стійких до R штамів *M. tuberculosis* мають мутації в цьому гені. Для визначення високого рівня стійкості до H досліджують ген *katG*, що кодує каталазу-пероксидазу; для визначення низького рівня стійкості до H вивчають область промотора гена *inhA*, що кодує еноїлацил-протеїнредуктазу. Діагностичні набори, наприклад GenoType MTBDRsl, дають можливість проводити визначення стійкості до Q (*gyrA*) аміноглікозидів/циклопептидів (*rfs*), тобто експрес-детекцію широкої медикаментозної стійкості.

Молекулярно-генетичні тести для визначення МЧ *M. tuberculosis* (за винятком Xpert MTB/RIF) рекомендують використовувати в обласних лабораторіях.

Новий швидкий і ефективний метод діагностики ТБ - тест GeneXpert MTB/RIF, що дає можливість проводити детекцію *M. tuberculosis* у зразку діагностичного матеріалу й чутливості до R за дві години. Усі стадії тесту повністю автоматизовані. Екстракція, ампліфікація і детекція ДНК здійснюються автоматично в закритому картриджі, що мінімізує можливість крос-контамінації.

Проведення дослідження є двоступінчастим процесом, що охоплює обробку клінічних зразків і власне ПЛР у режимі реального часу, під час якої відбувається ампліфікація специфічної послідовності гена *groB*, яка потім тестується молекулярними маяками (molecular beacons) на мутації в ділянці, що обумовлює стійкість до R. Рекомендовано використання методики Xpert MTB/RIF для швидкого виявлення MDR-туберкульозу в бактеріологічних лабораторіях ПТЗ і мікроскопічних пунктах у районах із високим рівнем захворюваності на ТБ.

На відміну від попередньої версії Xpert MTB/RIF, для підвищення чутливості тесту картридж Xpert MTB/RIF Ultra, крім гена *groB*, включає дві різні мультикопійні мішені ампліфікації (IS6110 і IS1081), а також у ньому використовується більша реакційна камера (50,0 мкл ПЛР-реакції в Xpert MTB/RIF Ultra порівняно з 25,0 мкл в Xpert MTB/RIF). У нових картриджах Xpert MTB/RIF Ultra використовується повністю вкладена ПЛР, швидше термоциклювання (отримання негативного результату за 65 хв, позитивного - за 77 хв), а також поліпшені розчини та ферменти.

Xpert MTB/RIF Ultra має межу виявлення 11,8 КУО/мл, тоді як для Xpert MTB/RIF межу виявлення встановлено на рівні 114 КУО/мл, тобто нова система майже в 10 разів чутливіша.

Для підвищення точності виявлення стійкості до R у тесті Xpert MTB/RIF Ultra використано аналіз температури плавлення замість аналізу кривих флуоресценції ПЛР у реальному часі. Для визначення мутацій, що характеризують стійкість до R, використовуються чотири зонди, які визначають область гена *groB*.

У тесті Xpert MTB/RIF Ultra для оцінювання результату використовуються такі самі напівкількісні категорії, що і в Xpert MTB/RIF аналізі (високий, середній, низький і дуже низький), а також додано нову напівкількісну категорію «одиничні МБТ», яка відповідає найнижчому бактеріальному навантаженню. Результат «МБТ виявлено, одиничні» було додано для підвищення ефективності виявлення *M. tuberculosis complex*.

Xpert MTB/RIF Ultra не поступається Xpert MTB/RIF аналізу для діагностики МБТ і виявлення стійкості до R і може бути використаний як альтернатива останньому.

Xpert MTB/RIF Ultra потребує програмного забезпечення GeneXpert версії 4.7b або вище.

Xpert MTB/RIF Ultra потрібно використовувати як початковий діагностичний тест для дорослих і дітей з ознаками і симптомами легеневого ТБ, а також у тестуванні позалегенових зразків (спино-мозкова рідина, біоптати лімфатичних вузлів і тканин). Інтерпретація результатів Xpert MTB/RIF Ultra для виявлення *M. tuberculosis complex* є такою самою, як і для Xpert MTB/RIF, за винятком «МБТ виявлено, одиничні». Інтерпретувати «МБТ виявлено, одиничні» потрібно так:

для ВІЛ-інфікованих осіб і дітей із підозрою на захворювання на легеневий ТБ, а також для позалегенових зразків від хворих цієї категорії результат «МБТ виявлено, одиничні» слід розглядати як позитивний результат для використання в клінічних рішеннях і подальших дій щодо пацієнта;

для осіб без ризику інфікування ВІЛ, які мають початковий позитивний результат «МБТ виявлено, одиничні», потрібно зібрати свіжий зразок і повторно протестувати матеріал. Результат другого тесту Xpert MTB/RIF Ultra використовується для під часиняття клінічних рішень і подальших дій щодо пацієнта;

для усіх інших пацієнтів, які отримали позитивний результат первинного початкового тесту Xpert MTB/RIF Ultra «МБТ виявлено, одиничні», потрібні додаткові дослідження, щоб підтвердити або виключити стійкість до R.

3. Порядок використання молекулярно-генетичних методів у лабораторіях із діагностики туберкульозу. Виявлення *M. tuberculosis complex* у клінічних зразках є основним фактором, який свідчить про специфічну природу захворювання та має вирішальне значення для вибору

раціональної схеми лікування та оцінки його ефективності. Для етіологічної діагностики ТБ в арсеналі лабораторій на сьогоднішній день використовують такі методи: бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний.

Під етіологічною діагностикою ТБ розуміють виявлення збудника захворювання (деякі методи дають можливість визначити його кількість, що є важливим інформаційним показником, який характеризує ступінь епідемічної небезпеки та тяжкість захворювання), ідентифікацію мікобактерій та визначення профілю резистентності мікобактерій до ПТП.

Традиційні мікробіологічні методи мають багато переваг, але їм притаманна і низка суттєвих недоліків порівняно з молекулярно-генетичними методами: культуральні дослідження досить тривалі, а швидкі бактеріоскопічні методи мають низьку чутливість: для виявлення мікобактерій 1,0 мл матеріалу має містити не менше ніж 100 тисяч мікробних клітин.

Для швидкої та всебічної лабораторної діагностики ТБ доцільно використовувати увесь комплекс доступних лабораторних методів. Результатом правильної організації діагностичного процесу є отримання максимальної кількості лабораторної інформації під час роботи з єдиною пробю біологічного матеріалу. Для отримання достовірних результатів дослідження потрібно одну пробу біологічного матеріалу досліджувати комплексно, використовуючи увесь арсенал доступних для лабораторії методів - бактеріоскопічний, бактеріологічний, молекулярно-генетичний. Цей підхід має використовуватись незалежно від того, яку ПЛР-методику застосовують у лабораторії.

Для дослідження молекулярно-генетичними методами може використовуватись різний матеріал. Разом з тим слід пам'ятати, що молекулярно-генетичні методи є прямими, отже як зразок доцільно використовувати матеріал із вхідних воріт або із епітопів, до яких збудник має тропність. У разі захворювання на ТБ досить інформативним є правильно зібране мокротиння пацієнта.

Після надходження проби для дослідження потрібно перевірити заповнення супровідних документів та оцінити якість доставленого зразка. Для комплексного дослідження матеріалу потрібно не менше ніж 5,0 мл якісної проби мокротиння.

Проба, яка досліджується, має бути деконтамінованою. Під час молекулярно-генетичних досліджень для розрідження та деконтамінації мокротиння потрібно використовувати метод обробки NALC-NaOH. Такий самий метод деконтамінації рекомендовано і в разі застосування системи ВАСТЕС MGIT 960. Хід виконання деконтамінації за допомогою NALC-NaOH викладено вище.

Для молекулярно-генетичних досліджень біологічного матеріалу на наявність збудників ТБ можуть використовуватись різні формати ПЛР: класична ПЛР, ПЛР у реальному часі, NESTED або інші, якщо на ринку виробів медичного призначення доступні реагенти для їх виконання, зареєстровані та дозволені до використання у закладах охорони здоров'я України відповідно до чинного нормативно-правового законодавства.

4. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу із застосуванням системи GeneXpert MTB/RIF (GeneXpert MTB/RIF ULTRA). Лабораторні дослідження біологічного матеріалу потрібно проводити в комплексі: бактеріоскопічні, бактеріологічні та молекулярно-генетичні. Тому вимоги для зберігання та транспортування зразків є такими, як для проб, що підлягають бактеріологічному дослідженню, тобто у разі неможливості доставити матеріал негайно він може зберігатися до 48 год за температури $(+4 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ і транспортуватися з дотриманням указаних температурних умов.

Прилад GeneXpert не потребує окремого приміщення. Оскільки прилад GeneXpert є закритою системою і працює тільки з картриджами Xpert, у яких автоматично відбуваються всі етапи ПЛР-дослідження без втручання персоналу. Усі маніпуляції з дослідним матеріалом від виділення ДНК мікроорганізмів до детекції результатів ампліфікації відбуваються в

закритому, окремому для кожного зразка картриджі. Вимога ДСП 9.9.5.153-2008 поширюється на лабораторії, в яких використовуються методики, що передбачають виконання окремих етапів ПЛР-дослідження (виділення ДНК, ампліфікація, детекція) персоналом лабораторії за допомогою «відкритих» ПЛР-систем - і щодо обладнання, і щодо реагентів.

Система GeneXpert MTB/RIF може працювати під час дослідження матеріалу від осіб, які не отримували ПТП. Тому метод може бути використаний як скринінговий для виявлення *M. tuberculosis complex* та мутацій у гені *rpoB*, з яким пов'язують резистентність мікобактерій до R. Така лабораторна інформація дає можливість на ранніх етапах діагностики виявити у відповідному матеріалі збудника туберкульозної інфекції та попередити фтизіатра щодо наявності у *M. tuberculosis* резистентності до ПТП 1-го ряду. Разом з тим слід пам'ятати, що результати тестування в картриджах Xpert MTB/RIF є попередніми і не можуть замінити подальшого бактеріологічного дослідження.

