

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

**СТАНДАРТИ БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ В ЛАБОРАТОРІЯХ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ
ЗАКЛАДІВ УКРАЇНИ**

Навчальний посібник для фахівців бактеріологічних лабораторій
закладів протитуберкульозної служби України

КИЇВ 2012

Заклад-розробник :

ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України”, м. Київ

Автори:

Журило О. А., керівник лабораторії мікробіології туберкульозу ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України”, д-р мед. наук;

Барбова А. І., керівник Центральною референс-лабораторією МОЗ України, канд. мед. наук, ст. наук. співроб. лабораторії мікробіології туберкульозу ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України”;

Глушкевич Т. Г., завідувач бактеріологічною лабораторією Центральної СЕС МОЗ України;

Третьякова Л. В., завідувач лабораторією особливо небезпечних хвороб Центральної СЕС МОЗ України.

Рецензенти:

В. М. Мельник, заст. директора з науково-методичної та науково-організаційної роботи ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України”, д-р мед. наук, професор;

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

Видання рекомендоване для лікарів-бактеріологів, лікарів-фтизіатрів, наукових і педагогічних працівників,, які займаються проблемами діагностики і лікування хворих на туберкульоз, а також для студентів, інтернів і курсантів.

ЗМІСТ

	С.
Передмова.....	6
Вступ.....	11
1 Організація роботи бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби.....	13
1.1 Структура лабораторної мережі (рівні лабораторій).....	13
1.2 Функції та обов'язки лабораторій різного рівня.....	14
1.3 Документація лабораторії з діагностики туберкульозу.....	20
2 Персонал лабораторії і його підготовка.....	23
2.1 Вимоги до персоналу.....	23
2.2 Кваліфікаційні вимоги.....	24
2.3 Функціональні обов'язки.....	24
3 Вимоги до влаштування бактеріологічної лабораторії.....	28
3.1 Вимоги до приміщення бактеріологічної лабораторії.....	28
3.2 Розміщення приладів та обладнання в лабораторії.....	34
3.3 Опис основного обладнання та приладів.....	42
4 Вимоги до забезпечення біологічної безпеки та безпеки праці у лабораторії протитуберкульозної служби.....	53
4.1 Шляхи розповсюдження туберкульозної інфекції.....	53
4.2 Заходи щодо попередження ризику внутрішньолабораторного зараження.....	56
4.3 Методи знезараження об'єктів.....	61
4.4 Поводження з відходами у лабораторіях, що працюють із збудником туберкульозу.....	65
4.5 Обладнання, спецодяг, засоби індивідуального захисту для забезпечення безпеки.....	66
4.6 Заходи при надзвичайній ситуації в лабораторії.....	69
5 Бактеріологічні методи дослідження з використанням живильних середовищ.....	72
5.1 Деякі біологічні особливості роду <i>Mycobacterium</i>	72
5.2 Діагностичний матеріал.....	74
5.3 Організація збору, зберігання і транспортування діагностичного матеріалу.....	76
5.4 Прийом та реєстрація матеріалу.....	79
5.5 Обробка діагностичного матеріалу, деконтамінація та концентрація зразків.....	81
5.5.1 Стандартні методи розрідження та деконтамінації.....	82
5.5.2 Інші методи обробки матеріалу.....	86
5.5.3 Зразки діагностичного матеріалу, які не потребують деконтамінації.....	88
5.5.4 Внутрішньолабораторний контроль якості деконтамінації.....	88
5.6 Живильні середовища, посіви і культивування.....	89
5.6.1 Характеристика живильних середовищ.....	89
5.6.2 Приготування щільних живильних середовищ для культивування	

	мікобактерій.....	91
5.6.3	Внутрішньолaborаторний контроль якості щільних живильних середовищ.....	94
5.6.4	Техніка посіву та інкубації на щільному середовищі.....	96
5.6.5	Оцінка та облік результатів посівів діагностичного матеріалу на щільному середовищі.....	97
5.6.6	Дослідження з використанням рідких живильних середовищ.....	100
5.6.6.1	Автоматичні та напівавтоматичні аналізатори.....	100
5.6.6.2	Основні принципи культивування мікобактерій на рідких живильних середовищах.....	104
5.6.6.3	Застосування автоматизованої системи MGIT 960 для бактеріологічної діагностики туберкульозу.....	105
5.7	Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу, видова ідентифікація мікобактерій.....	111
5.7.1	Попередня ідентифікація комплексу <i>M. tuberculosis</i> (родова ідентифікація).....	111
5.7.2	Диференціація <i>M. tuberculosis complex</i> від нетуберкульозних мікобактерій.....	114
5.7.3	Видова ідентифікація мікобактерій туберкульозного комплексу.....	117
5.7.4	Ключові тести і схеми ідентифікації мікобактерій.....	125
5.7.5	Внутрішньолaborаторний контроль якості попередньої ідентифікації та визначення виду мікобактерій.....	129
5.8	Дослідження по визначенню медикаментозної чутливості мікобактерій.....	130
5.8.1	Основні поняття.....	130
5.8.2	Механізм розвитку стійкості мікобактерій до медикаментозних препаратів.....	132
5.8.3	Організація досліджень визначення чутливості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів.....	133
5.8.4	Методи визначення медикаментозної чутливості мікобактерій.....	135
5.8.4.1	Визначення чутливості мікобактерій до ПТП методом пропорцій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена (модифікований метод Канетті).....	136
5.8.4.2	Визначення чутливості мікобактерій до ПТП непрямим методом абсолютних концентрацій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена.....	141
5.8.4.3	Визначення чутливості мікобактерій до ПТП 1-го і 2-го ряду з застосуванням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в автоматизованій системі ВАСТЕС 960.....	146
5.8.4.4	Альтернативні методи дослідження медикаментозної чутливості мікобактерій.....	158
5.8.5	Контроль якості досліджень по визначенню медикаментозної чутливості мікобактерій.....	159
5.8.6	Реєстрація бактеріологічних досліджень та їх результатів.....	159
5.8.7	План роботи бактеріологічної лабораторії. Розрахунки потреб у	

	витратних матеріалах та реагентах.....	164
6	Забезпечення якості досліджень у бактеріологічній лабораторії протитуберкульозної служби.....	165
6.1	Внутрішньолaboratorний контроль якості мікробіологічних досліджень.....	167
6.2	Зовнішня оцінка якості досліджень.....	171
6.3	Заходи щодо поліпшення якості досліджень.....	172
Додаток 1	Перелік обладнання та витратних матеріалів для бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби.....	175
Додаток 2	Видова ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій.....	182
Додаток 3	Визначення мутності бактеріальної суспензії.....	188

Передмова

Надзвичайна епідемічна ситуація з туберкульозу в країні потребує постійного удосконалення методів профілактики, виявлення та діагностики захворювань на туберкульоз серед населення з метою зниження інфікованості, захворюваності та зменшення резервуару туберкульозної інфекції.

Захворювання на туберкульоз у більшості виявлених хворих діагностується несвоєчасно, що знижує ефективність лікування, навіть при застосуванні сучасних методів хіміотерапії. Такі хворі створюють велику епідемічну небезпеку для оточуючих, особливо дітей.

Під час епідемії туберкульозу в країні одним із пріоритетних напрямків в системі протитуберкульозних заходів є підвищення рівня знань лікарів з питань своєчасної ефективної діагностики.

Етіологічне підтвердження діагнозу туберкульозу за допомогою бактеріологічних досліджень гарантованої якості, зміцнення ТБ лабораторій, епіднагляд за медикаментозною стійкістю є основою сучасної клінічної фтизіатрії.

