

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
“НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ  
ІМЕНІ Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ”

**СТАНДАРТИ**  
**ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ**  
**МІКОБАКТЕРІЙ ДО ПРЕПАРАТІВ 1-го ТА 2-го РЯДУ**  
**НА РІДКОМУ ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ**  
**ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СИСТЕМИ MGIT**  
(методичні рекомендації)

Київ – 2011

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
“НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ  
ІМЕНІ Ф. Г. ЯНОВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ”

“УЗГОДЖЕНО”  
Начальник лікувально-  
організаційного управління  
НАМН України

“УЗГОДЖЕНО”  
Директор  
Департаменту розвитку медичної  
допомоги  
МОЗ України

В. В. Лазоришинець

М. К. Хобзей

---

“\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2011 р.

“\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2011 р.

**СТАНДАРТИ**  
**ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ**  
**МІКОБАКТЕРІЙ ДО ПРЕПАРАТІВ 1-го ТА 2-го РЯДУ**  
**НА РІДКОМУ ЖИВИЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ**  
**ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СИСТЕМИ MGIT**  
(методичні рекомендації)

**Заклад-розробник:**

Державна установа “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”

**Укладачі:**

Журило Олександр Анатолійович – зав. лабораторією мікробіології ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, д-р. мед. наук, доцент, (044) 270 – 35 – 41

Барбова Анна Іванівна – ст. наук. співроб. лабораторії мікробіології ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, керівник Референс лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України, канд. мед. наук, (044) 270 – 35 – 41

Миронченко Світлана Віталіївна – мол. наук. співроб. лабораторії мікробіології ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, (044) 270 – 35 – 41

Юнацька Оксана Вячеславівна – мол. наук. співроб. лабораторії мікробіології ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, (044) 270 – 35 – 41

**Рецензенти:**

Кужко М. М., зав. відділом фтизіопульмонології Державної установи “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, д-р мед. наук, професор

Поліщук О. І., зав. лабораторією медичної мікробіології з музеєм патогенних для людей мікроорганізмів ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського АМН України”, д-р мед. наук, професор

**Голова профільної проблемної комісії МОЗ та НАМН України** – академік НАМН України, доктор медичних наук, професор Ю. І. Фещенко.

**Голова експертної комісії** – доктор медичних наук, професор В. М. Мельник.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	С. 5
ВСТУП	
Новий напрямок у діагностичному тестуванні туберкульозу та визначенні медикаментозної стійкості мікобактерій в Україні .....	6
1 Загальні вимоги по техніці безпеки.....	8
2 Дослідження медикаментозної стійкості мікобактерій у системі MGIT ..	8
2.1 Розчинення препаратів 1-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки ТМС.....	9
2.2 Розчинення препаратів 2-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки ТМС .....	11
2.3 Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування в пробірці MGIT) для постановки посіву на ТМС в рідкому середовищі в системі MGIT .....	14
3 Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування на щільних середовищах) для постановки ТМС в рідкому середовищі в системі MGIT .....	16
3.1 Інокуляція й інкубація.....	18
РЕЗЮМЕ.....	22
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА .....	23

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АМБП	– антимікобактеріальні препарати,
добавка SIRE	– ростова добавка у пробірки з S, H, R, E і SIRE контроль при постановці ТМС,
добавка PZA	– ростова добавка у пробірки з Z й Z контроль при постановці ТМС до піразинаміду,
М	– моль,
мкл	– мікролітр,
мл	– мілілітр,
об/хв. (G)	– обертів за хвилину,
сек.	– секунд,
ТМС	– тест медикаментозної стійкості,
хв.	– хвилинка,
МС	– медикаментозна стійкість,
DMSO	– димексид,
MGIT	– автоматизована система, яка призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу й визначення чутливості мікобактерій до різних препаратів першого ряду й препаратів резерву,
MGIT Growth Supplement	– збагачувально-ростова добавка,
NaCl	– хлорид натрію,
добавка PANTA	– добавка з антибіотиками для пригнічення росту сторонньої мікрофлори,
pH	– градієнт концентрації іонів водню в речовині,
H	– ізоніазид,
R	– рифампіцин,
E	– етамбутол,
Z	– піразинамід,
S	– стрептоміцин,
Am	– амікацин,
Et	– етіонамід,
Сm	– капреоміцин,
Ofx	– офлоксацин.

## ВСТУП

НОВИЙ НАПРЯМОК У ДІАГНОСТИЧНОМУ ТЕСТУВАННІ  
ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА ВИЗНАЧЕННІ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ  
МІКОБАКТЕРІЙ В УКРАЇНІ

Однією з основних цілей ефективної боротьби з туберкульозом є якісне визначення медикаментозної стійкості (МС) мікобактерій, розвиток якої може бути обумовлений впливом різних факторів, що лежать в основі програмної діяльності та пов'язаних з роботою постачальників медичних послуг і позицією самого пацієнта. До відомих детермінантів розвитку стійкості до антимікобактеріальних препаратів (АМБП) слід віднести нерегулярні поставки препаратів, їх незадовільну якість, помилки клініцистів при призначенні медикаментозного лікування і недотримання хворим встановленого курсу лікування. Подальша передача резистентних мікобактерій може мати місце через неадекватність інфекційного контролю.

Для остаточної бактеріологічної верифікації діагнозу “туберкульоз” необхідно виділити та ідентифікувати *M. tuberculosis* і здійснити серію тестів для визначення їх МС. Щоб скористатися загальноприйнятими методами, встановити факт росту мікобактеріальної популяції, визначити видову приналежність *M. tuberculosis* та МС, може знадобитися не один тиждень або навіть місяці.

Загальнодоступні методи визначення МС до АМБП 1-го ряду досконально вивчені, при цьому був досягнутий консенсус щодо відповідних методологій, критичним концентраціям препаратів та достовірності і відтворюваності результатів тестування. З іншого боку, у результаті проведення вибіркового обстеження діючої практики відносно МС до препаратів 2-го ряду були виявлені істотні відмінності стосовно методів тестування, критичних концентрацій препаратів і гранично допустимих пропорцій для виявлення резистентності. На цій підставі достовірність досліджень МС до препаратів 2-го

ряду була поставлена під сумнів і стала очевидною крайня необхідність в стандартизації методів, встановлення критеріїв визначення резистентності та проведення професійного тестування.