Для дослідження в картриджах Xpert MTB/RIF за інструкцією виробника може досліджуватись мокротиння або його осад. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

Для отримання коректного результату дослідження та враховуючи те, що в Україні дослідження з використанням приладів GeneXpert MTB/RIF проводяться в комплексі з посівами на рідке середовище за допомогою системи BACTEC MGIT 960, які встановлені в лабораторіях 3-го рівня, доцільно працювати з осадами мокротиння після проведення їх передпосівної обробки (деконтамінації).

Після оцінення якості доставленого мокротиння (якість проби та заповнення документів) контейнер з матеріалом переносять у ШББ 2 класу і проводять його деконтамінацію з використанням NALC-NaOH відповідно до методики.

Із ресуспендованого осаду однієї проби потрібно зробити наступне:

посіяти 0,5 мл осаду до пробірки з рідким середовищем Мідлбрукка 7H9 для інкубації в аналізаторі BACTEC MGIT 960;

посіяти 0,2 мл до пробірки зі щільним середовищем Левенштейна-Єнсена і помістити до термостата за температури +37 °C;

якщо лабораторія за будь-яких причин не може виконати дослідження за допомогою системи BACTEC MGIT 960, потрібно зробити посів на 2 пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід виконувати відповідно до вимог Інструкції з лабораторної діагностики ТБ;

дослідний матеріал потрібно нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Ціля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;

помістити до чистої пробірки з кришкою, що загвинчується, 0,5 мл деконтамінованого осаду для попередньої підготовки проби з метою дослідження в картриджі Xpert MTB/RIF. Відповідно до інструкції виробника картриджів до 0,5 мл осаду слід додати 1,5 мл реактиву для зразків. Енергійно перемішати і залишити для інкубації у штативі у ШББ за кімнатної температури впродовж 15 хв. За цей проміжок часу потрібно 1-2 рази ретельно перемішати вміст пробірки. Після експозиції перенести 2,0 мл суміші до картриджа Xpert MTB/RIF, помістити його в аналізатор GeneXpert MTB/RIF і запустити відповідну програму виконання тесту.

Якщо не вдалося отримати результат дослідження з цією пробою (Error чи NO Result), потрібно повторити дослідження, використавши збережені залишки матеріалу з цієї самої пробірки.

За відсутності залишків проби або у разі отримання результату «недійсний» (invalid), потрібно повторно зібрати матеріал для дослідження і повторити всю низку маніпуляцій, описаних вище.

Після отримання достовірного результату тестування у картриджі Xpert MTB/RIF, його потрібно занести до Журналу ТБ 04/2 та видати відповідь лікарю-фтизіатру, який направив матеріал.

5. Організація та здійснення комплексного дослідження матеріалу з використанням ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами. ПТЗ, які мають відповідно обладнані ПЛР-лабораторії та влаштовані з дотриманням чинного законодавства, а також мають підготовлений персонал, можуть використовувати ПЛР з детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами для виявлення *M. tuberculosis complex*, ідентифікації збудника захворювання та визначення наявності мутацій у генах, з якими пов'язана резистентність до R та H, а також до препаратів 2-го ряду.

Реагенти GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl виробництва компанії HainLifescience, дозволені до використання в Україні відповідно до чинного законодавства, можуть давати коректний достовірний результат з біологічним матеріалом та бактеріальними культурами, які виростили на рідкому або щільному середовищі.

Набір GenoType MTBDRplus дає можливість виявити у пробі наявність ДНК *M. tuberculosis complex*, а також наявність мутацій, асоційованих з резистентністю до R та H. Якщо за результатами тестування матеріалу з наборами GenoType MTBDRplus виявлені мутації у генах, з якими пов'язують резистентність до препаратів 1-го ряду (а саме до рифампіцину та ізоніазиду), тестування може бути продовжене з набором GenoType MTBDRsl.

Дослідження з реагентами GenoType MTBDRsl дають можливість виявити наявність генних мутацій, що відповідають за резистентність *M. tuberculosis complex* до препаратів 2-го ряду - аміноглікозидів, циклічних пептидів, Q.

Під час проведення досліджень слід враховувати особливості використання наборів системи GenoType.

Висока якість досліджень за допомогою набору GenoType MTBDRplus гарантована за умови роботи з таким матеріалом: нативним або індукованим мокротинням (незалежно від результатів бактеріоскопії), бронхоальвеолярним лаважем, плевральними аспіратами, а також культурами, які виділені в рідкому або на щільному середовищах. Для наборів GenoType MTBDRsl як матеріал для дослідження потрібно використовувати мокротиння з позитивним результатом бактеріоскопії «КСП+» або культурами, які виділені в рідкому або на щільному живильному середовищі. Для інших видів матеріалу методика не валідована.

Під час роботи з біологічним матеріалом після проведення його деконтамінації з використанням реактиву NALC-NaOH, отриманий осад має бути ресуспендований в 1,0-1,5 мл фосфатного буфера (більші об'єми фосфатного буфера можуть негативно вплинути на чутливість тесту).

Після обробки та ресуспендування біологічного матеріалу потрібно виконати такі маніпуляції:

внести 0,5 мл підготовленого матеріалу до пробірки з рідким середовищем Мідлбрукка 7H9 для інкубації в аналізаторі ВАСТЕС MGIT 960;

внести 0,2 мл до пробірки зі щільним середовищем Левенштейна-Єнсена й помістити до термостата за температури +37 °C;

якщо лабораторія за будь-яких під часчин не може виконати дослідження за допомогою системи ВАСТЕС MGIT 960, потрібно зробити посів на 2 пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена по 0,2 мл. Подальші маніпуляції з посівами слід здійснювати відповідно до вимог чинної Інструкції з бактеріологічної діагностики ТБ;

одну краплю матеріалу треба нанести на скельце з метою приготування та фарбування мазка за методом Ціля-Нільсена для світлової бактеріоскопії;

0,7 мл деконтамінованого зразка біологічного матеріалу (за використання автоматичного виділення ДНК на GenoXtract) або 0,5 мл зразка (для виділення ДНК за допомогою реагентів GenoLyse) переносять до пробірки об'ємом 2,0 мл з кришечкою, що загвинчується. Цю пробірку з матеріалом передають у приміщення виділення нуклеїнової кислоти для здійснення ПЛР дослідження відповідно до інструкції виробника реагентів.

Важливо пам'ятати, що для отримання коректного результату потрібно, щоб забраний матеріал був деконтамінований не пізніше ніж 48 год від моменту забору в пацієнта, у цьому разі зберігатися він може за температури $+4 \pm 2$ °С.

Набори реагентів GenoType MTBDRplus та GenoType MTBDRsl можуть бути використані для прискорення отримання лабораторної інформації щодо МЧ, виділених *M. tuberculosis complex* до ПТП.

Для виділення ДНК може використовуватись «ручна методика» за допомогою реагентів GenoLyse або автоматична - у приладі GenoXtract із набором реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit.

Під час роботи з культурами, які виростили в рідкому середовищі, потрібно перенести 500 мкл культури до чистої мікропробірки об'ємом 1,5-2,0 мл з кришкою, що загвинчується, і виділити ДНК відповідно до інструкції виробника для набору реагентів GenoLyse. Для виділення ДНК із цих культур за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA ExtractionKit потрібно 700,0 мкл рідкої культури помістити до GenoXtract та запустити відповідну програму.

Під час роботи з культурами, вирощеними на щільному середовищі, потрібно перенести 1-2 колонії до 100 мкл лізуючого буфера, який входить до складу набору для ручного виділення ДНК GenoLyse, ретельно ресуспендувати їх і отриману завись мікроорганізмів використовувати для виділення нуклеїнової кислоти відповідно до інструкції виробника. Під час виділення ДНК із культур, які виростили на щільному середовищі, за допомогою GenoXtract та реагентів GXT DNA/RNA Extraction Kit потрібно до 700 мкл деіонізованої води для молекулярної біології внести 1-2 колонії мікроорганізмів, ретельно перемішати на вортексі, помістити до GenoXtract та запустити відповідну програму.

Для контролю якості етапу виділення ДНК потрібно обов'язково з кожною партією досліджуваних проб (10-12 зразків) ставити негативний контроль, у якості якого може бути використано стерильну дейонізовану воду, яку вносять до чистої пробірки і здійснюють із нею такі самі маніпуляції, як зі зразком.

Подальші етапи дослідження матеріалу в ПЛР із детекцією методом гібридизації на стрипах з типоспецифічними зондами виконують відповідно до інструкцій виробника.

Усі посіви матеріалу на живильні середовища, що були здійснені паралельно під час виконання комплексу досліджень даної проби, мають бути інкубовані в оптимальних температурних умовах. Культури, що виділені в рідкому та у щільному середовищах, підлягають обов'язковій ідентифікації та визначенню профілю резистентності до ПТП. Результати досліджень (бактеріоскопії, ідентифікації, ТМЧ, молекулярно-генетичних досліджень) заносять до журналу ТБ 04/2 та інформують про них фтизіатра для призначення та/або коригування схеми лікування хворого.

6. Формулювання відповіді про результат дослідження у картриджі Xpert MTB/RIF:

у разі отримання в системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф+» у бланку висновку вказують - «Виявлені *M. tuberculosis complex* та мутації у гені *groB*, з якими пов'язують резистентність до R»;

у разі отримання в системі GeneXpert результату «МБТ+/Риф-» у бланку висновку вказують - «Виявлені *M. tuberculosis complex*, мутації у гені *groB* не виявлено»;

у разі отримання в системі GeneXpert результату «МБТ-» у бланку висновку вказують - «*M. tuberculosis complex* не виявлено»;

у разі отримання в системі GeneXpert результату «недійсний», «помилка» або «немає результату» і за відсутності достатнього об'єму залишків цієї проби варто зазначити: «Повторити дослідження. Потрібно повторно надати матеріал для дослідження не пізніше ніж через 3 робочі дні від дати видачі цього висновку».