На бактеріологічні лабораторії покладається особлива функція у питаннях діагностики заразних випадків захворювання на туберкульоз та моніторингу ефективності процесу лікування. Саме тому, важливим напрямком удосконалення та оптимізації роботи лабораторій протитуберкульозної служби є обов'язкова стандартизація основних бактеріологічних методів. Впровадження їх в роботу дозволить отримати результати, які можуть бути порівняні з результатами досліджень інших лабораторій, що дасть можливість, своєчасно виявляти та реагувати на помилки в діагностиці, проводити оптимальне специфічне лікування хворих, оптимізувати та полегшити навчання фахівців, оцінити якість роботи лабораторій, окремих фахівців та проводити відповідний контроль ефективності лабораторних досліджень.

Для реалізації цього напрямку в країні підготовлена низка організаційно-розпорядчих, нормативних та учбових матеріалів з питань структури лабораторної мережі, організації роботи та удосконалення лабораторної діагностики туберкульозу.

З метою навчання спеціалістів лабораторної мережі протитуберкульозної служби методам діагностики туберкульозу в країні поряд з методичними та нормативними документами розроблені учбові посібники з різних методів дослідження. Для навчання спеціалістів лабораторій різного рівня протитуберкульозної служби виданий навчальний посібник "Стандарти бактеріоскопічної діагностики туберкульозу в клініко-діагностичних лабораторіях", проект USAID – Україна/PATH "Партнерство з контролю за туберкульозом" / О.А. Журило, Т.Л. Сакун, І.М.Заїка, Т.В. Іваненко, А.І. Барбова, І.Б. Анікусько. К.: ВСВ "Медицина", 2010.

Цей навчальний посібник для лікарів-бактеріологів **"Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України"**, містить:

- Загальні розділи, де надані матеріали щодо організації роботи лабораторії, підготовки персоналу, вимоги до приміщення лабораторії, оснащення, забезпечення належного рівня біологічної безпеки та безпеки праці, контролю якості роботи лабораторії.

- Розділ “Бактеріологічна діагностика туберкульозу”, де надані матеріали з культуральних методів дослідження на щільних та рідких живильних середовищах, прийом, реєстрація та обробка діагностичного матеріалу, техніка посіву матеріалу, інкубація, облік результатів, диференціація та ідентифікація мікобактерій.

Методи визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів та контроль якості цих досліджень.

- Забезпечення якості досліджень в бактеріологічній лабораторії протитуберкульозної служби – внутрішньолaboratorний контроль, зовнішня оцінка якості досліджень та заходи щодо її поліпшення.

При складанні цього Навчального посібника по проведенню курсу навчання фахівців бактеріологічних лабораторій закладів протитуберкульозної служби врахована інформація про останні досягнення в галузі організації роботи та бактеріологічної діагностики туберкульозу, які доповнюють діючу Інструкцію з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції, затвердженій наказом МОЗ України від 06.02.2002 року № 45. Крім того, були використані:

Закони України

1. Закон України "Основи законодавства України по охорону здоров'я".
2. Закон України "Про боротьбу із захворюванням на туберкульоз".
3. Закон України "Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення".
4. Закон України "Про захист населення від інфекційних хвороб".
5. Закон України "Про затвердження Загальнодержавної програми протидії захворюванню на туберкульоз у 2007 – 2011 роках".
6. Закон України "Про метрологію та метрологічну діяльність".
7. Закон України "Про державну статистику".
8. Закон України "Про відходи".
9. Закон України "Про наркотичні засоби, психотропні речовини і прекурсори".
10. Закон України "Про ліцензування певних видів господарської діяльності".

Укази Президента України

1. Указ Президента України від 11.07.2007 року № 670/2007 "Про надання Інституту фтизіатрії та пульмонології імені Ф. Г. Яновського статусу національного".

2. Указ Президента України від 8.04.2011 року № 441 "Питання Державної служби України з питань протидії ВІЛ-інфекції/СНІДу та інших соціально небезпечних захворювань".

3. Указ Президента України від 13.04.2011 року № 467/2011 "Про Положення про Міністерство охорони здоров'я України".

Постанови Кабінету Міністрів України

1. Постанова Кабінету Міністрів України від 25.08. 2004 р. № 1112 "Порядок розслідування та ведення обліку нещасних випадків, професійних захворювань і аварій на виробництві".

2. Постанова Кабінету Міністрів України від 01.08.1992 р. № 442 "Про Порядок проведення атестації робочих місць за умовами праці".

3. Постанова Кабінету Міністрів України від 06.05.2000 р. № 770 "Про затвердження переліку наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів".

Нормативно-правові акти МОЗ України та інші

1. Наказ МОЗ України від 06.02.2002 № 45 "Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції".

2. Наказ МОЗ України від 06.02.2006 № 50 "Про затвердження типових положень про лабораторії і пункти з діагностики туберкульозу та пункти забору мокротиння" зареєстрований в Міністерстві юстиції України 30.05.2006 за № 627/12501.

3. Протокол надання медичної допомоги хворим на туберкульоз, затверджений наказом МОЗ України від 09.06.2006 № 384.

4. Методичні рекомендації "Організація, проведення епідеміологічного нагляду та дезінфекційних заходів у протитуберкульозних закладах і вогнищах туберкульозу", затверджені наказом МОЗ України від 21.05.2007 № 250.

5. Наказ МОЗ України від 16.07.2008 № 388 "Про затвердження нормативів оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів", зареєстрований Міністерством юстиції України 04.08.2008 за № 719/1510.

6. Наказ МОЗ України від 10.06.2010 № 478 "Про реорганізацію лабораторної мережі з мікробіологічної діагностики туберкульозу".

7. Довідник кваліфікаційних характеристик професій працівників. Випуск 78. Охорона здоров'я, затверджений наказом МОЗ України від 29.03.2002 № 117

8. Наказ МОЗ України від 14.12.92 р. № 183 "Про режим роботи з патогенними мікроорганізмами".

9. Положення про порядок проведення атестації лікарів, затверджене наказом МОЗ України від 19.12.97 № 359, зареєстроване в Міністерстві юстиції України 14.01.98 за № 14/2454.

10. Положення про Свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів,

затвердженого наказом МОЗ України від 07.09.93 № 198, зареєстровано в Міністерстві юстиції України 31.12.93 за № 208.

11. Наказ МОЗ України від 21.05.2007 № 246 "Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій", зареєстрований в Міністерстві юстиції України 23.07 2007 р. за № 846/14113.

12. Наказ МОЗ України від 28.12.2002 № 500 "Про затвердження примірних положень в бактеріологічній службі системи МОЗ України".

13. Наказ Міністерства внутрішніх справ України від 15.05.2009 № 216 "Про затвердження Вимог до об'єктів і приміщень, призначених для здійснення діяльності з обігу наркотичних засобів, психотропних речовин, прекурсорів та зберігання вилучених з незаконного обігу таких засобів і речовин".

14. Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.-080-2002 "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю".

15. Державні санітарні правила ДСП 9.9.5-064-2000 "Порядок видачі дозволів на роботу з мікроорганізмами I–IV груп патогенності та рекомбінантними молекулами ДНК".

16. Державні санітарні норми і правила ДСанПін 9.9.5-153-2008 "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності, молекулярно-генетичними методами".

17. Державні санітарні правила ДСП 2.2.3.9.9.5-2007 "Правила розташування, облаштування та утримання протитуберкульозних закладів".

18. ДСТУ ISO/TR 10013:2003 "Настанови з розроблення документації систем управління якістю".

19. "Правила уповноваження та атестації у державній метрологічній системі", затверджені наказом Державного комітету України з питань технічного регулювання та споживчої політики від 29 березня 2005 р. № 71, зареєстровані в Міністерстві юстиції України 13.04.2005 р. за № 392/10672.