Країнам, що ставлять перед собою завдання впровадження програм діагностики та лікування хіміорезистентного туберкульозу, потрібні стратегічні рекомендації щодо раціонального використання методів визначення МС, особливо до препаратів 2-го ряду.

Система MGIT призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення МС мікобактерій до різних препаратів 1-го ряду й препаратів резерву. У системі застосовуються пробірки з рідким живильним середовищем Middlebrook 7H9. Для стимуляції росту мікобактерій і пригнічення росту сторонньої мікрофлори використовуються добавки PANTA (суміш антибіотиків) і добавки, що збагачують середовище. Постановку тесту медикаментозної стійкості (ТМС) до АМБП 1-го ряду здійснюють за допомогою стандартного набору SIRE – для визначення чутливості до стрептоміцину (S), ізоніазиду (N), рифампіцину (R), етамбутолу (E) і PZA – для визначення чутливості до піразинаміду (Z).

Дія системи заснована на реєстрації флюоресценції, що виникає при поглинанні зростаючими мікобактеріями кисню із пробірок. Флюорохром утримується на дні пробірки, яке вироблено із силікону. Спочатку концентрація кисню в середовищі досить велика, що викликає гасіння флюоресценції. При наявності мікобактерій і їх наступному рості концентрація кисню в середовищі зменшується, що викликає посилення флюоресценції. Флюоресценція стає видимою при опроміненні пробірки ультрафіолетовим світлом і автоматично реєструється фотодатчиками, вмонтованими в прилад MGIT.

Вперше в Україні пропонується методика постановки ТМС до АМБП 2-го ряду з застосуванням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі MGIT. Наведені “критичні” концентрації до капреоміцину, офлоксацину, етіонаміду і амікацину.

## 1 ЗАГАЛЬНІ ВИМОГИ ПО ТЕХНІЦІ БЕЗПЕКИ

При роботі з системою MGIT необхідно дотримуватися наступних правил техніки безпеки:

а) будь-які процедури з використанням відкритих пробірок та інших контейнерів з матеріалом повинні проводитися в ламінарному боксі;

б) перед переміщенням за межі лабораторії будь-який матеріал повинен піддаватися автоклавуванню або знезаражуватися іншим способом;

в) кількість процедур, при яких можливо утворення аерозолів, необхідно звести до мінімуму. Всі вони повинні проводитися в ламінарному боксі.

Прийом матеріалу, первинна обробка зразків, мікроскопія мазків і посів на щільні живильні середовища та одержання первинної культури мікобактерій за допомогою системи MGIT проводиться згідно з методичними рекомендаціями “Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій”, Київ, 2007.

## 2 ДОСЛІДЖЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ СТІЙКОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ У СИСТЕМІ MGIT

Визначення МС виділених культур *M. tuberculosis* у вперше виявлених хворих та хворих на рецидив туберкульозу легень необхідно обов'язково проводити до S, H, E, R і Z. У випадку наявності МС до цих препаратів або до H та R рекомендується проведення ТМС до етіонаміду (Et), амікацину (Am), капреоміцину (Cm) та фторхінолонам (офлоксацину) (Ofx)).

У хворих з повторним курсом лікування (невдале лікування та лікування після перерви) і хворих з хронічним перебігом туберкульозу необхідно проводити визначення МС *M. tuberculosis* до всіх препаратів одразу ж з урахуванням результатів попередніх досліджень.

ТМС в системі MGIT повинні проводитися за наступною схемою:



а) позитивний результат в системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура MGIT → TMC MGIT

б) позитивний результат в системі MGIT + негативний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура MGIT → TMC MGIT

в) негативний результат на системі MGIT + позитивний результат на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Культура Левенштейна-Єнсена → TMC MGIT

2.1 Розчинення препаратів 1-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки TMC

Всі процедури здійснюються в ламінарному боксі!

Стандартні концентрації препаратів для використання в системі MGIT (мкг/мл): S – 1,0; H – 0,1; R – 1,0; E – 5,0; Z – 100,0.

Схема процедур:

а) розчинити препарати (постачаються ліофілізованими у флаконах) шляхом додавання 4,0 мл стерильної дистильованої води у флакони з S, H, R і E; додати 2,5 мл води у флакон з Z;

б) промаркувати пробірки, вказуючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки:

– для постановки одного TMC мікобактерій до препаратів 1-го ряду необхідно підготувати 7 пробірок (рис. 2.1): 1 пробірка – контроль SIRE, 1 пробірка – контроль Z, 5 пробірок із препаратами;

в) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок у пробірки із препаратами й контрольні пробірки (добавку PZA – у пробірку з Z й Z контроль; добавку SIRE – у пробірки з S, H, R, E і SIRE контроль) (рис. 2.2);