Формулювання відповіді про результат дослідження за використання наборів для ПЛР із детекцією методом гібридації на стрипах із типоспецифічними зондами (набори HainLifescience):

1) під час дослідження матеріалу з використанням набору реагентів GenoType MTBDRplus:

отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому в бланку висновку варто зазначити: «Виявлено *M. tuberculosis complex*, чутливі до R та H»;

відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика - R або H. Смужка, що проявилася в зоні гена *groV*, свідчить про стійкість досліджуваного штаму до R, смужка в зоні гена *katG* та *inhA* - про стійкість до H. У лабораторному висновку варто зазначити: «Виявлено *M. tuberculosis complex*, які мають мутації в гені *groV* (та/або *katG* та/або *inhA*), з якими пов'язують стійкість до R (та/або H)»;

2) під час дослідження матеріалу з використанням набору реагентів GenoType MTBDRsl:

отримання позитивного сигналу в усіх пробах дикого типу свідчить про відсутність мутацій, тому в бланку висновку варто зазначити: «Виявлено *M. tuberculosis complex* чутливі до Q, амідоглікозидів / циклічних пептидів»;

відсутність сигналу хоча б в одній із проб дикого типу свідчить про стійкість збудника до відповідного антибіотика - Q, амідоглікозидів / циклічних пептидів. Смужка, яка проявилася в зоні гена *gugA*, свідчить про стійкість досліджуваного штаму до Q, смужка в зоні гена *grs* - про стійкість до амідоглікозидів / циклічних пептидів, а в зоні гена *embB* - про стійкість до E. У лабораторному висновку потрібно вказати - «Виявлено *M. tuberculosis complex*, які мають мутації в гені *gugA* (та/або *grs*, та/або *embB*), з якими пов'язують стійкість до Q (та/або амідоглікозидів / циклічних пептидів, та/або E)».

7. Під дискордантними результатами слід розуміти результати лабораторних досліджень однієї і тієї самої проби досліджуваного матеріалу, отримані різними методами, які суттєво відрізняються або суперечать один одному.

Для мінімізування кількості випадків отримання дискордантних результатів дослідження важливо ретельно аналізувати кожний такий випадок з урахуванням можливих причин їх отримання.

Наявність дискордантних результатів може бути пов'язана з різними чинниками. Якщо молекулярно-генетичними методами виявлено ДНК збудника ТБ, а за допомогою бактеріоскопії із тієї самої проби отримано негативний результат, це може бути пояснено більш високою чутливістю методу ПЛР порівняно з бактеріоскопією. Випадки відсутності росту мікобактерій за позитивного результату ПЛР можуть бути пояснені присутністю в пробі нежиттєздатних бактерій, наприклад, після антибіотикотерапії. Разом з тим можуть бути випадки, коли методом ПЛР мікобактерії не виявлені, а за допомогою культурального методу отримано ріст мікроорганізмів. Одним із варіантів пояснення може бути наявність у матеріалі НТМБ, які не будуть виявлені молекулярними методами, оскільки праймери підібрані, так що виявляють тільки *M. tuberculosis complex*.

Можуть бути і дискордантні результати щодо чутливості мікроорганізмів до ПТП. Слід пам'ятати, що, напід часклад, з геном *groV* пов'язують близько 95,0 % випадків резистентності

до R, до 5,0 % випадків резистентності можуть бути пов'язані з мутаціями в інших локусах геному. Аналогічна ситуація стосується й інших препаратів. Потрібно врахувати і той факт, що ПЛР забезпечує скринінг послідовностей нуклеїнових кислот, а не амінокислот. Деякі мутації можуть не призводити до заміни амінокислоти («мутації, що мовчать»), тому результат може не збігатися з результатами фенотипових методів.

Якщо в досліджуваній пробі містяться гетерозиготні штами або суміш *M.tuberculosis complex*, або туберкульозних та НТМБ, то результати, отримані в ПЛР, можуть відрізнятися від результатів бактеріологічних досліджень.

Крім того слід пам'ятати, що такі результати можуть бути отримані у разі дослідження різних зразків (наприклад, перша проба тестувалася бактеріологічними методами, а друга - ПЛР), у разі неправильного відбору хворих (не інформативним є дослідження матеріалу від осіб, що вживали ПТП).

8. Потрібно пам'ятати, що під час роботи з одним матеріалом можуть послідовно відкриватися тільки ті пробірки та картридж, які будуть використані саме для цього матеріалу. Відкривати кілька картриджів одночасно - заборонено.

Для попередження крос-контамінації та внутрішньолабораторного інфікування лабораторних фахівців усі маніпуляції з матеріалом, підозрюваним на вміст біологічних патогенних агентів, слід виконувати з використанням засобів індивідуального захисту у ШББ 2 класу.

Х. Забезпечення якості досліджень у мікробіологічній лабораторії з діагностики туберкульозу

1. Внутрішній контроль якості бактеріоскопічних досліджень. Для стандартизації та вдосконалення якості роботи лабораторії доцільно використовувати готові (комерційного виготовлення) набори барвників, реактиви, які відповідають вимогам методики, що зареєстровані в Україні та мають сертифікат якості.

Кожна партія приготування у лабораторії барвників, а також набори барвників комерційного виготовлення підлягають контролю якості, який проводиться шляхом фарбування контрольних К (+) та К (-) мазків.

Послідовність приготування та фарбування мазків має бути задокументована і знаходитися на робочому місці.

Кожна лабораторія повинна мати і періодично поповнювати набір контрольних мазків.

Після висушування та фіксації контрольні мазки зберігають у ємностях для зберігання скелець, відповідно промаркованих «Нефарбовані контрольні мазки (+)», «Нефарбовані контрольні мазки (-)».

Для дотримання методики фарбування обов'язково використовують таймер.

Позитивний контроль К (+) використовується для контролю якості барвників і дотримання методики фарбування. Негативний контроль К (-) підтверджує, що реактиви, розчини барвників, дистильована вода та імерсійна олія не контаміновані КСП чи артефактами.

Перед переглядом мазків, приготування із клінічного матеріалу, досліджують пофарбовані контрольні позитивні та негативні мазки.

Мазки, приготувані з клінічного матеріалу, пофарбовані за Цілем-Нільсеном, не повинні досліджуватись у разі, якщо:

у позитивному контрольному мазку К (+) не знайдені КСБ;

у негативному контрольному мазку К (-) знайдені КСБ;

недостатнє знебарвлення фону (рожевий мазок).

У разі виникнення зазначеної ситуації всі реагенти, барвники, дистильовану воду та імерсійну олію замінюють на щойно приготовлені (або новий комерційний набір барвників), ретельно обробляють об'єкти мікроскопа, а партію мазків не досліджують, а готують нові препарати. Якщо клінічний матеріал не залишився, то повідомляють у клінічні відділення з метою доставки в лабораторію повторних зразків біологічного матеріалу від цих пацієнтів.

У мікроскопічному пункті усі переглянуті мазки, незалежно від результату, підлягають зберіганню. Для цього після закінчення дослідження видаляють залишки імерсійної олії з препарату та поміщають їх у спеціально призначені для цього коробки-контейнери для зберігання переглянутих препаратів у тому самому порядку, в якому їх зареєстровано в лабораторному журналі, та відповідно промарковано. Негативні мазки зберігаються упродовж трьох місяців для перевірки «наосліп». Позитивні мазки зберігають упродовж шести місяців.

У спеціалізованих бактеріологічних лабораторіях ПТЗ зберігають позитивні мазки впродовж шести місяців.

З метою запобігання видачі хибнопозитивного результату позитивні мазки перед реєстрацією та видачею до закладу, що направив матеріал, мають бути переглянуті іншим, досвідченішим, спеціалістом лабораторії або завідувачем для колегіального рішення щодо позитивності цього мазка та визначення градації позитивного результату.

Інформацію про результат бактеріоскопічного дослідження направляють лікарю (у відділення) не пізніше ніж за 24 год після отримання біологічного матеріалу. Потрібно враховувати, що зібране мокротиння може зберігатись у холодильнику на пункті збирання мокротиння до 5 діб, але має бути досліджене протягом однієї доби після доставлення його до лабораторії.

2. З метою вдосконалення якості бактеріоскопічних досліджень, виявлення та усунення недоліків у роботі конкретної лабораторії потрібно систематично щокварталу аналізувати отримані результати, враховуючи частоту одержання позитивних результатів. Завідувач лабораторією в довільній формі описує результати за квартал, зазначаючи частку доставлених неякісних проб мокротиння (слина), частку хворих, виявлених методом бактеріоскопії, кратність обстеження хворих тощо. Така інформація зберігається в лабораторії для внутрішньолабораторного контролю бактеріоскопії та своєчасного виявлення проблем.

Аналізуючи частоту одержання позитивних результатів, порівнюють загальну кількість досліджених проб від пацієнтів з підозрою на ТБ із кількістю позитивних результатів бактеріоскопії.

Причиною значних відхилень від попередніх показників роботи лабораторії (зменшення або збільшення кількості позитивних результатів) може бути як удосконалення роботи лікувального закладу в цілому щодо виявлення нових випадків ТБ, так і поява недоліків у роботі закладу: неправильний відбір пацієнтів на бактеріоскопічне обстеження, порушення правил збирання і транспортування клінічних зразків до лабораторії, неякісні барвники та реагенти, порушення лабораторних методик, високе навантаження персоналу лабораторії.

Особливу увагу слід звертати на випадки отримання позитивних результатів під час дослідження кількох послідовних мазків. Причиною може бути внутрішньолабораторне забруднення препаратів під час їх приготування, фарбування чи мікроскопії.