20. Типове положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці (Наказ Державного комітету України з нагляду за охороною праці від 26.01.2005 № 15, зареєстровано в Міністерстві юстиції України 15 лютого 2005 р. за № 231/10511).

Методичні рекомендації ВООЗ:

1. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Часть I. Организация и менеджмент. WHO/TB/98.258. Всемирная организация здравоохранения. Женева, Швейцария, 1998.

2. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Часть II. Бактериоскопия. WHO/TB/98.258. Всемирная организация здравоохранения. Женева, Швейцария, 1998.

3. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Часть III. Культуральное исследование. WHO/TB/98.258. Всемирная организация здравоохранения. Женева, Швейцария, 1998.

4. Руководство по программному ведению лекарственно устойчивого туберкулеза. ISBN 978 92 4 454695 6 (NLM classification: WF 310). Всемирная организация здравоохранения. Женева, Швейцария, 2007.

5. Инструмент оценки лаборатории по туберкулезу. ВООЗ, Женева, 2003.

6. Национальная референс-лаборатория по туберкулезу в системе общественного здравоохранения и национальная лабораторная сеть. Минимальные потребности, роль и организация работы в стране с ограниченными возможностями. – Международный союз по борьбе с туберкулезом и заболеваниями легких, 1998.

Вступ

Мікробіологічні дослідження з діагностики туберкульозу є найважливішою складовою діагностичного процесу як на етапі постановки діагнозу "туберкульоз", так і при контролі ефективності хіміотерапії. Відповідно до наказу МОЗ України від 06.02.02. № 45 "Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції" (далі – наказ МОЗ № 45) в країні визначена мережа лабораторій з діагностики туберкульозу і втілена система лабораторних досліджень діагностики туберкульозу, якою передбачено три етапи:

1. Первинне (мікроскопічне) дослідження діагностичного матеріалу на наявність кислотостійких бактерій (далі – КСБ) в установах загально-лікарняної мережі.
2. Комплексне мікроскопічне і культуральне дослідження діагностичного матеріалу в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів.
3. Визначення чутливості до антимікобактеріальних препаратів і остаточна ідентифікація виділеного збудника в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозних закладів.

Мікробіологічне дослідження, що виконується в бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозної служби, включає:

- мікроскопічне дослідження мазка з осаду обробленого діагностичного матеріалу;
- культуральне дослідження (посів);
- попередню ідентифікацію виділених штамів мікобактерій як таких, що належать до комплексу мікобактерій туберкульозу;
- проведення остаточної видової ідентифікації виділених мікобактерій;
- визначення чутливості виділених мікобактерій до протитуберкульозних препаратів.

У лабораторії, в залежності від рівня діагностики, можуть виконуватися всі або тільки деякі з перерахованих досліджень.

Культуральний метод дослідження до сьогодні залишається "золотим стандартом" в діагностиці туберкульозу. Виявлення мікобактерій туберкульозу (далі – МБТ) в діагностичному матеріалі мікробіологічними методами дозволяє підтвердити достовірність поставленого діагнозу "туберкульоз".

У зв'язку з родовими особливостями, культивування МБТ потребує особливих умов, відмінних від умов культивування інших мікроорганізмів. Термін подвоєння числа МБТ на поживних середовищах, які широко використовуються, досягає 18–24 годин. Мікобактерії туберкульозу потребують для росту особливого складу живильного середовища, найширше використовується середовище, до складу якого входять курячі яйця, аспарагін і гліцерин.

Тривалий час росту культури обумовлює необхідність попередньої обробки матеріалу з метою знищення в пробі не мікобактеріальної мікрофлори.

Відносна стійкість мікобактерій до дії лугів і кислот визначає умови обробки, при яких зниження життєздатності мікобактерій порівняно невелике, а нетуберкульозні мікроорганізми гинуть. Проте підібрати ідеальні умови обробки не вдається і процедура обробки мокротиння (деконтамінація) істотно впливає на результативність культурального методу. Недостатня деконтамінація збільшує число посівів з проростом (понад 5,0 %). Дуже жорстка обробка може суттєво вплинути на життєздатність МБТ. Якщо відсоток проростів менше 2,0 %, метод деконтамінації може інгібувати ріст МБТ або знищити їх, приводячи до хибнонегативних результатів.

У порівнянні з методом мікроскопії, культуральний метод дослідження має низку переваг:

- За допомогою культурального методу вдається виявити на 20,0 – 40,0 % більше випадків туберкульозу з бактеріовиділенням. Метод посіву більш чутливий, ніж метод мікроскопії: він дозволяє виділити культуру з діагностичних матеріалів, отриманих від олігобацилярних хворих, у тому числі і від хворих на позалегеновий туберкульоз та дітей. При добре організованому дослідженні вдається одержати культуру з матеріалів, що містять декілька сотень клітин мікобактерій. У разі використання рідких середовищ поріг чутливості знижується до декількох десятків клітин МБТ.

Культуральний метод дозволяє виділити культуру збудника та детально дослідити її: визначити видову належність і спектр чутливості до протитуберкульозних препаратів.

Виділення мікобактерій бактеріологічним методом свідчить про високу життєздатність мікобактерій, їх високу вірулентність.

Разом з тим культуральний метод дослідження має низку недоліків:

Термін отримання результату культурального дослідження (посіву) значно довший, ніж при мікроскопії. При використанні класичних щільних живильних середовищ на яєчній основі термін позитивного результату складає 3–5 тижнів, проте для окремих культур, особливо виділених від пацієнтів, які раніше отримували лікування, цей час перевищує 10 тижнів. Негативний результат видається після 10 тижнів (2,5 місяців) культивування. Використання рідких живильних середовищ значно скорочує терміни появи росту – до 10–20 діб для більшості культур. За рекомендаціями виробників автоматичних систем реєстрації росту мікобактерій, які працюють на рідких середовищах Middlebrook, час видачі негативного результату, становить 42 доби.

Вартість культуральних досліджень в 5–7 разів перевищує вартість мікроскопічного дослідження, а при використанні автоматичних аналізаторів з рідкими живильними середовищами вартість дослідження зростає у декілька разів порівняно з дослідженнями на щільних яєчних середовищах. Культуральні дослідження вимагають значно складнішого обладнання і більш високої кваліфікації персоналу. Влаштування бактеріологічної лабораторії для проведення безпечних досліджень з діагностики туберкульозу вимагає значних витрат на забезпечення і підтримку інженерного обладнання, яке забезпечує відтік зараженого повітря з приміщень і його очищення. Проведення

досліджень з використанням рідких середовищ в автоматизованих системах вимагає збільшення витрат на обладнання і витратні матеріали в порівнянні з дослідженнями, що проводяться з використанням щільних яєчних середовищ. Проте, ці витрати компенсуються зниженням витрат на підготовку, миття і стерилізацію лабораторного посуду, приготування живильних середовищ з окремих компонентів, контроль їх якості, що, з рештою, приводить до зниження трудових затрат, електроенергії, води тощо.

Питання:

- 1. Які дослідження входять в перелік мікробіологічних досліджень для діагностики туберкульозу?*
- 2. Які переваги перед мікроскопічним дослідженням для діагностики туберкульозу має культуральний метод?*
- 3. Які недоліки має культуральний метод?*

1 Організація роботи бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби

1.1 Структура лабораторної мережі

Усі лабораторії, які здійснюють виявлення, діагностику і контроль хіміотерапії туберкульозу мікробіологічними методами, об'єднані у єдину лабораторну мережу. Основою побудови цієї мережі є система забезпечення якості досліджень.