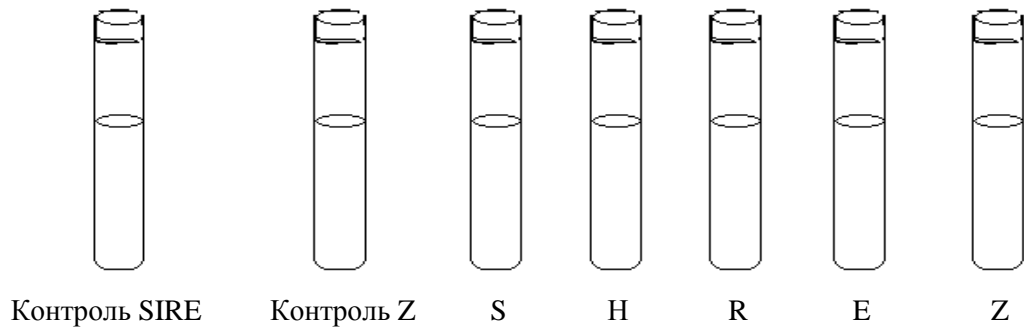


Рис. 2.1 – Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 1-го ряду

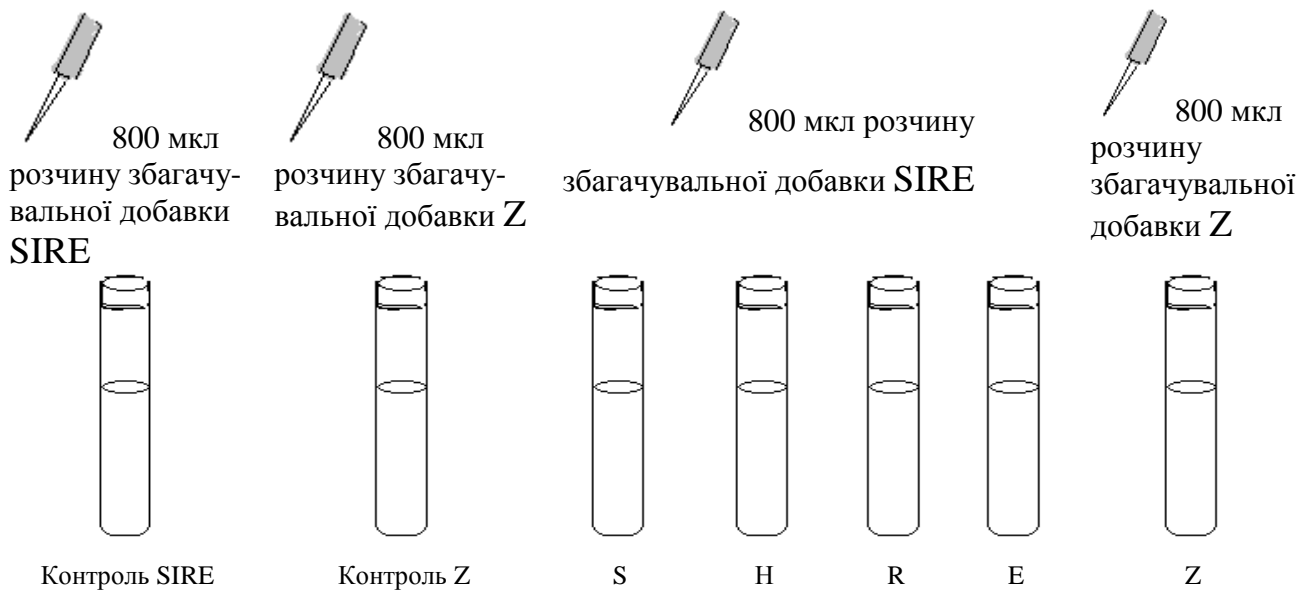


Рис. 2.2 – Додавання добавок, що збагачують середовище, у пробірки

г) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (S, H, R, E і Z – у відповідні марковані пробірки MGIT (рис. 2.3);

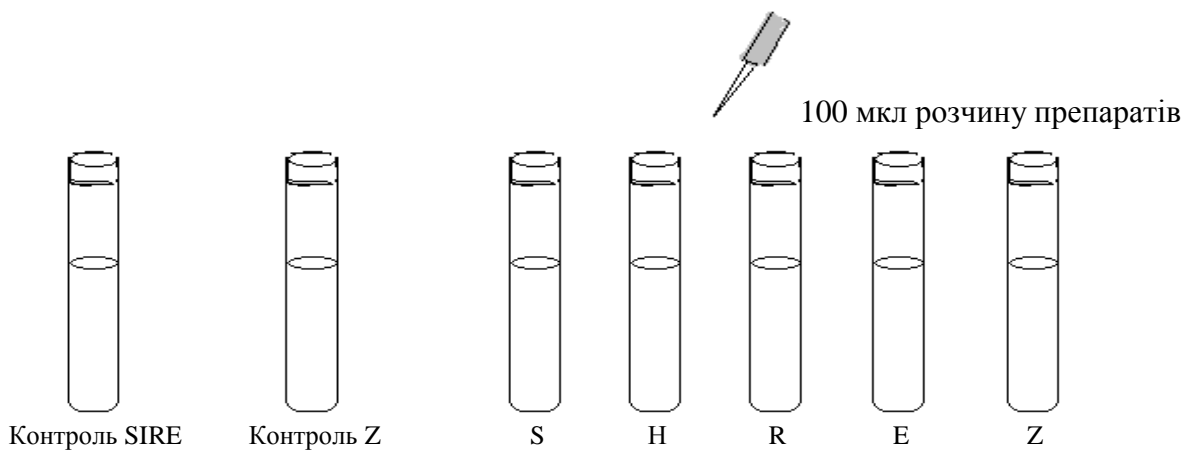


Рис. 2.3 – Додавання препаратів 1-го ряду у пробірки MGIT для ТМС

## 2.2 Розчинення препаратів 2-го ряду і підготовка пробірок з рідким середовищем для постановки ТМС

Всі процедури здійснюються в ламінарному боксі!

Стандартні концентрації препаратів 2-го ряду для використання в системі MGIT (мкг/мл): Cm – 2,5; Ofx – 2,0; Et – 5,0; Am – 1,0.

Схема процедур:

а) розведення антимікобактеріальних препаратів.

Розведення препаратів готують з чистих субстанцій препаратів 2-го ряду з використанням стерильної дистильованої води. Кінцеве розведення препаратів 2-го ряду вноситься у підготовану до інокуляції пробірку MGIT, яка містить 7,8 мл рідини (7,0 мл рідкого середовища та 0,8 мл збагачувальної добавки).

Капреоміцин (Cm) – 2,5 мкг/мл:

– 39,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату\* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 3950 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 395 мкг/мл;

– 1,0 мл (2-го розведення) + 1,0 мл дистильованої води = 197,5 мкг/мл;

– внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 2,5 мкг/мл.

Офлоксацин (Ofx) – 2,0 мкг/мл:

– 15,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату\* + 10,0 мл 0,1 N NaOH\*\* = 1580 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 158,0 мкг/мл;

– внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 2,0 мкг/мл.

---

1)\* – при приготування наважки кожного з препаратів 2-го ряду необхідно враховувати потенцію АМБП, яка залежить від фірми-виробника та хімічного складу чистої субстанції препаратів 2-го ряду, в кожному випадку необхідно робити відповідне перерахування на вміст активної речовини чистих субстанцій препаратів.

2)\*\* – 0,1 N NaOH = 0,4 г NaOH + 100 мл стерильної дистильованої води.