3. ЗКЯ бактеріологічних (культуральних) досліджень - процес ефективного та систематичного внутрішнього моніторингу всіх маніпуляцій, що проводяться в лабораторії, яка здійснює культуральні дослідження. Контроль якості має гарантувати, що результати досліджень у лабораторії є точними, належними й порівнянними. Це досягається за допомогою оцінки якості зразків біологічного матеріалу, ретельності їх деконтамінації, правильності виділення та ідентифікації культур, якості реагентів і живильних середовищ та стану ЗВТ і обладнання, а також систематичного аналізу результатів культуральних

досліджень і документального підтвердження правильності використання методів. Для контролю якості живильних середовищ та лабораторних процедур використовують мінімальний набір тест-штамів ([додаток 14](#)).

На якість доставленого біологічного матеріалу впливають умови його зберігання.

Мокротиння може зберігатися в умовах холодильника до 5 діб після збирання. Якщо такої можливості немає, матеріал можна заморожувати за температури -20°C з наступним однократним розморожуванням. Але слід пам'ятати, що для попередження високого рівня контамінації матеріал для бактеріологічного дослідження потрібно якомога швидше доставити до лабораторії.

4. Для приготування яєчних щільних живильних середовищ (Левенштейна-Єнсена, Фінна-II) використовують свіжі курячі яйця (яким не більше ніж 7 днів), із цілою незабрудненою шкаралупою.

Температура та час згортання яєчних середовищ підлягають обов'язковому контролю за допомогою повірених максимальних термометрів. Результати контролю вносять до журналу або листа контролю роботи коагулятора, який ведуть у довільній формі, відображаючи інформацію про дату контролю, температуру та тривалість коагуляції за підписом відповідальної особи.

Готове яєчне середовище оцінюють візуально: колір, консистенція, наявність забруднення.

За відсутності візуально виявлених дефектів партію приготовлених яєчних середовищ перевіряють на стерильність та на ростові властивості.

Приготовлене яєчне середовище зберігають у холодильнику не довше ніж 4 тижні.

Для отримання якісного середовища і запобігання його забрудненню сторонньою мікрофлорою рекомендують виконувати такі основні правила:

- приміщення, де готують живильні середовища, утримують у максимальній чистоті. Рекомендовано регулярно мити підлогу з додаванням дезінфікуючого засобу, а також протирати дезінфектантом обладнання та робочі поверхні. Перед приготуванням середовищ потрібно обробити приміщення УФ-променями;

- розливати середовища слід у ШББ 2 класу. Використовувати тільки стерильний посуд;

- використовувати точно зважені кількості реагентів;

- правильно проводити розведення розчинів: використовувати мірний посуд, доводити об'єм розчину по нижній межі меніска;

- постійно контролювати температуру в згортувачі, не допускаючи перегріву середовищ у ньому;

- суворо дотримуватися правил асептики, обпалювати горло пробірок і колб;

- ретельно обробляти поверхню яєць перед їх розбиванням для приготування яєчної суспензії;

- не піддавати готове середовище дії УФ-променів. Зберігати готові середовища в темному місці, в умовах холодильника;

- рекомендовано розливати не менше ніж по $5,0\text{ см}^3$ середовища;

- проводити контроль якості кожної партії приготованих середовищ.

Можливі причини приготування неякісного середовища:

неякісні вихідні реагенти;

невідповідний термін придатності реагентів;
невідповідна якість яєць;
недотримання температурного режиму згортання середовища;
неякісна стерилізація посуду;
невідповідна якість кришок для пробірок (нещільне прилягання до пробірки);
порушення температури культивування в термостаті.

Чутливість живильного середовища перевіряється аналізом співвідношень:

позитивна мікроскопія від хворого супроводжується негативним результатом культурального дослідження (допускається до 2,0 %);

позитивна мікроскопія (3+) супроводжується ростом поодиноких (10-20) колоній (допускається 1,0-2,0 %).

Як усі мікробіологічні середовища, кров'яний агар, виготовлений у лабораторних умовах, підлягає контролю якості. У кожній новій серії приготованого середовища 1,0-3,0 % чашок (залежно від розміру партії) перевіряють на стерильність і ростові властивості. Для контролю ростових властивостей використовуються контрольні штами *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* (референс-штами).

Для зберігання в замороженому стані контрольних штамів *E. coli* та *S. aureus* приготувати густу суспензію культури у триптиказо-соевому або живильному бульйоні з гліцерином (15,0 %) і розлитому по 1,5 мл у підписані кріопробірки. Заморозити і зберігати за температури -70 °C.

Приготувати суспензію колоній зі щільного бактеріологічного середовища у стерильному ізотонічному розчині або стерильній дистильованій воді щільністю 0,5 McFarland (може бути використана розморожена суспензія, що є у наявності, і розведена до тієї самої щільності).

Зробити 100-кратне розведення, додаючи 10,0 мкл суспензії до 1,0 мл стерильного ізотонічного розчину або стерильної дистильованої води. Добре перемішати. Отримати розведення 10^{-2} .

Зробити ще одне 100-кратне розведення, помістивши 10,0 мкл із пробірки з розведенням 10^{-2} в 1,0 мл стерильного ізотонічного розчину або дистильованої води. Посіяти на чашку 100 мкл отриманого розведення 10^{-4} і розподілити по поверхні кров'яного агару для отримання ізольованих колоній.

Помістити в термостат на 48 год за температури 35-37 °C.

Таку саму кількість незасіяних чашок із кров'яним агаром помістити до термостата на 48 год за температури 35-37 °C для перевірки на стерильність.

Задовільними вважають такі результати: відсутність росту на незасіяних чашках і типовий ріст бактерій у чашках із посівами.

Результати контролю внести до Журналу контролю якості середовищ.

5. Кожну нову партію реагентів (бульйон Мідлбрука 7H9, ростова добавка MGIT 960 Supplement) перевіряють на якість під час отримання (вхідний контроль) та періодично (у разі збільшення кількості проростів) перед використанням. Контролюють термін придатності, проводять візуальний огляд пробірок на цілісність та наявність забруднень. Для роботи використовують лише цілі пробірки з прозорим бульйоном без сторонніх домішок із достатнім терміном придатності.

Для перевірки ростових властивостей рідкого середовища рекомендується використовувати контрольні штами: *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. fortuitum* ATCC 6841.

Підготовка суспензії культури:

використовують 10-15 добові культури вищевказаних штамів, вирощені на середовищі Левенштейна-Єнсена;

за допомогою стерильного аплікатора зняти з поверхні середовища всі колонії, не допускаючи знімання середовища;

обережно перенести зняту культуру до пробірки з кришкою, що герметично загвинчується, яка містить 4,0 мл стерильного бульйону Міддлбрука 7H9 (пробірка А);

приготувати суспензію, ретельно струшуючи пробірку з культурою на струшувачі-вортексі протягом 1-2 хв (мутність більше ніж 1,0 McF);

залишити суспензію на 20 хв для осадження великих часток;

за допомогою стерильної одноразової піпетки перенести надосадову рідину до стерильної скляної пробірки з кришкою, що герметично загвинчується (пробірка В);

залишити суспензію на 15 хв за кімнатної температури;

за допомогою стерильної одноразової піпетки перенести надосадову рідину до стерильної скляної пробірки з кришкою, що герметично загвинчується (пробірка С);

довести мутність суспензії в пробірці С до 0,5 McF, додаючи бульйон Міддлбрука або ізотонічний розчин хлориду натрію, добре перемішати. Це робоча суспензія для проведення контролю якості, яку можна розлити по 1,0-2,0 мл у кріопробірки та заморозити до температури -70 °С. Заморожена суспензія може використовуватись упродовж шести місяців. Не допускати повторного заморожування робочої суспензії.

Якщо суспензія була заморожена, її розморожують та використовують для контролю якості. Розморожена суспензія повторному заморожуванню не підлягає. Невикористані залишки мають бути знешкоджені.

Для приготування розведень замість стерильної дистильованої води можна використовувати стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію.

Порядок приготування:

розвести робочу суспензію (0,5 McF), щойно приготовлену або розморожену, у співвідношенні 1 : 5 (до 1,0 мл суспензії додати 4,0 мл стерильної дистильованої води), ретельно перемішати (пробірка 1);

розвести ще два рази у співвідношенні 1 : 10, додаючи 0,5 мл суспензії із пробірки 1 до 4,5 мл стерильної дистильованої води (пробірка 2). Ретельно перемішати і знову додати 0,5 мл із пробірки 2 до 4,5 мл стерильної дистильованої води. Ретельно перемішати. Остаточне розведення 1 : 500 (пробірка 3). Це останнє розведення *M. tuberculosis*, яке використовується для проведення контролю якості.

Розведення для *M. fortuitum* та *M. kansasii* готують аналогічно, крім того, для *M. fortuitum* потрібно додатково приготувати розведення із пробірки 3 у співвідношенні 1 : 10. Взяти 0,5 мл суспензії із пробірки 3 і додати 4,5 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішати. Остаточне розведення 1 : 5000 (пробірка 4). Для проведення контролю якості використовують вміст пробірки 4.

Для *M. kansasii* розвести вміст пробірки 4 ще раз у співвідношенні 1 : 10 додаючи 0,5 мл із пробірки 4 до 4,5 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішати. Остаточне

розведення 1 : 50000 (пробірка 5). Для проведення контролю якості використовують вміст пробірки 5.

Посів та інкубація:

додати до шести пробірок MGIT росту добавку Growth Supplement та суміш антибіотиків PANTA відповідно до методики;

засіяти до двох промаркованих пробірок MGIT по 0,5 мл суспензії *M. tuberculosis* H37Rv із пробірки 3. Так само засіяти до двох пробірок по 0,5мл суспензії *M. fortuitum* із пробірки 4 та до двох пробірок суспензії *M. kansasii* з пробірки 5. Ретельно перемішати;

помістити засіяні пробірки до апарата BACTEC MGIT 960. Після отримання позитивної індикації на апараті дістати пробірки. Оцінити дані після закінчення терміну, потрібного для отримання позитивного результату.