Лабораторна мережа з мікробіологічної діагностики туберкульозу організована за територіальним принципом і включає клініко-діагностичні лабораторії загально-лікарняної мережі і лабораторії протитуберкульозних закладів, які за методами та обсягом досліджень поділяються на три рівні:

- Лабораторії I рівня (пункти мікроскопії), що створені на базі лабораторій лікувально-профілактичних закладів загальної лікувальної мережі, і виконують мікроскопію досліджуваного матеріалу;

- Лабораторії II рівня, що створені на базі районних та міських протитуберкульозних закладів, виконують мікроскопію, посів досліджуваного матеріалу, попередню ідентифікацію виділених мікобактерій;

- Лабораторії III рівня, що створені на базі обласних та деяких міських, у тому числі Київського та Севастопольського міських протитуберкульозних закладів, виконують мікроскопію, посів досліджуваного матеріалу, ідентифікацію виділених мікобактерій та визначення чутливості їх до протитуберкульозних препаратів.

Організаційним, науково-практичним і методичним центром є Референс-лабораторія, яка виконує весь спектр мікробіологічних досліджень на туберкульоз; розробляє, апробує і впроваджує в практику сучасні методи досліджень; здійснює спостереження за етіологічною структурою туберкульозної інфекції, циркуляцією збудників туберкульозу серед населення, координацію роботи лабораторій III рівня, контроль за якістю всіх досліджень

на туберкульоз, які проводяться в регіональних лабораторіях протитуберкульозних закладів країни і надає їм методичну допомогу.

1.2 Функції та обов'язки лабораторій різного рівня

Типові положення про лабораторії різного рівня викладені у наказі МОЗ України від 06.02.2006р. № 50 "Про затвердження типових положень про лабораторії і пункти з діагностики туберкульозу та пункти забору мокротиння", зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 30.05.2006 за №630/12504.

Лабораторія першого рівня

Лабораторії першого рівня організуються в складі клініко-діагностичних лабораторій загально-лікувальної мережі (далі – КДЛ ЗЛМ) і виконують перший етап досліджень по виявленню хворих на туберкульоз. Зазначені лабораторії проводять мікроскопічне дослідження мокротиння забарвленого за Цілем-Нільсеном.

Основні завдання і функції лабораторій першого рівня (пунктів мікроскопії)

Основні завдання:

- Приймання, оцінка та реєстрація біологічного матеріалу.
- Своєчасне проведення та видача результатів мікроскопічних досліджень на виявлення КСБ.
- Проведення внутрішнього та участь у системі зовнішнього контролю якості мікроскопічних досліджень на туберкульоз.
- Ведення облікової документації, своєчасне складання та подання звітів.
- Дотримання вимог з питань охорони праці, техніки безпеки, санітарно-протиепідемічного режиму.
- Підвищення професійних знань та навичок у лабораторіях вищого рівня діагностики та закладах післядипломної освіти.
- Створення та оновлення архіву препаратів.

Основні функції:

- Одержання зразків мокротиння або іншого біологічного матеріалу з пунктів збору, які є поза межами клініко-діагностичних лабораторій.
- Здійснення перевірки правильності заповнення облікової документації, кількості та якості зразків біологічного матеріалу.
- Приготування мікроскопічних препаратів.
- Фарбування препаратів біологічного матеріалу за методом Ціля-Нільсена.
- Здійснення мікроскопічного дослідження препаратів біологічного матеріалу, забарвлених за методом Ціля-Нільсена.
- Забезпечення зберігання, оновлення та знешкодження препаратів згідно з діючими нормативно-правовими актами МОЗ України.
- Видача результатів досліджень відповідно до вимог нормативно-правових актів МОЗ України і своєчасне інформування лікувальних підрозділів про результати дослідження.

- Ведення облікових форм, затверджених нормативними актами МОЗ України.
- Складання та подання звітів до лабораторій вищого рівня.
- Проведення заходів з дотримання вимог з питань охорони праці, техніки безпеки, особистої гігієни та санітарно-протиепідемічного режиму в лабораторії.
- Підтримка обладнання в робочому стані, дотримання правил використання і зберігання реактивів.

Лабораторія другого рівня

Мікробіологічна лабораторія (або мікробіологічний відділ клініко-діагностичної лабораторії) протитуберкульозного закладу (II рівень діагностики туберкульозу) є діагностичним підрозділом протитуберкульозного закладу, організовується як самостійна мікробіологічна лабораторія або відділ у складі клініко-діагностичної лабораторії (КДЛ).

Основні завдання і функції лабораторій другого рівня

Основні завдання:

- Здійснення мікробіологічних досліджень на туберкульоз відповідно до чинних нормативно-правових актів МОЗ України;
- Передача усіх культур МБТ, виділених від хворих на туберкульоз до територіальних лабораторій III рівня для проведення визначення чутливості до антимікобактеріальних препаратів;
- Упровадження сучасних методів і технологій діагностики туберкульозу;
- Участь у формуванні комп'ютерного реєстру бактеріовиділювачів;
- Проведення аналізу роботи лабораторій I рівня, складання та подання звітів до лабораторій III рівня;
- Проведення внутрішньолабораторного контролю якості досліджень;
- Організація і проведення зовнішнього контролю якості досліджень, що виконуються у лабораторіях I рівня;
- Участь у системі зовнішньої оцінки якості;
- Здійснення постійного моніторингу мікроскопічної діагностики туберкульозу в лабораторіях I рівня;
- Ведення обліково-звітної медичної документації;
- Дотримання вимог з питань охорони праці, техніки безпеки, санітарно-протиепідемічного режиму.

Основні функції:

- Забезпечує своєчасне виконання мікробіологічних досліджень на туберкульоз, а саме:
 - бактеріоскопічні дослідження біологічного матеріалу на наявність КСБ;
 - посіви біологічного матеріалу на живильні середовища з метою виявлення МБТ;
 - ідентифікація мікобактерій.

- Передає усі культури МБТ, виділені від хворих на туберкульоз до територіальних лабораторій III рівня для визначення їх чутливості до протитуберкульозних препаратів.

- Проводить дослідження на неспецифічну мікробну флору, яка супроводжує туберкульозний процес, з визначенням чутливості виділених збудників до антибактеріальних препаратів.

- Упроваджує сучасні методи і технології діагностики туберкульозу.
- Здійснює внутрішньолaboratorний контроль якості досліджень.
- Бере участь у системі зовнішньої оцінки якості.
- Організовує зовнішній контроль якості і оцінку роботи та здійснює кураторські візити в лабораторії I рівня.

- Проводить аналіз роботи лабораторій I рівня та подає інформацію про результати їх діяльності до територіальної лабораторії III рівня.

- Складає та подає заявки на придбання обладнання, витратних матеріалів, живильних середовищ, діагностичних препаратів, хімічних реактивів, дезінфекційних засобів;

- Забезпечує правильність ведення обліково-звітної документації;
- Утримує музей культур мікроорганізмів.

Лабораторія третього рівня

Мікробіологічна лабораторія з діагностики туберкульозу протитуберкульозного закладу (III рівень діагностики туберкульозу) є самостійним діагностичним підрозділом протитуберкульозного закладу або може бути відділом КДЛ.

Основні завдання і функції лабораторій третього рівня

Основні завдання:

- Виконання мікробіологічних досліджень на туберкульоз відповідно до чинних нормативно-правових актів МОЗ України.

- Освоєння та впровадження в практику роботи лабораторії сучасних методів і технологій діагностики туберкульозу.

- Участь у формуванні комп'ютерного реєстру бактеріовиділювачів та хіміорезистентного туберкульозу.