Етіонамід (Et) – 5,0 мкг/мл:

– 39,5 мг активної речовини чистої субстанції препарату\* + 10,0 мл димексиду (DMSO) = 3950 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 395,0 мкг/мл;

– внести 0,1 мл (2-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 5,0 мкг/мл.

Амікацин (Am) – 1,0 мкг/мл:

– 15,8 мг активної речовини чистої субстанції препарату\* + 10,0 мл дистильованої води = 1580 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл дистильованої води = 158,0 мкг/мл;

– 1,0 мл (2-го розведення) + 1,0 мл дистильованої води = 79,0 мкг/мл;

– внести 0,1 мл (3-го розведення) в 7,8 мл вмісту пробірки MGIT, кінцева концентрація в рідкому середовищі – 1,0 мкг/мл.

б) промаркувати пробірки, вказуючи на них номер зразка, найменування препарату й призначення пробірки:

– для постановки одного ТМС мікобактерій до препаратів 2-го ряду необхідно підготувати 5 пробірок (рис. 2.4): 1 контроль і 4 пробірки з препаратами 2-го ряду.

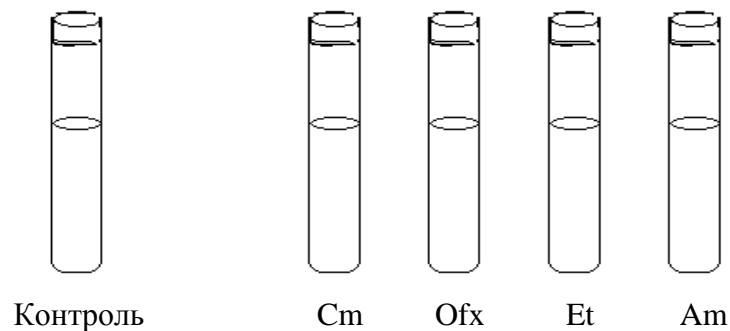


Рис. 2.4 – Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 2-го ряду

в) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати по 800 мкл відповідних добавок у пробірки із препаратами й контрольні пробірки добавку SIRE – у контроль та пробірки з Cm, Ofx, Et і Am (рис. 2.5);

г) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл

розчину препаратів (Cm, Ofx, Et, Am) у відповідні марковані пробірки MGIT (рис. 2.6);

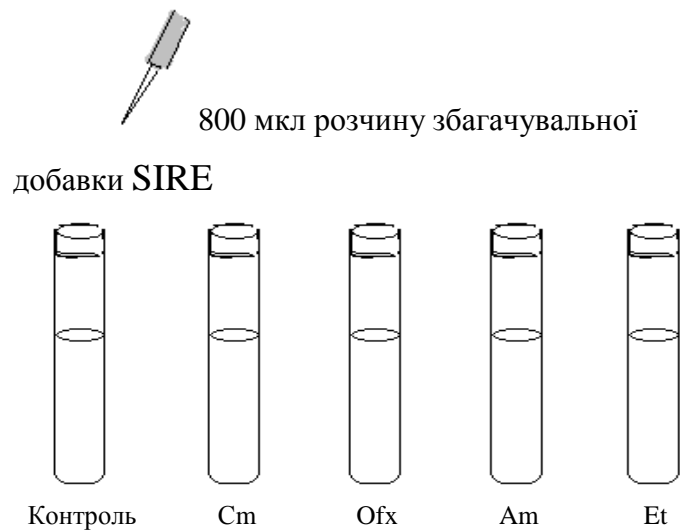


Рис. 2.5 – Додавання добавок, що збагачують середовище у пробірки із препаратами

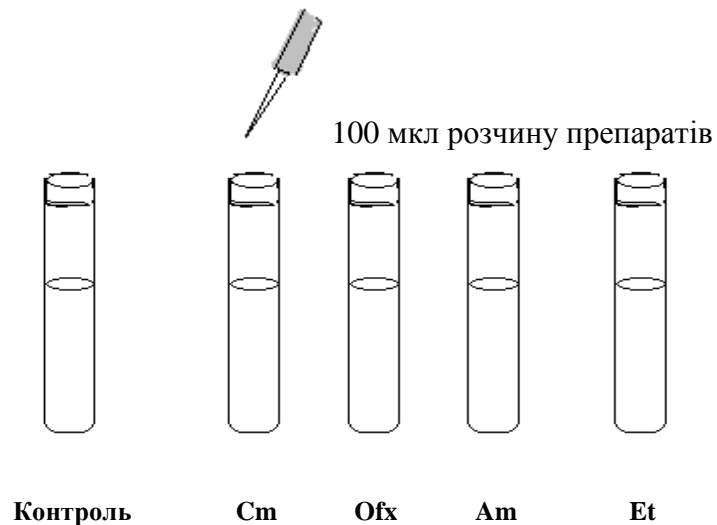


Рис. 2.6 – Додавання препаратів 2-го ряду у пробірки MGIT для ТМС

Для постановки одного ТМС мікобактерій одночасно до препаратів 1-го та 2-го ряду необхідно використовувати 11 пробірок: 1 пробірка – контроль для препаратів 1-го та 2-го ряду, 1 пробірка – контроль Z, 9 пробірок з препаратами (SIRE та Cm, Ofx, Et, Am) (рис. 2.7).



Рис. 2.7 – Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 1-го та 2-го ряду

2.3 Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування в пробірці MGIT) для постановки посіву на ТМС в рідкому середовищі в системі MGIT

Важливим фактором є “вік” культури в днях, що пройшов з моменту, коли була отримана позитивна культура у системі MGIT.

День, у який дана культура була вперше ідентифікована системою як позитивна, вважається “НУЛЬОВИМ” (день 0).

Для одержання культури, придатної до подальших тестів на ТМС, пробірку необхідно інкубувати у системі щонайменше ще добу (тобто до дня 1).

Якщо простір у системі є критичним чинником, що стримує швидкість роботи, пробірка може бути вилучена із системи після дня 0 (тобто після одержання позитивної відповіді) і культивуватися в наступні дні в термостаті при 37 °С.

Культура є придатною для посіву на ТМС протягом П’ЯТИ днів після дня “0” (тобто протягом днів 1 – 5).