Очікувані результати:

M. tuberculosis - позитивна флуоресценція в пробірках через 6-10 днів;

M. fortuitum - позитивна флуоресценція в пробірках через 7-11 днів;

M. kansasii - позитивна флуоресценція в пробірках через 1-3 дні.

Якщо росту в зазначені терміни не отримано, дослідження з контролю якості повторюють. Якщо вдруге результати з контролю якості залишаються незадовільними, потрібно перевірити життєздатність суспензії, вік культури (якщо вона була заморожена) та інші процедури. Якщо всі параметри відповідають установленим специфікаціям, а результат тестування незадовільний, слід звернутися до сервісної служби компанії BD Diagnostic System.

Заходи безпеки:

усі процедури здійснюють у ШББ 2-го класу;

усі матеріали перед використанням має бути простерилізовано шляхом автоклавування;

усі процедури виконують із дотриманням вимог безпеки праці та протиепідемічного режиму.

6. Якість усіх реагентів, які використовуються для роботи в системі BACTEC MGIT 960, підлягає періодичному контролю, у тому числі NALC-NaOH та буфер. Для покращення контролю за контамінацією дуже важливо здійснювати негативний контроль для партії клінічних зразків. Цю процедуру потрібно виконувати залежно від обсягів роботи, але не рідше ніж 1 раз на тиждень. Періодично можна здійснювати позитивний контроль для перевірки швидкості росту мікроорганізмів.

Для негативного контролю використовують 5,0 мл фосфатного буфера, для позитивного - 5,0 мл суспензії *M. tuberculosis* H₃₇R, 0,5 McF, розведеної у співвідношенні 1:500. Проводять передпосівну обробку негативної та позитивної контрольних проб разом із клінічними зразками, використовуючи однаковий метод обробки. Засівають осаді до підготовлених пробірок MGIT та інкубують так, як і клінічні зразки.

Позитивний контроль повинен дати ріст, час детекції має бути в межах встановленого терміну для кожного тесту (ці параметри встановлюються після отримання кількох результатів тестування позитивного контролю).

Негативний контроль не повинен давати росту в межах повного періоду інкубації. Якщо негативний контроль дає флуоресценцію, треба перевірити його на наявність контамінації бактеріями. У разі підтвердження контамінації перевіряють усі процедури та реагенти з метою виявити джерело забруднення.

Необхідний облік:

реєструють номери партій усіх витратних матеріалів до апарату BACTEC MGIT;

аналізують дані: по кожній партії оброблених зразків, по кількості посівів, по персоналу, який виконував ці процедури, за часом появи флуоресценції, за результатами бактеріоскопії культур, за рівнем контамінації тощо;

порівнюють результати досліджень на BACTEC MGIT із результатами, отриманими на щільних середовищах.

7. Внутрішній контроль якості передпосівної обробки біологічного матеріалу. Більшість зразків біологічного матеріалу перед початком дослідження піддають спеціальній обробці, потрібній для розрідження проби та її деконтамінації з метою знищення небажаної мікрофлори.

Процес гомогенізації та деконтамінації потрібно чітко контролювати. У разі неправильного його виконання більшість мікобактерій загинуть або, навпаки, буде занадто багато проростів іншими бактеріями. Тому лабораторії мають відслідковувати результати процедури за допомогою ведення обліку рівня контамінації посівів. Як правило, частота контамінації (кількість проростів) в лабораторіях, що проводять мікробіологічні дослідження проб, за культивування мокротиння на щільних яєчних середовищах становить до 3,0 %, але не більше ніж 5,0 %.

Для внутрішнього контролю якості розчинів деконтамінантів та дотримання процедури передпосівної обробки паралельно з обробкою зразків біологічного матеріалу пацієнтів застосовують одну з наступних методик - посів мокротиння, обробленого щойно приготовленим розчином для деконтамінації, на кров'яний агар та середовище Левенштейна-Єнсена виконують так:

стандартний зразок мокротиння ділять на дві порції, одна з яких не обробляється, а інша проходить передпосівну обробку відповідно до затвердженої методики одним із щойно приготовлених розчинів деконтамінанту, який застосовується в лабораторії;

до однієї чашки Петрі з кров'яним агаром засівають 2-4 краплі необробленого деконтамінантом мокротиння, до другої - 2-4 краплі мокротиння після деконтамінації;

до двох пробірок із середовищем Левенштейна-Єнсена засівають по 0,2 мл обробленого і необробленого деконтамінантом мокротиння;

інкубують у термостаті за температури 37 °С.

Комплексне оцінювання результатів за ростом на обох середовищах:

ріст на кров'яному агарі оцінюють через 24 год. Констатують наявність рясного росту на чашці з посівом мокротиння, яке не оброблялося деконтамінантом, та відсутність росту після обробки;

на середовищі Левенштейна-Єнсена констатують відсутність проросту в пробірці, де матеріал оброблявся та проріст посіву мокротиння, яке не проходило передпосівної обробки.

Якщо результати відповідають зазначеним, вважається, що деконтамінацію проведено якісно і ці розчини для деконтамінації якісні;

1) посів суспензії культури *M. fortuitum* 1 McF на кров'яний агар після обробки щойно приготовленим розчином для деконтамінації виконують так:

готують суспензію культури *M. fortuitum*, доводять мутність до 1 McF;

3,0 мл суспензії обробляють щойно приготовленим розчином одного з деконтамінантів відповідно до методики його застосування;

до однієї чашки Петрі з кров'яним агаром засівають 2-4 краплі необробленої деконтамінантом суспензії *M. fortuitum* 1 McF, до другої - 2-4 краплі суспензії *M. fortuitum* 1 McF після деконтамінації;

інкубують у термостаті за температури 37 °C протягом доби.

Оцінювання результатів: через 24 год на чашці Петрі з кров'яним агаром, де засіяна суспензія *M. fortuitum* 1 McF, після обробки деконтамінантом констатують ріст чистої культури (мономорфний ріст) *M. fortuitum* не менше ніж 70,0-80,0 % від росту без обробки;

2) посів штаму *M. tuberculosis* H37Rv на середовище Левенштейна-Єнсена після обробки щойно приготовленим розчином для деконтамінації виконують так:

готують бактеріальну суспензію густиною 1 McF штаму *M. tuberculosis* H₃₇R_v;

одну частину суспензії по 0,2 мл засівають до 3 паралельних пробірок із щойно приготовленим середовищем Левенштейна-Єнсена, решту - обробляють розчином для деконтамінації, відцентрифугуюють та по 0,2 мл засівають на інші 3 пробірки із середовищем Левенштейна-Єнсена;

інкубують у термостаті за температури 37 °C.

Оцінювання результатів: порівнюють інтенсивність росту. Ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена штаму *M. tuberculosis* H37Rv після обробки деконтамінантом має бути не менше ніж 70,0-80,0 % від росту без обробки.

Результати проведених тестів заносять до Журналу контролю якості розчинів для деконтамінації, який ведеться в довільній формі:

назва деконтамінанту (зазначити кількість відсотків);

дата приготування розчину;

кількість (л) приготовленого розчину;

матеріал, який береться для контролю (мокротиння, *M. fortuitum*, *M. tuberculosis* H₃₇R_v);

об'єкт, що контролюється (чашки з кров'яним агаром, пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена);

результат контролю якості деконтамінанту: придатний чи не придатний.

Контроль якості розчинів деконтамінантів та дотримання процедури передпосівної обробки біологічного матеріалу потрібно проводити з кожною новою партією приготовленого розчину для деконтамінації, але не рідше ніж 1 раз на тиждень.

Для попередження проростів розчини деконтамінантів слід розливати по 10,0 мл та додавати окремо до кожної проби біологічного матеріалу.

З метою контролю якості розчинів для деконтамінації та дотримання методики передпосівної обробки біологічного матеріалу аналіз проростів проводять щомісячно та вносять до звіту про роботу лабораторії.

Відсоток проростів обчислюється як відношення числа пробірок, що заросли, до всіх засіяних пробірок. Норма для посівів на щільні середовища має бути у межах 3,0-5,0 %. Цей показник потрібно систематично аналізувати (щомісячно, поквартально, за рік) з метою коригування процесу приготування деконтамінантів та процедури передпосівної обробки.

Показник нижче ніж 3,0 % вказує на:

високу концентрацію розчину деконтамінанту;

занадто тривалу експозицію з деконтамінантом;

занадто високу концентрацію малахітового зеленого в яєчному середовищі (високий відсоток малахітового зеленого затримує ріст мікобактерій).

Показник вище ніж 3,0 % вказує на:

незадовільні умови транспортування та зберігання біологічного матеріалу;

занадто тривалий період від збирання біологічного матеріалу до посіву;

занадто низьку концентрацію розчину деконтамінанту;

короткий час контакту матеріалу з деконтамінантом;

проблеми під час приготування середовища: нестерильні розчини, порушення режиму автоклавування тощо;

наявність забруднення в лабораторії. В цьому разі потрібно провести додаткову санобробку приміщень та обладнання лабораторії.

У разі виявлення проростів, обумовлених нижчими грибами, потрібно перевірити температуру культивування мікроорганізмів.

Результати оцінювання частки проростів - менш трудомісткий процес, ніж щоденний контроль якості з використанням контрольних штамів, проте він не дає можливості проводити оперативний контроль і виправлення недоліків деконтамінації відразу після їх виявлення, оскільки проводиться 1 раз на місяць. У цьому разі результати значної кількості зразків від пацієнтів можуть виявитися помилковими (хибнонегативними).

8. Внутрішній контроль якості ідентифікації виділених культур імунохроматографічними смужками. Під час кожної нової поставки наборів імунохроматографічних смужок здійснюють вхідний контроль з використанням тест-штамів позитивного та негативного контролю.

Кожну партію досліджень культур, виділених із діагностичного матеріалу, також супроводжують контролем.

У якості позитивного контролю використовують культуру *M. tuberculosis* H₃₇R_v, вирощену на рідкому середовищі, у якості негативного контролю може бути використана культура НТМБ, вирощена на рідкому середовищі, або незасіяне рідке середовище. Важливим показником тесту є внутрішній контроль.