- Організація і проведення зовнішнього контролю якості досліджень, що виконується в лабораторіях нижчого рівня.

- Участь у системі зовнішньої оцінки якості.

- Постійний моніторинг роботи та кураторські візити в лабораторії нижчого рівня.

- Аналіз роботи лабораторій нижчого рівня та подання звітів до Центральної референс лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України.

- Складання та подання заявок для централізованого придбання обладнання, витратних матеріалів, живильних середовищ, діагностичних препаратів, хімічних реактивів, дезінфекційних засобів, включаючи потреби лабораторій I–II рівнів регіону.

- Участь у плануванні потреби протитуберкульозного закладу в антибактеріальних, хіміотерапевтичних та дезінфекційних засобах.

- Організаційно-методична робота (аналітична, підготовка кадрів, науково-практична, тощо).

- Ведення облікової документації, наявності та витрат живильних середовищ, бак препаратів, хімічних реактивів, токсичних речовин та дезінфекційних засобів.

- Проведення внутрішньолабораторного контролю якості досліджень.

Основні функції:

- Забезпечує своєчасне виконання кваліфікованих та достовірних мікробіологічних досліджень на туберкульоз:

- мікроскопічні дослідження мазків на наявність КСБ;

- посіви біологічного матеріалу на живильні середовища для виявлення МБТ;

- видова ідентифікація виділених культур мікобактерій.

- визначення чутливості виділених культур до протитуберкульозних препаратів;

- підтвердження та ідентифікація культур мікобактерій туберкульозу, що надходять з лабораторій II рівня;

- Виконує посіви біологічного матеріалу на живильні середовища для виявлення неспецифічної мікробної флори, яка супроводжує туберкульозний процес, з визначенням чутливості до антибактеріальних препаратів.

- Упроваджує сучасні методи і технології діагностики туберкульозу.

- Проводить внутрішньолабораторний контроль якості досліджень.

- Бере участь у системі зовнішньої оцінки якості.

- Організовує зовнішній контроль якості і оцінку роботи та кураторські візити в лабораторії I–II рівнів.

- Бере участь у формуванні комп'ютерного реєстру бактеріовиділювачів та хіміорезистентного туберкульозу.

- Передає усі культури МБТ, виділені від хворих на туберкульоз, до територіальних лабораторій вищого рівня для проведення визначення чутливості до антимікобактеріальних препаратів у складних випадках.

- Проводить аналіз своєї діяльності та роботи лабораторій I–II рівня та інформує Центральну референс-лабораторію з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України.

- Утримує музей культур мікроорганізмів.

- Надає консультативну допомогу фахівцям протитуберкульозних закладів у виборі найбільш інформативних сучасних лабораторних тестів і трактуванні їх результатів.

- Бере участь в організації навчання та підвищенні кваліфікації спеціалістів з мікроскопічної та мікробіологічної діагностики туберкульозу.

- Забезпечує правильність ведення обліково-звітної документації.

- Дотримує вимоги з охорони праці, техніки безпеки, санітарно протиепідемічного режиму.

- Проводить планування потреби, подає заявки для централізованого придбання обладнання, витратних матеріалів, живильних середовищ, діагностичних препаратів, хімічних реактивів, дезінфекційних засобів, стандартних субстанцій, включаючи потреби лабораторій I–II рівнів та розподіляє їх.

Центральна референс-лабораторія

Центральна референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України є науково-практичним та організаційно-методичним центром з питань мікробіологічної діагностики туберкульозу в Україні.

Основні завдання і функції Центральної референс-лабораторії

Основні завдання:

- Здійснення організаційно-методичної допомоги щодо створення в Україні мережі лабораторій з діагностики туберкульозу (I–III рівні).
- Координація діяльності лабораторій (I–III рівні) з діагностики туберкульозу, упровадження в їх роботу стандартних методів досліджень.
- Забезпечення спостереження за етіологічною структурою туберкульозної інфекції серед населення України з метою прогнозування та зниження захворюваності на туберкульоз, удосконалення профілактичних і протиепідемічних заходів.
- Здійснення моніторингових досліджень щодо розповсюдження хіміорезистентних варіантів збудника туберкульозу і створення комп'ютерного реєстру бактеріовиділювачів та хіміорезистентного туберкульозу в Україні.
- Розробка, апробація і впровадження в практику сучасних методів досліджень, індикації та ідентифікації збудників туберкульозу.
- Організація системи контролю якості досліджень у лабораторіях, які займаються мікробіологічною діагностикою туберкульозу в Україні.
- Надання консультативно-методичної допомоги закладам охорони здоров'я України щодо методів бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції та ідентифікації атипичних штамів мікобактерій. Розробка інформаційних матеріалів з питань етіологічної структури, методів дослідження та сучасних досягнень у галузі мікробіологічної діагностики туберкульозної інфекції для протитуберкульозних закладів України.
- Участь у міжнародних програмах із зовнішнього контролю якості мікробіологічних досліджень та мікробіологічного й інфекційного контролю за туберкульозом.
- Співробітництво зі спеціалізованими мікробіологічними лабораторіями науково-дослідних інститутів України та країн СНД, з супранаціональними Референс-лабораторіями ВООЗ.
- Участь у плануванні потреб мережі лабораторій з діагностики туберкульозу в живильних середовищах, тест-системах для ідентифікації збудників туберкульозу, діагностичних препаратах, хімічних реактивах, обладнанні, дезінфекційних засобах та узагальненні цієї інформації.

- Проведення аналізу роботи лабораторій I–III рівнів та інформування керівників протитуберкульозних закладів та МОЗ України про результати діяльності мережі з питань діагностики туберкульозної інфекції.

- Розробка практичних рекомендацій щодо перспектив розвитку мережі лабораторій з діагностики туберкульозу (I–III рівні).

Основні функції:

- Виконує бактеріологічні дослідження на туберкульоз згідно з нормативно-правовими актами МОЗ України.

- Виконує посіви біологічного матеріалу на живильні середовища для виявлення неспецифічної мікрофлори у хворих, які супроводжують туберкульозний процес з визначенням чутливості до антибактеріальних препаратів.

- Здійснює консультативну допомогу щодо ідентифікації та визначення медикаментозної стійкості культур, що надходять з лабораторій нижчого рівня, у сумнівних та складних випадках.

- Організовує і здійснює зовнішній контроль якості та оцінку роботи лабораторій III рівня, проводить регулярні кураторські візити.

- Здійснює аналіз результатів досліджень, що надходять з лабораторій III рівня, про циркуляцію збудників туберкульозу, у тому числі хіміорезистентних варіантів, та створює базу даних для формування реєстру бактеріовиділювачів та хіміорезистентного туберкульозу.

- Здійснює аналіз роботи мережі лабораторій I–III рівнів та надає рекомендації, щодо поліпшення діагностичних досліджень на туберкульоз.

- Бере участь в організації і проведенні навчальних семінарів для бактеріологів лабораторій з діагностики туберкульозу.

- Здійснює розробку і впровадження в практику критеріїв оцінки роботи лабораторної мережі з діагностики туберкульозу.

- Здійснює визначення потреб, складання та подання заявок на централізоване придбання живильних середовищ, тест-систем для ідентифікації збудника, обладнання та хімічних реактивів.

- Дотримується вимог чинного законодавства з питань охорони праці, техніки безпеки, санітарно-протиепідемічного режиму.

- Утримує музей (колекцію) культур мікроорганізмів для проведення діагностичних, наукових досліджень та контролю якості.

- Надає консультативну допомогу фахівцям протитуберкульозних закладів у виборі найбільш інформативних, сучасних лабораторних тестів і трактуванні їх результатів.