Якщо культура інкубувалась у системі або термостаті більше 5 днів після повідомлення про позитивний результат (тобто починаючи з 6-ї доби і далі), вона НЕПРИДАТНА для проведення ТМС у системі MGIT. Для того, щоб

зробити ТМС з позитивної культури (MGIT «+»), що була витримана у термостаті більш ніж 5 діб, необхідно здійснити її субкультивування, тобто невеликий об'єм (0,5 мл) цієї культури слід посіяти у нову пробірку MGIT і культивувати в апараті до отримання позитивного результату.

Процедури підготовки культури для ТМС розрізняються залежно від “віку” культур (тобто днів, що пройшли з моменту одержання позитивного результату) (рис. 2.8).

Проведення ТМС з культури віком 1 – 2 дні:

- а) енергійно струсити пробірку (бажано на вортексі) для гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);
- б) залишити пробірку на 5 – 10 хв. для осадження великих часток;
- в) використовувати надосадову рідину для інокуляції пробірок із препаратами.

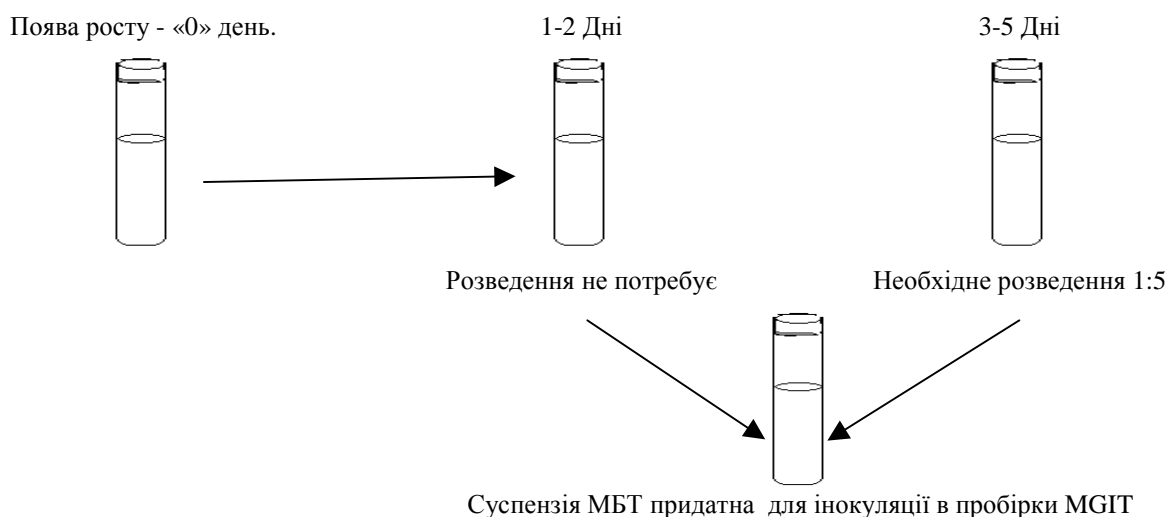


Рис. 2. 8 – Приготування суспензії МБТ для проведення ТМС

Проведення ТМС з культури віком 3 – 5 днів:

- а) енергійно струсити пробірку (бажано на вортексі) для її гомогенізації й подрібнення наявних згустків (скупчень мікобактерій);
- б) залишити пробірку на 5 – 10 хв. для осадження великих часток;
- в) в окрему стерильну пробірку перенести помістити 1,0 мл надосадової рідини й додати розвести її 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl, щоб отримати одержавши, таким чином, розведення 1:5. Використовувати його для

інокуляції пробірок з препаратами.

Приготувати розведення суспензії мікобактерій 1:100 для посіву контрольних пробірок SIRE. Для цього додати 0,1 мл суспензії мікроорганізмів (надосадової рідини 1 – 2-денної культури або розведення 1:5 3 – 5-денної культури) у пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl. Добре перемішати й використовувати для посіву в контрольні пробірки.

**ВАЖЛИВО!** При тестуванні на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку Z готують розведення 1:10 (не 1:100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1:5 для 3 – 5-денної культури або суспензії 1 – 2-денної культури) у пробірку з 4,5 мл. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок при тестуванні стійкості до Z.

### 3 ПРИГОТУВАННЯ СУСПЕНЗІЇ МІКОБАКТЕРІЙ З ПОЗИТИВНИХ ПРОБ (ПІСЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ЩІЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ) ДЛЯ ПОСТАНОВКИ ТМС В РІДКОМУ СЕРЕДОВИЩІ В СИСТЕМІ MGIT

Для приготування суспензії мікобактерій для посіву на ТМС необхідно:

а) використовувати для постановки ТМС культуру зі щільного живильного середовища Левенштейна-Єнсена НЕ ПІЗНІШЕ 15 діб з моменту появи росту мікобактерій (рис. 3.1);

б) у стерильну пробірку додати 4,0 мл ізотонічного розчину NaCl;

в) за допомогою традиційного способу зібрати максимальну кількість колоній з поверхні середовища в стерильний ізотонічний розчин NaCl, при цьому уникати потрапляння самого середовища до ізотонічного розчину NaCl.

г) щільно закрити пробку й суспендувати на вортексі протягом 1 – 3 хв. для повного подрібнення згустків. Проконтролювати мутність суспензії за стандартом мутності McFarland (мутність суспензії повинна бути більше 1,0);

д) залишити пробірку із суспензією на 20 хв. для осадження великих часток;