Якість набору імунохроматографічних смужок або тестування досліджуваних культур вважають якісним, якщо отримано такі результати:

відслідковується чітка лінія внутрішнього контролю;

позитивний контроль (*M. tuberculosis* H₃₇R_v) має показати позитивний результат;

негативний контроль (НТМБ або незасіяний бульйон) має показати негативний результат.

Якщо якийсь контрольний результат неприйнятний, результатів тестування не видають. Потрібно провести повторні дослідження з новим (субкультивованим на рідкому середовищі) контрольним штамом. Якщо результати контролю будуть очікуваними, слід повторити тестування виділених культур.

9. Контроль якості ТМЧ потрібно проводити систематично.

Мінімальні вимоги: перевіряти кожен нову партію реагентів та кожен партію приготовленого середовища з ПТП, використовувати лише чисті субстанції ПТП. Кожну партію приготовленого щільного живильного середовища потрібно перевіряти на стерильність (інкубація в термостаті). Для кожної партії середовища під час тестування на чутливість клінічних зразків потрібно одночасно провести тест на чутливість контрольного штаму *M. tuberculosis* H₃₇R_v і штаму *M. Tuberculosis*, стійкого до препаратів 1-го ряду.

Якщо середовище з препаратами приготоване правильно, то МЧ контрольних культур (чутливого та стійкого) буде незмінною.

Якщо результати контролю якості партії реагентів та живильних середовищ незадовільні, всі результати, отримані під час роботи з цією партією, потрібно повністю переглянути, а дослідження повторити.

10. Перший раз посіви переглядають через 24 год, коли щільно закручують кришки для попередження висихання живильного середовища. Через 48 год посіви переглядають для контролю відсутності росту супутньої мікрофлори. Надалі посіви переглядають кожного тижня.

Якщо під час щотижневого перегляду посівів виявлено ріст контамінантів по всій поверхні живильного середовища або відбулося розрідження чи знебарвлення живильного середовища, такі пробірки видаляють із термостата та знешкоджують автоклавуванням. Деякі контамінанти із речовин, які входять до складу живильного середовища, здатні внаслідок метаболізму утворювати кислоту, що знижує рівень рН середовища та звільняє частину зв'язаного яєчним білком барвника (на це вказує поява темно-зеленого кольору середовища). Посіви з частково контамінованою поверхнею живильного середовища потрібно продовжувати інкубувати. Якщо проріст середовища з'явився пізно, не виключається можливість наявності там росту мікобактерій. В таких випадках рекомендується приготувати мазки з поверхні середовища для дослідження на КСБ. Якщо під час бактеріоскопії виявлені КСП, потрібно виконати повторну деконтамінацію матеріалу з такої пробірки та провести повторний посів.

Результат «Проріст» видається у випадку, якщо заросли всі паралельно засіяні пробірки з даного зразка біологічного матеріалу. Якщо є хоча б одна пробірка з посівом, на якій можна врахувати результат, відповідь «Проріст» не видається.

Ріст *M. tuberculosis* на щільному середовищі з'являється в середньому на 3-6 тиждень. Якщо отримано ріст культури, після попередньої ідентифікації (швидкість та температура росту, пігментоутворення, морфологія колоній, бактеріоскопія на КСП тощо) результати заносять до Форми ТБ Оба та направляють лікарю-фтизіатру як попереднє повідомлення про отримання росту культури, що за морфологічними ознаками схожа на мікобактерії, але остаточний результат може бути наданий після проведення повної ідентифікації та визначення ТМЧ до ПТП.

Результат посіву на щільне середовище повинен відображати не тільки якісну характеристику (позитивний чи негативний), але й кількісну оцінку (число колоній) відповідно до вимог чинних нормативних документів.

Більшість посівів дає ріст *M. tuberculosis* на щільному середовищі впродовж двох місяців. Тому інкубують посіви до 2,5 місяців. За відсутності росту впродовж 10 тижнів посів вважають негативним, пробірки видаляють і знешкоджують шляхом автоклавування.

11. З метою підвищення якості бактеріологічного дослідження, виявлення та усунення недоліків у роботі потрібно систематично 1 раз на квартал аналізувати отримані результати, щоб мати уяву про частоту одержання позитивних результатів, співвідношення результатів бактеріоскопічного та культурального досліджень, додатковий внесок культурального дослідження до бактеріоскопічного. Якщо під час цього будуть виявлені значні відхилення від середнього показника, потрібно визначити причину цього.

Щокварталу результати досліджень матеріалу від хворих на легеневий туберкульоз аналізують за показниками, які обчислюють від усіх досліджених проб ([додаток 15](#)).

За наявності значних відхилень від стандартного співвідношення, зазначеного вище, потрібно з'ясувати причину, яка може залежати від правильності організації роботи в лабораторії та від недоліків на долабораторному етапі.

Треба враховувати, що в різних населених пунктах та в різних медичних закладах це співвідношення може значно відрізнятись, тому потрібно в кожному конкретному випадку визначити середнє співвідношення для певної лабораторії та аналізувати причини будь-якого відхилення від нього.

12. У разі здійснення ВКЯ молекулярно-генетичних досліджень важливо дотримуватися вимог до кожного етапу організації таких досліджень.

Планувальні рішення та обладнання приміщення лабораторії (відділу) ПЛР-досліджень мають відповідати вимогам чинних нормативних документів. Особливо це важливо для лабораторій, які використовують методику гібридизації з типоспецифічними зондами. Невиконання вимог до організації ПЛР-лабораторії може призводити до отримання хибних результатів.

Обладнання для молекулярно-генетичних досліджень також має бути зареєстроване та дозволене до використання в Україні в установленому порядку. Воно потребує сервісного обслуговування, а окремі прилади - калібрування та метрологічної повірки або атестації.

Витратні пластикові матеріали потрібно використовувати тільки з маркуванням «вільні від РНК-аз та ДНК-аз», наконечники до дозаторів - тільки з аерозольним фільтром.

Категорично заборонено переносити будь-яке обладнання та витратні матеріали з одного робочого приміщення до іншого.

Забезпечення кожного приміщення окремим набором обладнання та витратних матеріалів значно знижує ризик перенесення контамінантів. Робочі приміщення, обладнання та всі предмети, котрих зазвичай торкаються руками (у тому числі дверні ручки, телефони, ручки холодильників та морозильних камер тощо) потрібно регулярно очищати з використанням відповідних мийних засобів та методів.

Ризик зараження суттєво можна знизити шляхом ретельної утилізації відходів.

Для контролю лабораторних процедур потрібно ретельно аналізувати отримані результати - експоненціальний ріст накопичення флуоресцентного сигналу, отримання профілів під час гібридизації, якість проходження контрольних зразків (позитивного, негативного, внутрішніх). Усі протоколи дослідження мають бути роздрукованими і зберігатися так, як інші робочі журнали у лабораторії. Крім паперових носіїв, копії протоколів виконаних досліджень накопичуються й архівуються в електронному вигляді.

У разі виникнення підозри на контамінацію у лабораторії потрібно використовувати референс-зразки та перевірені негативні зразки.

Для своєчасного виявлення контамінації у лабораторії потрібно систематично контролювати стан поверхонь та обладнання відповідно до чинних нормативних документів. У разі виявлення контамінації слід негайно припинити дослідження та вжити заходів з ліквідації такого становища. До роботи можна стати тільки після отримання відповідних результатів контрольних тестів якості здійсненої деконтамінації. Результати таких досліджень заносять до Журналу реєстрації контамінації ПЛР-лабораторії нуклеїновими кислотами, який ведуть у довільній формі.

13. Технологія з використання картриджів Xpert MTB/RIF передбачає проведення двох видів внутрішнього контролю кожного дослідження:

контроль екстракції та ампліфікації ДНК проби, а також можливого пригнічення ПЛР;

контроль якості зондів. Цей контроль здійснюється автоматично до початку ПЛР і дає змогу оцінити регідратацію реагентів, наповнення ПЛР пробірки, її цілісність, стабільність барвника та гасителя.

Контроль екстракції на ампліфікації потрібний для гарантії правильності проведення тесту, містить висушені спори *B. globigii* та включений до кожного картриджу, що забезпечує

верифікацію відповідності аналізу матеріалу на *M. tuberculosis*. Такий тест може підтвердити, що відбувся лізис *M. tuberculosis* (за їх наявності), і що аналіз проведений відповідно. Крім того, цей контроль виявляє інгібіцію ПЛР у реальному часі. Результат аналізу цього контролю має бути позитивним у разі отриманого негативного результату дослідження матеріалу і може бути негативним або позитивним у разі позитивного результату тестування клінічного матеріалу. Тест вважається пройденим, якщо результат задовольняє вказані валідовані критерії. Негативний результат дослідження не можна вважати достовірним за негативного результату тестування цього контролю.

Контроль якості зондів. Перед початком ПЛР прилад GeneXpert Dx вимірює інтенсивність вихідного рівня флуоресценції проби для оцінювання регідратації реагентів, наповнення пробірки, чистоти проби та стабільності барвника. Цей тест вважається пройденим, якщо результат задовольняє валідовані критерії.

Програмне забезпечення приладу дає змогу здійснювати моніторинг за результатами проходження зазначених внутрішніх контролів. Крім того, прилад дає змогу визначати інші помилки, що виникають під час виконання дослідження, і про всі помилки прилад сповіщає оператора. Таку інформацію слід аналізувати та вживати заходів для зменшення кількості помилок.

14. Для отримання достовірних результатів дослідження потрібно використовувати тільки зареєстровані та допущені до використання в Україні в установленому порядку обладнання, набори реагентів та витратні матеріали.

ПЛР з детекцією методом гібридизації з типоспецифічними зондами (лінійний зонд-аналіз) має високі ризики щодо контамінації реагентів, проб, витратних матеріалів, тому потрібно суворо дотримуватися вимог щодо організації роботи молекулярно-генетичними методами, викладених у чинних нормативних документах, а також інструкцій виробника наборів реагентів.