Питання:

1. До якого рівня належить лабораторія, в якій ви працюєте?
2. Які дослідження повинні проводитися у вашій лабораторії?
3. Які дослідження проводяться в даний час? Яка лабораторія курує вашу лабораторію?
4. Яку допомогу ви можете одержати від лабораторії вищого рівня?

5. *Які з перерахованих вище функцій, відповідних рівню вашої лабораторії, вона виконує? Які функції не виконуються і чому?*

1.3 Документація щодо організації роботи бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби

Документація бактеріологічної лабораторії повинна відображати організацію її діяльності відповідно до вимог, викладених в Державних санітарних правилах 9.9.5.-080-2002 "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю", наказу МОЗ України від 02.09.2009 за № 657 "Про затвердження форм первинної облікової документації і форм звітності з туберкульозу та інструкцій щодо їх заповнення" та Правил уповноваження та атестації у державній метрологічній системі, затверджених наказом Державного комітету України з питань технічного регулювання та споживчої політики від 29 березня 2005 р. № 71, зареєстрованим в Міністерстві юстиції України 13.04. 2005 р. за № 392/10672.

Перелік основних документів що повинна мати лабораторія

I. Документація щодо лабораторії:

Положення про лабораторію (далі – Положення), затверджене керівником установи.

Положення повинно містити вступну частину, у якій наводиться назва лабораторії, сфера поширення положення, а також розділи:

- 1) "Загальні положення", у яких наводяться відомості щодо:
 - а. правового статусу і підпорядкованості лабораторії;
 - б. документів, керуючись якими лабораторія здійснює свою діяльність (посилання на законодавство України, керівні документи, статут установи, структурним підрозділом якої є лабораторія, організаційно-методичні документи тощо);
 - в. порядку оплати праці фахівців;
 - г. наявності в лабораторії системи забезпечення якості виконання досліджень (вимірювань);
 - д. порядку матеріально-технічного, юридичного та фінансового забезпечення лабораторії, а також юридичної та фінансової відповідальності установи за її діяльність.
 - е. наявності приміщень, засобів виміральної техніки, випробувального обладнання, організаційних, нормативних і методичних документів, що необхідні для виконання досліджень (вимірювань);
 - ж. порядку оформлення матеріалів за результатами досліджень (вимірювань).
- з. чіткого розмежування відповідальності за об'єктивність і достовірність результатів досліджень (вимірювань) між керівником лабораторії і адміністрацією установи;
- и. невтручання адміністрації установи у поточну діяльність лабораторії при проведенні досліджень (вимірювань).

2) "Роботи, що виконуються підрозділом", у якому наводиться посилання на відповідний розділ паспорта підрозділу;

3) "Структура та склад підрозділу", у якому наводяться:

а. організаційна структура лабораторії;

б. опис схеми управління та підпорядкованості;

в. порядок призначення та звільнення керівника лабораторії;

г. відомості щодо наявності фахівців, їхньої освіти, кваліфікації та досвіду роботи, відомості щодо атестації цих фахівців і наявності посадових інструкцій.

4) "Функції лабораторії", у якому наводяться функції, що виконує лабораторія відповідно до галузі атестації;

5) "Права лабораторії", у якому наводяться права лабораторії і її фахівців.

6) "Обов'язки лабораторії", у якому наводяться обов'язки лабораторії.

7) "Відповідальність підрозділу", у якому регламентується відповідальність керівника і співробітників лабораторії.

8) "Взаємодія лабораторії", у якому встановлюється порядок взаємодії лабораторії з органом з атестації, територіальним органом за місцезнаходженням та іншими підприємствами та організаціями.

Паспорт лабораторії, затверджений керівником установи.

Паспорт лабораторії має містити: реквізити лабораторії і медичної установи, в структуру якого входить лабораторія; в табличному вигляді: перелік досліджень, що виконує лабораторія; відомості про кадровий склад працівників, що виконують дослідження; наявність приміщень та їх стан; наявність засобів вимірювальної техніки, випробувального і допоміжного обладнання і їх стан; наявність організаційних, нормативних і методичних документів.

Дозвіл на роботу зі збудниками відповідних груп патогенності, оформлений відповідно до вимог ДСП 9.9.5-064-2000 "Порядок видачі дозволів на роботу з мікроорганізмами I–IV груп патогенності та рекомбінантними молекулами ДНК".

Свідоцтво(а) про атестацію, видане органом з атестації, невід'ємною частиною якого є Галузь атестації.

II. Організаційно-розпорядча документація – накази, інструкції та інші документи, що регламентують діяльність лабораторії.

III. Нормативна документація, що регламентує вимоги до об'єктів досліджень та методи досліджень.

IV. Документація щодо системи забезпечення якості досліджень:

Настанова з якості, як правило, повинна містити комплексний опис лабораторії та установи, до складу якої вона входить, порядку виконання досліджень (вимірювань). При розробці Настанови з якості слід керуватись ДСТУ ISO/TR 10013:2003 "Настанови з розроблення документації систем управління якістю". Настанова з якості повинна містити такі розділи:

- Призначення та галузь застосування;
- Політика в галузі якості;
- Загальні відомості про лабораторію;
- Персонал лабораторії;
- Засоби вимірювальної техніки та допоміжне обладнання;
- Умови проведення досліджень та метрологічних робіт;
- Процедури та методики проведення досліджень;
- Контроль за якістю проведення досліджень та коригувальні дії; Оформлення матеріалів за результатами досліджень, зберігання цих матеріалів.

V. Інструкції з протиепідемічного режиму, охорони праці та техніки безпеки

VI. Документи на обладнання та засоби вимірювальної техніки:

- реєстраційні документи на обладнання (журнал, картки та ін.);
- паспорт на кожну одиницю обладнання та засобів вимірювальної техніки;
- графіки та посвідчення повірок засобів вимірювальної техніки (можуть знаходитись у метролога) та документи з атестації обладнання. Журнали, в яких реєструються результати контролю обладнання.

VII. Документи, щодо живильних середовищ, діагностичних препаратів:

- Сертифікати державної реєстрації медичного виробу.
- Паспорт якості на конкретну серію медичного виробу.
- Інструкції про застосування медичного виробу.

VIII. Документація щодо персоналу лабораторії:

- Посадові інструкції.
- Документи з питань підвищення кваліфікації та атестації персоналу (свідоцтва, атестати та ін.).
- Дані щодо імунізації працівників.
- Журнали реєстрації інструктажів з питань безпеки праці, біологічної безпеки (протиепідемічного режиму), пожежної безпеки.
- Журнал реєстрації аварій.

IX. Первинна облікова та звітна документація

Форми, відповідно до наказу 02.09.2009 № 657 "Про затвердження форм первинної облікової документації і форм звітності з туберкульозу та інструкцій щодо їх заповнення",

форма № 410/о "Журнал внутрішнього контролю якості лабораторних досліджень", затверджена наказом МОЗ України від 11.07.2000 № 160.

Х. Накази керівника закладу:

- Про створення режимної комісії закладу.
- Про призначення відповідальних за дотримання протиепідемічного режиму в лабораторії.
- Про призначення відповідального за ведення музейних культур.
- Про призначення відповідального за метрологічне забезпечення тощо.

Співробітники лабораторії і клінічних підрозділів, дії яких безпосередньо впливають на якість лабораторних досліджень, повинні бути проінструктовані щодо використання "Настанови з якості" і застосування всіх включених до неї положень, в частині, що їх стосується. "Настанова з якості" повинна періодично переглядатися і доповнюватися відповідно до змін в структурі лабораторії, методах діагностики, нормативних документах, тощо.