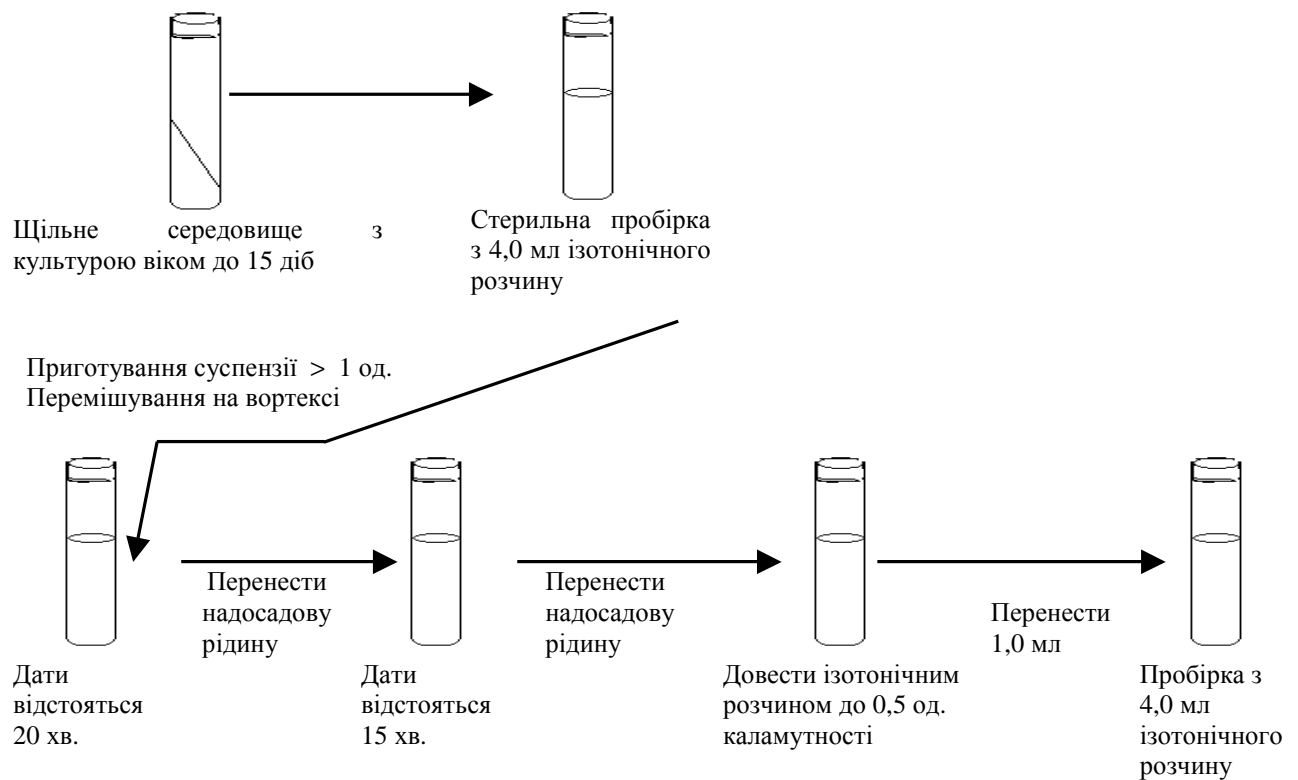


Рис. 3.1 – Приготування суспензії мікобактерій з щільного живильного середовища для посіву на ТМС в системі MGIT

е) акуратно перенести надосадову рідину піпеткою в іншу стерильну пробірку, не торкаючись осаду на дні пробірки. Залишити пробірку з надосадовою рідиною на 15 хв. для осадження всіх часток, що залишилися;

ж) акуратно перенести надосадову рідину в наступну стерильну пробірку НЕ ТОРКАЮЧИСЬ ОСАДУ;

з) проконтролювати мутність отриманої суспензії за стандартом мутності (повинна бути більше 0,5 од). Довести мутність суспензії точно до 0,5 од шляхом додавання в пробірку стерильного ізотонічного розчину. **СТЕЖИТИ, ЩОБ МУТНІСТЬ НЕ БУЛА МЕНШ 0,5 од.;**

і) розвести отриману суспензію в співвідношенні 1:5 стерильним ізотонічним розчином NaCl. Для цього перенести 1,0 мл отриманої суспензії в пробірку з 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати отримане розведення (1:5) для інокуляції в пробірки MGIT з препаратами;

к) приготувати розведення отриманої суспензії (1:100) для посіву в

контрольні пробірки. Для цього додати 0,1 мл отриманої суспензії в пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати дане розведення для посіву в контрольні пробірки;

л) **ВАЖЛИВО!** При тестуванні на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку готують розведення 1:10 (не 1:100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1:5) у пробірку з 4,5 мл ізотонічного розчину NaCl. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок при тестуванні стійкості до Z.

### 3.1 Інокуляція й інкубація

Інокуляцію необхідно проводити згідно з наступними схемами (рис. 3.2, 3.3, 3.4, 3.5):

а) промаркувати пробірки в залежності від кількості препаратів, до яких потрібно визначити МС:

1) для постановки одного ТМС мікобактерій до препаратів 1-го ряду необхідно підготувати 7 пробірок: 1 пробірка – контроль SIRE, 1 пробірка – контроль Z, 5 пробірок із препаратами SIRE та Z;

2) для постановки одного ТМС мікобактерій одночасно до препаратів 1-го та 2-го ряду необхідно використовувати 11 пробірок – 1 пробірка - контроль для препаратів 1-го та 2-го ряду, 1 пробірка – контроль Z, 9 пробірок з препаратами (SIRE та Cm, Ofx, Et, Am).

б) внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1:100 у контрольні пробірки, які використовуються для контролю росту мікобактерій при тестуванні на чутливість до препаратів 1-го (SIRE) та/або 2-го ряду;

в) внести піпеткою зі стерильним наконечником 0,5 мл розведення 1:10 у пробірки без препаратів, які використовуються для контролю росту мікобактерій при тестуванні на стійкість до Z;

г) внести по 0,5 мл суспензії мікобактерій 1:5, отриманої з культури, вирощеної на щільному середовищі, або суспензії 1 – 2-денної культури міко-