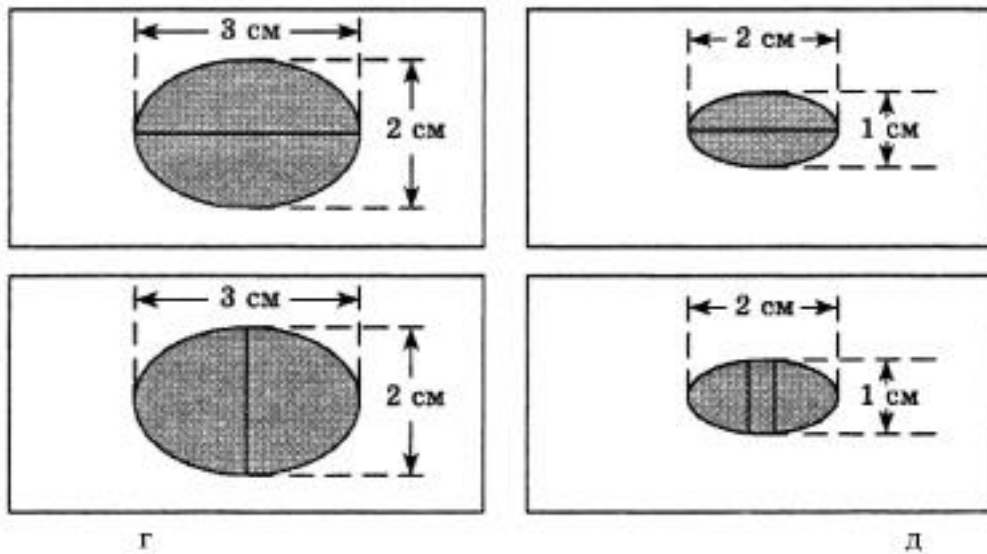
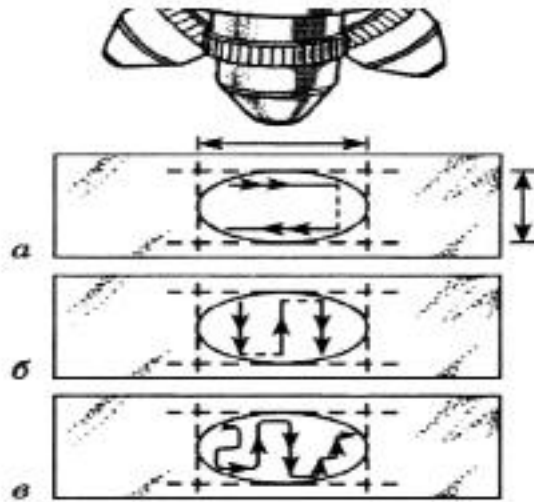
Крім того, використання позитивних та негативних контролів для кожної постановки, внутрішніх контролів для кожної проби та ретельний аналіз отриманих результатів дає можливість уникнути хибних результатів та своєчасно виявити і ліквідувати проблеми в лабораторії. Гарантією достовірних результатів дослідження є отримання передбачуваного очікуваного результату тестування контролів.

Якщо дослідження контрольних мішеней дали несподівані результати, видати підтверджений результат про дослідження клінічного матеріалу неможливо, потрібно повторити дослідження.

Генеральний директор Директорату громадського здоров'я	А. Скіпальський
---	------------------------

	Додаток 1 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 6 розділу III)
--	--

ПЕРЕГЛЯД
мазка під час мікроскопічного дослідження



а, б - правильно; в - неправильно; г - одна горизонтальна лінія (3,0 см) = 150 п/з; одна вертикальна (2,0 см) = 100 п/з; д - одна горизонтальна лінія (2,0 см) = 100 п/з; дві вертикальні (по 1,0 см) = 100 п/з.

	Додаток 2 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 7 розділу III)
--	--

ГРАДАЦІЯ
результатів мікроскопічного дослідження під час забарвлення за
методом Ціля-Нільсена

Кількість кислотостійких бактерій	Найменша кількість імерсійних полів зору, обов'язкових для перегляду	Форма запису результатів	Інтерпретація результатів дослідження
КСБ не виявлено	300	Негативний	Негативний

1-2 КСБ у препараті	300	Рекомендовано повторити дослідження	Результат не оцінюється
Від 3 до 9 КСБ у 100 полях зору	100	Зазначати точну кількість у полях зору (3-9 КСБ у 100)	Позитивний
Від 10 до 99 КСБ у 100 полях зору	100	1+	Позитивний
Від 1 до 10 КСП у 1 полі зору	50	2+	Позитивний
Більше ніж 10 КСБ у 1 полі зору	20	3+	Позитивний

	Додаток 3 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 2 розділу VI)
--	--

ВЛАСТИВОСТІ мікобактерій і споріднених таксонів

Властивість мікроорганізмів	Мікобактерії	Нокардії	Родококки	Коринебактерії
Морфологія	Палички	Міцелій, що в подальшому фрагментується на палички і коки, повітряний міцелій	Мізерний міцелій, що фрагментується на палички і коки	Поліморфні палички
Швидкість росту, у днях	2-40	1-5	1-3	1-2
Кислотостійкість	Повна	Часткова	Часткова	Слабка
Ступінь забарвлення (за Грамом)	Слабка	Сильна	Сильна	Сильна

	Додаток 4 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 11 розділу VI)
--	---

КЛЮЧОВІ ТЕСТИ
для диференціації окремих видів мікобактерій

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

	Гідроліз твіну-80	-
<i>M. gordonae</i> (<i>M. aquae</i>)	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	-
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	+

	Додаток 5 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 11 розділу VI)
--	--

ОСНОВНІ ТЕСТИ
для відрізнення *M. tuberculosis*, *M. bovis* від інших мікобактерій

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

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

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

І група - фотохромогенні мікобактерії

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

<i>M. marinum</i>	+	±	-	-	-
-------------------	---	---	---	---	---

Для розрізнення всередині групи потрібно провести такі тести:

на утворення пігменту;

на гідроліз твіну-80;

на ніацинову пробу (*M. simiae* ±);

на відновлення нітратів, на ріст за температури +25 °С +37 °С.

II група - скотохромогенні мікобактерії

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

III група - нефотохромогенні мікобактерії (основні тести)

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

M. terrae Вайна - 0; *M. terrae* Тсукамура - Н, П; Н - нікотинамід, П - піразинамід, 0 - негативна реакція.

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

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

Додаток 6
до Інструкції з мікробіологічної
діагностики туберкульозу
(пункт 3 розділу VII)

ПЕРВИННА ідентифікація мікобактерій

Види мікобактерій	Швидкість росту	Пігментація колоній	Ріст за температури		Відновлення нітратів	Деградація саліцилату натрію
			+22 °C	+45 °C		
<i>M. avium M. intracellulare</i>	П	Н	+	+	-	-
<i>M. xenopi</i>	П	С	-	+	-	-
<i>M. kansasii</i>	П	Ф	+	-	+	-
<i>M. malmoense</i>	П	Н	+	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	П	С	+	-	+	-
<i>M. gordonae</i>	П	С	+	-	-	-
<i>M. terrae complex</i>	П	Н	+	-	+	-
<i>M. fortuitum</i>	Ш	Н	+	-	+	+
<i>M. chelonae</i>	Ш	Н	+	-	-	+
<i>M. flavescens</i>	Ш	С	+	-	+	-

П - повільнозростаючі, Ш - швидкозростаючі, С - скотохромогенні, Ф - фотохромогенні, Н - нехромогенні.

Додаток 7
до Інструкції з мікробіологічної
діагностики туберкульозу
(пункт 4 розділу VIII)

СТАНДАРТ мутності МакФарланда (1 McF)

Одиниці мутності за стандартом МакФарланда	Число мікробних тіл (мл)	Кількість 1,0 % розчину BaCl ₂ × 2H ₂ O (мл)	Кількість 1,0 % розчину H ₂ SO ₄ (мл)
--	--------------------------	--	---