На робочих місцях повинні знаходитися короткі СОПи – стандартні операційні процедури, що вказують послідовність процедур, що проводяться, а також інструкції щодо поведінки при виникненні аварійних ситуацій. СОПи є основою для навчання нового персоналу. Мета СОПів – показати працівникам що і коли робити. Це дає можливість керівництву мати всю інформацію про роботу персоналу, перевіряти правильність і повноту виконання необхідної роботи, простежити причину появи будь-якої невідповідності одержаних результатів вимогам нормативних документів. В зв'язку з цим використання СОПів вважається одним з найбільш важливих та ефективних управлінських механізмів контролю за правильним виконанням робіт в лабораторії.

Питання:

1. *Що входить в «Настанову з якості»?*
2. *Які документи з техніки безпеки ведуться у вашій лабораторії? Ким і як часто проводиться інструктаж з техніки безпеки у вашій лабораторії?*
3. *Які документи, що реєструють технічне обслуговування обладнання, ведуться у вашій лабораторії?*
4. *Що таке СОПи? Складіть список СОПів для вашої лабораторії.*

2 Персонал лабораторії і його підготовка

2.1 Вимоги до персоналу

До роботи з мікроорганізмами I–IV груп патогенності допускаються фахівці з вищою та середньою спеціальною освітою, зараховані на посаду у прийнятому порядку, які пройшли відповідну підготовку, володіють сучасними методами лабораторних досліджень. Післядипломна підготовка проводиться систематично в закладах, що мають право на проведення післядипломної освіти, не рідше, ніж один раз на п'ять років відповідно до Положення про порядок проведення атестації лікарів, затвердженого наказом МОЗ України від 19.12.97 № 359, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 14.01.98 за № 14/2454 та Положення про Свідоцтво про проходження підвищення кваліфікації та перепідготовки молодших медичних та фармацевтичних спеціалістів,

затвердженого наказом МОЗ України від 07.09.93 № 198, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 31.12.93 за № 208.

Персонал допускається до роботи тільки після проведення інструктажу з виконання вимог біологічної безпеки, охорони праці, пожежної безпеки відповідно до ДНАОП 0.00-4.15-98 та ДСП 9.9.5.-080-2002 "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю". Повторні інструктажі з виконання вимог біологічної безпеки та охорони праці проводяться щокварталу. Інструктаж з питань пожежної безпеки проводять 1 раз на рік.

Про проведення інструктажів та допуск до роботи, особа, яка проводила інструктаж, вносить запис до Журналу реєстрації інструктажів з питань охорони праці на робочому місці (Додаток 6 до пункту 6.10 "Типового положення про порядок проведення навчання і перевірки знань з питань охорони праці"). Сторінки журналу реєстрації інструктажів повинні бути пронумеровані, прошнуровані і скріплені печаткою.

Працівники, які мають безпосереднє відношення до експлуатації автоклавів або балонів із стиснутим або скрапленим газами, повинні пройти підготовку і мати посвідчення про допуск їх до роботи з автоклавами (балонами).

Попередні та періодичні медичні огляди працівників проводять відповідно до наказу МОЗ України від 21.05.2007 № 246 "Про затвердження Порядку проведення медичних оглядів працівників певних категорій", зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 23.07 2007 р. за № 846/14113.

2.2 Кваліфікаційні вимоги

Кваліфікаційні вимоги до працівників лабораторій викладені у Довіднику кваліфікаційних характеристик професій працівників. Випуск 78. Охорона здоров'я, затвердженому наказом МОЗ України від 29.03.2002 № 117.

Примірні положення про завідуючого бактеріологічною лабораторією (бактеріологічним відділом клініко-діагностичної лабораторії); про лікаря-бактеріолога; про фельдшера-лаборанта (лаборанта) затверджені наказом МОЗ України від 28.12.2002 № 500 "Про затвердження примірних положень в бактеріологічній службі системи МОЗ України".

2.3 Функціональні обов'язки

Кожен працівник повинен мати посадову інструкцію, що встановлює вимоги до освіти, функції, обов'язки, права, відповідальність, затверджену керівником установи. Посадові інструкції складаються на підставі типових положень про відповідних фахівців.

Функції завідуючого (керівника) лабораторії:

- Планування роботи лабораторії.
- Розробка посадових інструкцій для співробітників лабораторії, розподілення роботи між співробітниками.
- Оформлення матеріалів на отримання дозволу на роботу та атестацію (акредитацію) лабораторії.

- Організація розробки і систематичне удосконалення документації системи керування якістю, контроль за її виконанням.
- Впровадження в роботу лабораторії сучасних методів досліджень і нової лабораторної техніки.
- Організація та проведення заходів з підвищення кваліфікації персоналу лабораторії на робочому місці і в навчальних закладах післядипломної професійної освіти.
- Підготовка та подання адміністрації закладу замовлень щодо матеріально-технічного забезпечення лабораторії, перевірки засобів вимірювальної техніки, атестації та ремонту обладнання.
- Організація та контроль обліку та списання матеріальних цінностей, раціонального та ефективного використання лабораторної техніки, живильних середовищ, діагностичних препаратів, дезінфекційних засобів, лабораторного посуду, реактивів та інших витратних матеріалів, необхідних для якісної роботи.
- Спільно з керівниками зацікавлених закладів, структурних підрозділів розробляє та надає на затвердження адміністрації лікувально-профілактичного закладу, якому підпорядкована лабораторія, схему забору, зберігання, доставки до лабораторії матеріалу для досліджень, а також порядок видачі та отримання результатів досліджень.
- Контроль за дотриманням працівниками лабораторії правил охорони праці, біологічної та пожежної безпеки і прийняття заходів до порушників згаданих правил (через керівника установи);
- Розробка і забезпечення робочих місць відповідними інструкціями та правилами, що визначають безпеку роботи;
- Систематичне проведення з працюючими інструктажу на робочому місці щодо безпечних методів роботи;
- Недопущення до роботи осіб, які не пройшли відповідної підготовки та інструктажу і не мають (або мають прострочені) посвідчення про допуск до роботи,
- Створення умов безпечної експлуатації лабораторного обладнання, заборона роботи на несправному або не оснащеному пристроями, що забезпечують безпечність роботи, обладнанні;
- Організація та проведення систематичного профілактичного огляду, ремонту обладнання лабораторії з відповідною реєстрацією;
- Контроль за безпечним отриманням, транспортуванням, зберіганням, видачею та застосуванням культур збудників інфекційних захворювань, біологічного матеріалу, сильнотоксичних отруйних хімічних речовин, концентрованих кислот та лугів;
- Своєчасне розслідування (протягом 24 годин) обставин та причин нещасних випадків, що мали місце в лабораторії, вживання заходів щодо попередження виробничого травматизму та професійних отруєнь і захворювань;

- Контроль за правильним застосуванням, зберіганням, пранням та ремонтом спеціального (захисного) одягу, спецвзуття і запобіжних пристроїв;
- контроль наявності укомплектованої аптечки першої медичної допомоги.