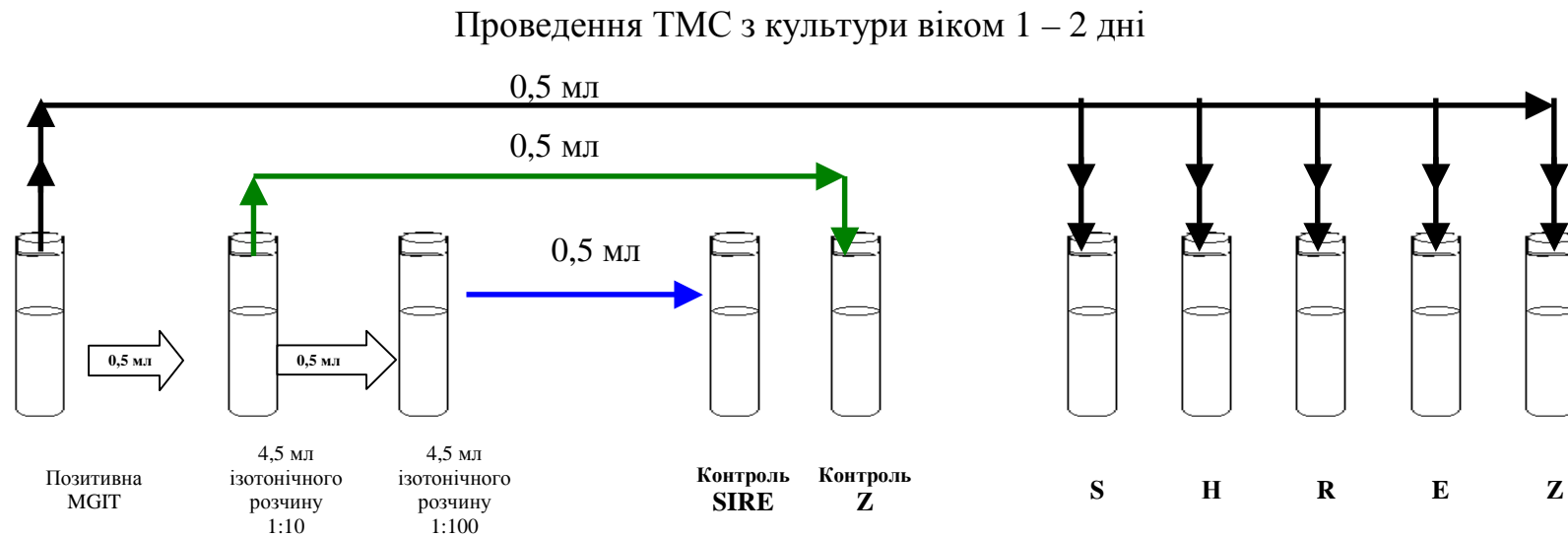


Рис. 3.2 – Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 1 – 2 дні до препаратів 1-го ряду

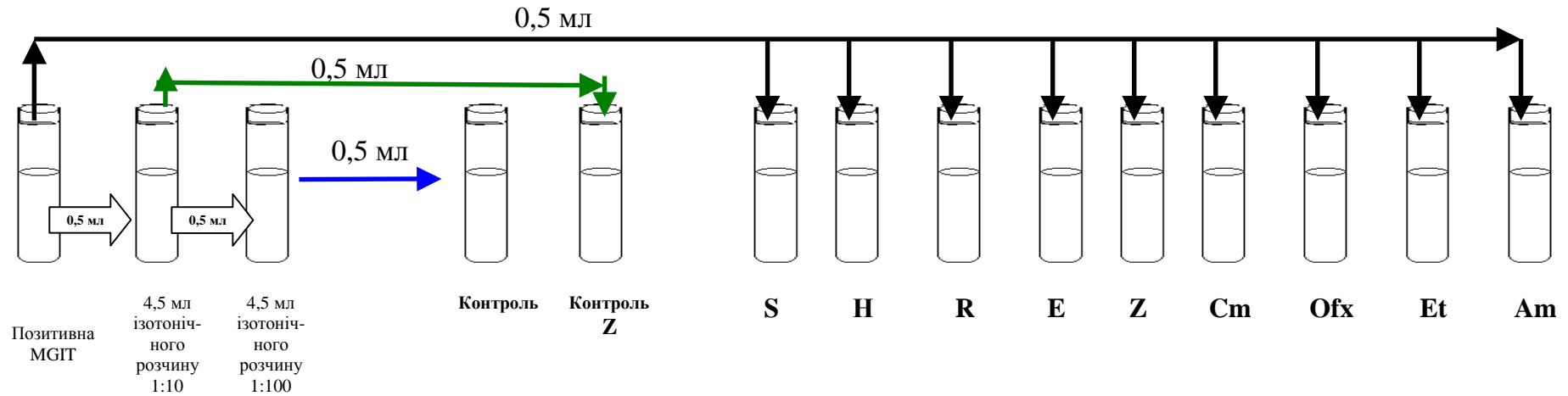


Рис. 3.3 – Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 1 – 2 дні до препаратів 1-го та 2-го ряду

### Проведення ТМС з культури віком 3 – 5 днів

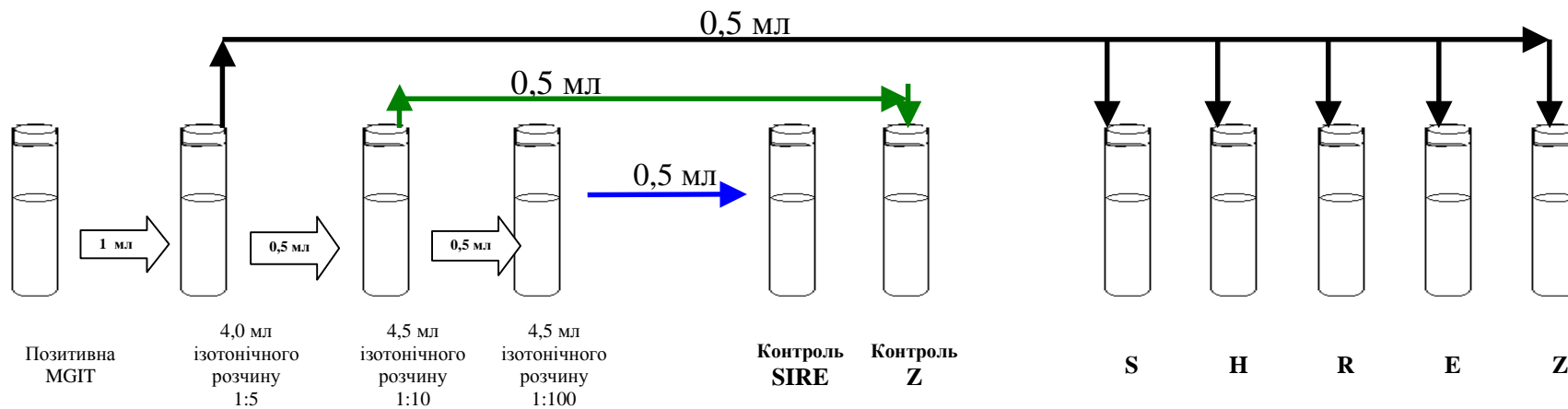


Рис. 3.4 – Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 3 – 5 днів до препаратів 1-го ряду