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

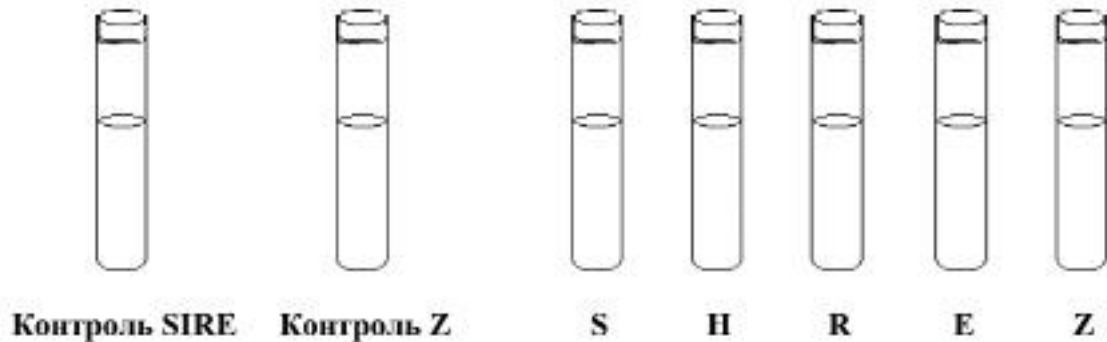
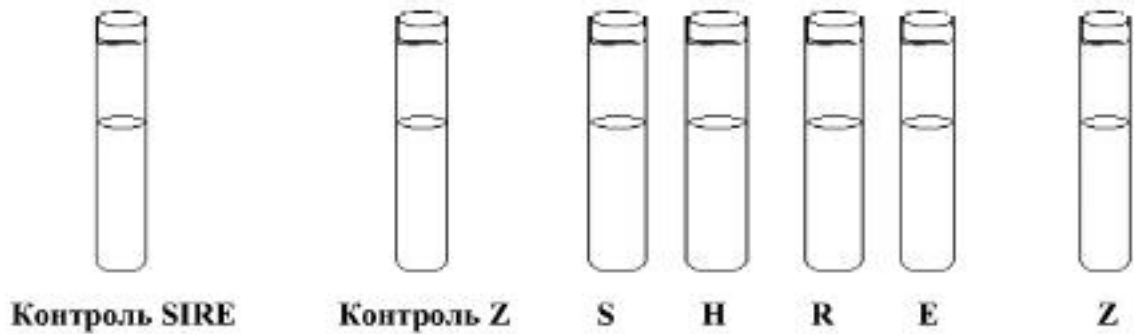
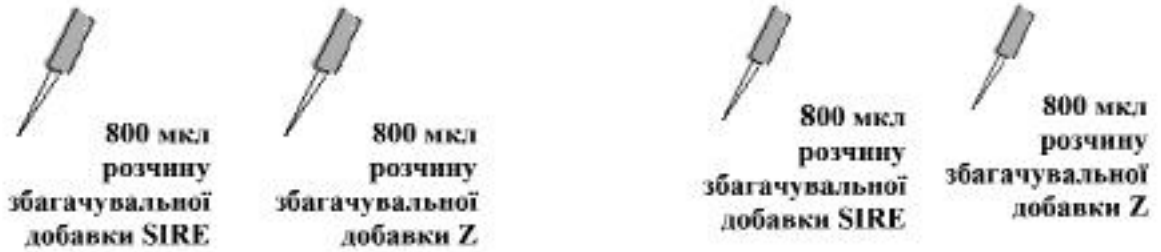
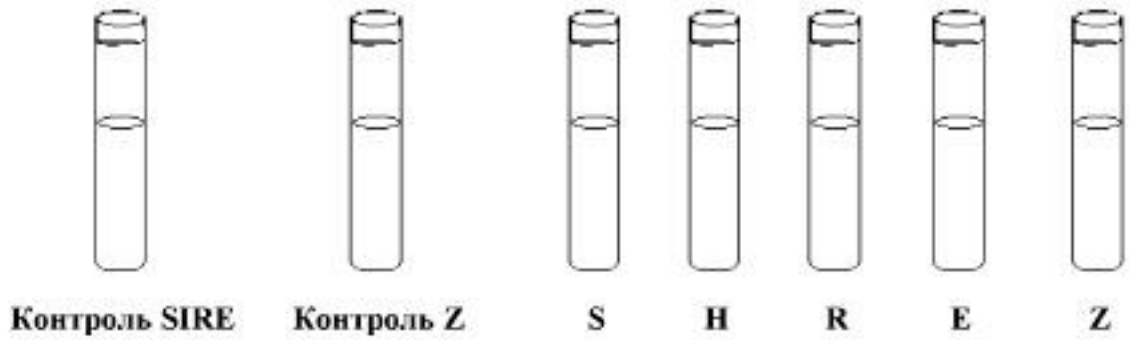
	Додаток 8 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 4 розділу VIII)
--	---

**ПРОЦЕДУРА
приготування суспензії**

1	1 : 10 (10^{-1})	4,5 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,5 мл суспензії 1 McF	
2	1 : 100 (10^{-2})	контроль 1 (К ₁)	4,5 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,5 мл розведення 1
3	1 : 1 000 (10^{-3})	4,5 мл 0,9 % розчину NaCl + 0,5 мл розведення 2	
4	1 : 10 000 (10^{-4})	контроль 2 (К ₂)	4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl + 0,5 мл розведення 3

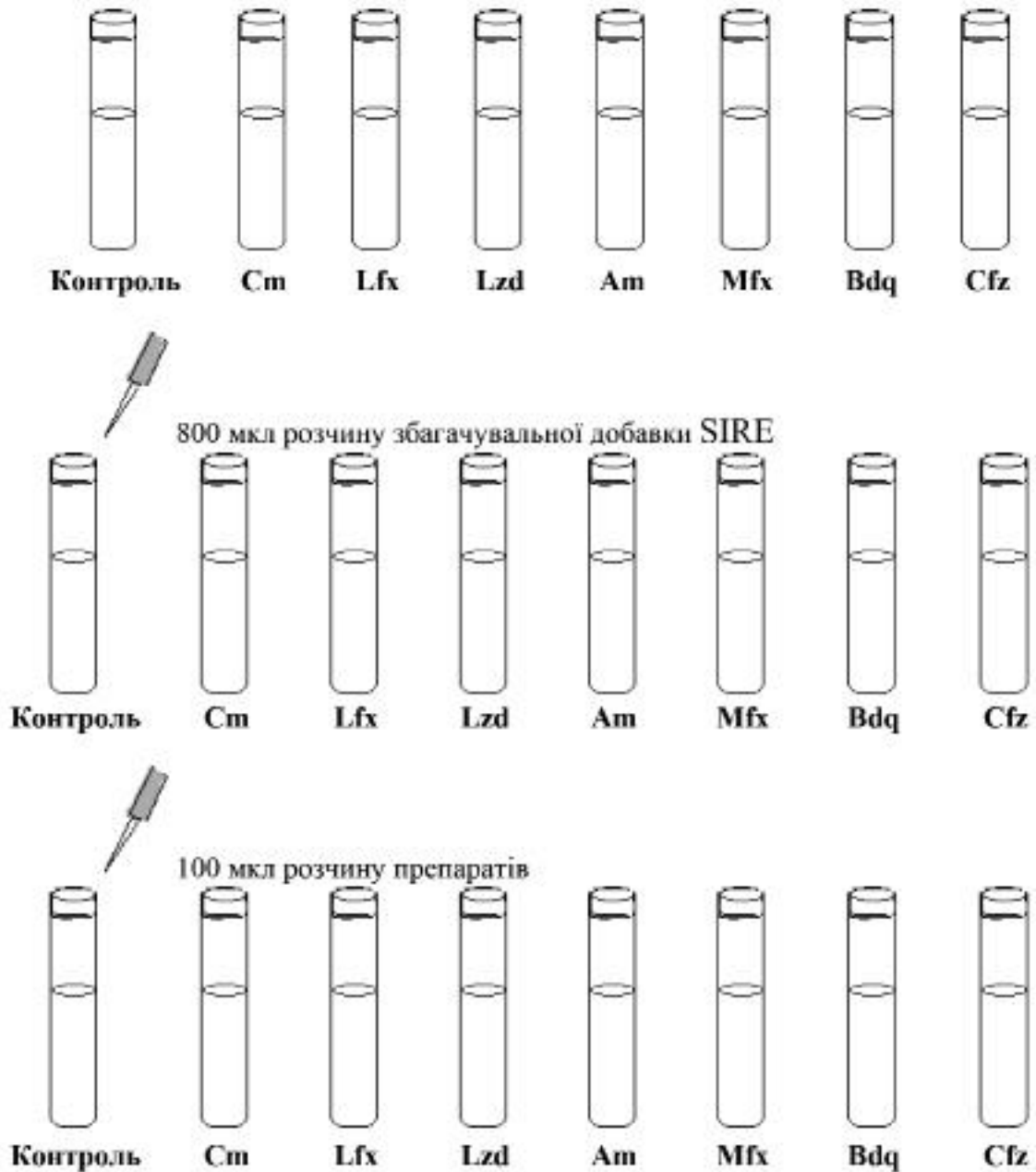
	Додаток 9 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 7 розділу VIII)
--	---

**РОЗЧИНЕННЯ
препаратів першого ряду і підготовка пробірок із рідким
середовищем для постановки ТМЧ**



	<p>Додаток 10 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 8 розділу VIII)</p>
--	--

**РОЗЧИНЕННЯ
препаратів другого ряду і підготовка пробірок із рідким середовищем
для постановки ТМЧ**



Додаток 11
до Інструкції з мікробіологічної
діагностики туберкульозу
(пункт 9 розділу VIII)

ПОСТАНОВКА

ТМЧ для одного штаму *M. tuberculosis* до препаратів I та II ряду

Додаток 12
до Інструкції з мікробіологічної
діагностики туберкульозу
(пункт 10 розділу VIII)

ПРОВЕДЕННЯ

ТМЧ із культури віком 1-2 дні

	Додаток 13 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 11 розділу VIII)
--	---

ПРИГОТУВАННЯ
суспензії мікобактерій, що були культивовані на щільних
середовищах для постановки ТМЧ MGIT

	Додаток 14 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 3 розділу X)
--	---

МІНІМАЛЬНИЙ НАБІР ТЕСТ-ШТАМІВ

Назва тест-штаму	Призначення	Примітки
<i>M. tuberculosis</i> H ₃ R, ATCC 27294	Для контролю: · ростових властивостей середовища Левенштейна-Єнсена, бульйону Міддлбука 7Н9; · якості деконтамінації; · культуральних та біохімічних тестів ідентифікації.	Позитивний контроль
	· ростових властивостей Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм або ПНБК.	Негативний контроль
<i>M. kansasii</i> ATCC 12478	Для контролю ростових властивостей бульйону Міддлбука 7Н9	Позитивний контроль
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	Для контролю ростових властивостей бульйону Міддлбука 7Н9, якості деконтамінації	Позитивний контроль
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Для контролю ростових властивостей кров'яного агару	Позитивний контроль
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Для контролю ростових властивостей кров'яного агару	Негативний контроль

	Додаток 15 до Інструкції з мікробіологічної діагностики туберкульозу (пункт 11 розділу X)
--	--

ПОКАЗНИКИ,
які обчислюють від усіх досліджених проб

Культура (+)	Відсоток від усіх досліджених
Із них:	
мікроскопія (+), культура (+)	становлять більшість
мікроскопія (-), культура (+)	20,0-40,0 %
мікроскопія (+), культура (-)	до 1,0 % за ТБ у хворих, які не отримували ПТП
мікроскопія (+), культура (проріст)	3,0 %
мікроскопія (-), культура (-)	відсутні

Публікації документа

- **Офіційний вісник України** від 01.11.2019 — 2019 р., № 84, стор. 293, стаття 2864, код акта 96514/2019