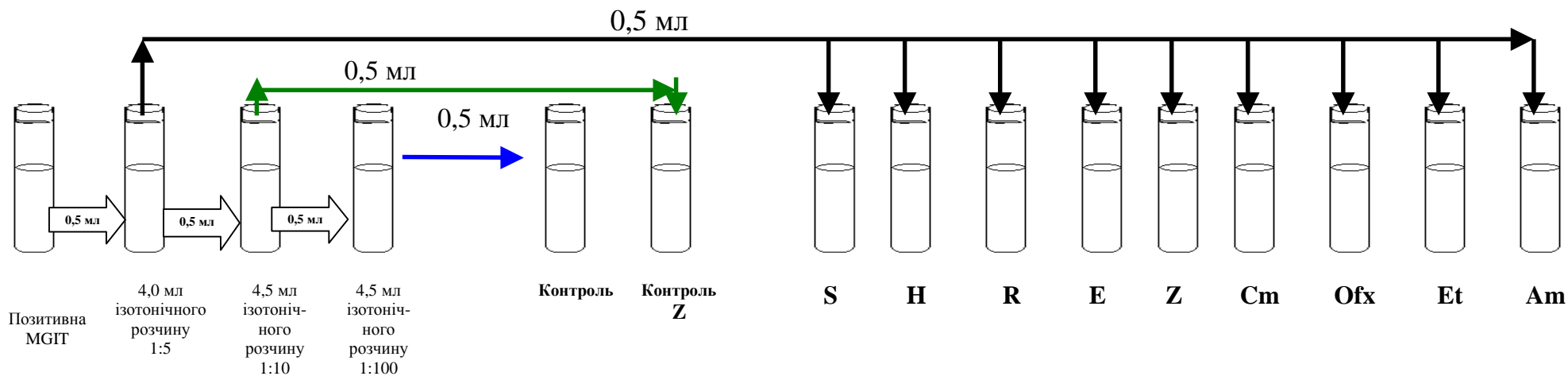


Рис. 3.5 – Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 3 – 5 днів до препаратів 1-го та 2-го ряду

бактерій або розведення 1:5 для 3 – 5-денної культури мікобактерій, вирощених у системі MGIT у кожному з п'яти пробірок із препаратами 1-го ряду (S, H, R, E і Z) та/або в 4 пробірки із препаратами 2-го ряду (Cm, Ofx, Et, Am);

д) негайно після інокуляції щільно закрити пробки пробірок, перемішати перевертанням кілька разів, встановити пробірки в потрібному порядку в тримач MGIT, і помістити їх у ящики приладу MGIT у гнізда, зазначені приладом. Переконайтеся в тому, що кришки пробірок щільно закриті. Не переміщувати й не рухати пробірки в процесі інкубації в приладі;

е) тривалість проведення ТМС у системі звичайно становить від 4 до 21 доби.

Система MGIT проводить автоматичний моніторинг росту мікобактерій і повідомляє про завершення тесту при досягненні певного значення мутності середовища в контрольній пробірці. При одержанні такого повідомлення всі пробірки, у які був посіяний даний матеріал, можуть бути витягнуті із приладу й відскановані для одержання остаточного результату дослідження. Результат видається системою у вигляді повідомлень "R - resistente" (СТІЙКИЙ), або "S-Sensitive" (ЧУТЛИВИЙ). Визначення результатів системою здійснюється шляхом виміру оптичної щільності в пробірках із препаратами й порівняння із щільністю контрольної пробірки;

ж) при наявності росту в контрольних пробірках раніше 4-ої доби (що може свідчити про контамінацію), або його відсутності після закінчення 21 доби, система видає повідомлення "X-Error" («ПОМИЛКА»). Це ж повідомлення може видаватися й при виникненні інших обставин, що впливають на якість тесту;

з) при одержанні повідомлення про помилку, пробірки необхідно витягти із приладу, інокулювати нові порції суспензії мікобактерій у нові пробірки й повторити дослідження.

## РЕЗЮМЕ

Запропоновані методичні рекомендації присвячені актуальній проблемі фтизіатрії – виділенню і визначенню медикаментозної стійкості *M. tuberculosis* та мікобактерій, які є збудниками мікобактеріозів.

Рекомендується використання в мережі лабораторій протитуберкульозних закладів України системи MGIT, яка призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначенню медикаментозної стійкості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів 1-го ряду.

Вперше в Україні пропонується методика постановки тесту медикаментозної стійкості до антимікобактеріальних препаратів 2-го ряду з застосуванням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в системі MGIT. Наведені “критичні” концентрації до капреоміцину, офлоксацину, етіонаміду і амікацину.

Метод пройшов апробацію в лабораторії мікробіології ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України”, Референс лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України і зарекомендував себе з позитивного боку. Перевагою методу є те, що він стандартизований, не потребує тривалого часу.

Метод перспективний при бактеріологічному обстеженні хворих на туберкульоз.

Методичні рекомендації розроблені за вимогами ВООЗ і Міжнародного Союзу по боротьбі з легневими захворюваннями для бактеріологічної діагностики туберкульозу.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль : Пер. с англ. / Под. ред. Барри Р. Блума. – М. : Медицина, 2002. – 696 с.
2. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью : Пер. с англ. / Под ред. И. Бастиана, Ф. Порталс. – М. : Медицина и жизнь, 2003. – 368 с.
3. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій [Текст] : методичні рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. – К., 2007. – 24 с.
4. Руководство по работе с системой ВАСТЕС MGIT 960 : Пер. с англ. / Под. ред. Н. Salman. – М.: Медицина, 2006. – 74 с.
5. WHO Tuberculosis programme : Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis [Text] / WHO / HTM / TB. – Geneva, 2009. – 83 p.