Функції лікаря-бактеріолога:

- Проводить лабораторні дослідження у відповідності з покладеними на нього обов'язками.
- Забезпечує виконання адекватних уніфікованих, методично надійних методів досліджень.
- Освоює та впроваджує сучасні методи досліджень та нове лабораторне обладнання.
- Консультує лікарів інших спеціальностей з питань лабораторної мікробіологічної діагностики.
- Проводить інструктаж для персоналу лікувально-профілактичних закладів з питань правил забору, транспортування, зберігання проб клінічного матеріалу. Здійснює контроль за їх дотриманням.
- Організовує і контролює роботу середнього і молодшого медичного персоналу лабораторії.
- Здійснює інтерпретацію результатів лабораторних досліджень. Веде первинну облікову та звітну документацію за формами, затвердженими МОЗ України.
- Впроваджує внутрішньолaboratorний та зовнішній контроль якості бактеріологічних досліджень.
- Систематично узагальнює і аналізує результати роботи лабораторії за закріпленим розділом, складає та подає звіти у встановленому порядку.
- Виконує вимоги правил протиепідемічного режиму і техніки безпеки:
 - контролює правильність роботи підлеглого персоналу з цих питань;
 - попереджає порушення протиепідемічного режиму та техніки безпеки при здійсненні лабораторних робіт;
 - забезпечує правильне ставлення до роботи з культурами мікроорганізмів, отруйними та сильнодіючими, легкозаймистими і іншими речовинами на закріпленій ділянці роботи.
- Систематично підвищує свою професійну підготовку. Бере участь у підвищенні професійної підготовки персоналу лабораторії.
- Бере участь в складанні заявок на живильні середовища, діагностичні препарати, реактиви, дезінфекційні засоби інші витратні матеріали, необхідні для виробничої діяльності.

Функції лаборанта-бактеріолога:

- Виконує лабораторні дослідження у відповідності до нормативів навантаження, кваліфікаційних вимог (згідно кваліфікаційної категорії) та розподілу функціональних обов'язків у лабораторії (відділі).
- Веде облік і готує до роботи лабораторне обладнання, посуд, реактиви, середовища, діагностичні препарати, дезінфікуючі розчини і слідкує за їх

якістю, не допускаючи їх застосування з вичерпаним терміном придатності та дезінфекційних засобів, які втратили активність.

- Перевіряє придатність матеріалу, який надходить для дослідження, а саме: правильність пакування, транспортування, оформлення супроводжуючих документів, своєчасність доставки. Проводить реєстрацію, в тому числі з використанням персонального комп'ютера, виконує обробку та первинний посів матеріалу. В необхідних випадках доводить до відома завідуючого лабораторією або лікаря-бактеріолога про необхідність повторного забору матеріалу і доставки його до лабораторії.
- Здійснює оперативний зв'язок із структурними підрозділами лікувально-профілактичного закладу з питань забезпечення якості, своєчасності забору (первинного посіву) та доставки матеріалу в лабораторію та отримання результатів досліджень.
- Проводить стерилізацію лабораторного інструментарію, посуду, живильних середовищ, реактивів у відповідності із діючими нормативними документами.
- Здійснює контроль роботи парових та повітряних стерилізаторів із застосуванням необхідних контрольних тестів.
- Слідкує за справністю газової та електричної мереж, вентиляції. При виявленні дефектів інформує завідуючого (керівника) лабораторії.
- Працює з апаратурою та обладнанням. Здійснює поточний контроль за її станом. Слідкує за точністю роботи приладів, що використовуються. Проводить реєстрацію температурних параметрів обладнання та мікроклімату у робочих приміщеннях згідно нормативних документів.
- Веде первинну облікову документацію лабораторії (реєстраційні та робочі журнали досліджень, журнали роботи лабораторних приладів, тощо). Заповнює бланки результатів аналізу і надає їх на підпис до відповідного фахівця.
- Виконує доручення завідуючого бактеріологічною лабораторією (бактеріологічним відділом клініко-діагностичної лабораторії) з матеріально-технічного забезпечення підрозділу.
- Утримує робочі місця у порядку, проводить дезінфекцію робочих місць, боксів, холодильників, термостатів та іншого обладнання, знезараження відпрацьованого матеріалу, інструментів, посуду, спецодягу.
- Після закінчення робочого дня перевіряє і прибирає до спеціально визначених місць пробірки, чашки з посівами і культурами, склянки сильнодіючими речовинами. Пломбує термостати, холодильники і шафи, здає печатки і ключі спеціалісту, що відповідає за заразний матеріал або хімічні речовини.
- Здійснює контроль за роботою молодшого медичного персоналу, слідкує за виконанням ними правил протиепідемічного режиму та техніки безпеки.

3 Вимоги до влаштування бактеріологічної лабораторії

Приміщення лабораторії для бактеріоскопічних і культуральних досліджень з діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу має відповідати вимогам Державних санітарних правил 9.9.5.-080-2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», які поширюються на усі лабораторії, що працюють з мікроорганізмами III–IV групи патогенності.

Високий епідеміологічний ризик аерозольної передачі мікобактерій туберкульозу при маніпуляціях, що проводяться в лабораторії вимагає чіткого виконання цих правил. Влаштування лабораторії, розташування і організація робочих місць повинні не тільки знижувати ризик контамінації на робочих місцях, але і забезпечувати необхідні заходи безпеки при роботі персоналу із збудником туберкульозу, запобігаючи внутрішньо лабораторному інфікуванню.

Роботу з біологічними агентами III–IV групи патогенності (зокрема з діагностичним матеріалом, підозрілим на вміст таких) можуть проводити тільки лабораторії, що мають дозвіл на роботу (обласної/міської) режимної комісії. Мікобактерії туберкульозу належать до III групи патогенності.

3.1 Вимоги до приміщення бактеріологічної лабораторії

Лабораторії, що виконують мікробіологічні дослідження з діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, повинні мати відповідний набір виробничих і допоміжних приміщень (з дотриманням необхідної площі цих приміщень).

Чинні нормативні документи регламентують, як правило, загальні вимоги, що пред'являються до бактеріологічних лабораторій, які працюють з мікроорганізмами певної групи патогенності. В той же час бактеріологічні лабораторії, що виконують дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, мають свої специфічні особливості. У зв'язку з тим нижче наведені рекомендації по влаштуванню спеціалізованих бактеріологічних лабораторій протитуберкульозних закладів, що виконують мікробіологічні дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу. Вказані рекомендації враховують вимоги існуючих в даний час вітчизняних нормативних документів і специфіку роботи зазначених лабораторій. Крім того, при складанні даних рекомендацій враховувався досвід роботи зарубіжних лабораторій і загальноприйняті міжнародні стандарти.

Рекомендується дотримуватись наступних основних вимог до влаштування приміщень лабораторії, яка здійснює мікробіологічну діагностику туберкульозу.

Лабораторії розташовують, як правило, в окремому будинку з 2-ма входами (перший для персоналу, другий для прийому матеріалу для дослідження (дозволяється прийом через передаточне вікно) або в ізольованій частині будинку. Лабораторія повинна бути відокремлена від інших частин будинку, де дозволено вільний прохід.

На вхідних дверях повинні бути позначені: назва лабораторії і міжнародний знак "Біологічна небезпека", графік роботи лабораторії. Двері повинні мати кодові замки. Всі приміщення лабораторії повинні бути непроникними для гризунів та комах. Вікна цокольного і першого поверхів, незважаючи на наявність охоронної сигналізації, закривають металевими ґратами, що не порушують правил пожежної безпеки.

Бажано, щоб загальна площа лабораторії складала не менше 300 м².

Лабораторія повинна бути розділена на інфіковану ("заразну") зону, де відбувається рух і обробка діагностичного (потенційно заразного) матеріалу, що поступає в лабораторію, і неінфіковану ("чисту") зону, між "заразною" та "чистою" зонами повинен бути обладнаний санпропускник з душем.

У лабораторії повинен бути створений епідеміологічно безпечний шлях руху досліджуваного матеріалу від прийому, первинної обробки і дослідження – тобто поточність проведення дослідження.

Для виконання мікробіологічних досліджень з діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу лабораторія повинна мати необхідний набір приміщень, що мають відповідне призначення і забезпечують дотримання санітарно-гігієнічних норм та режиму біологічної безпеки. Необхідний перелік приміщень передбачено ДСП 9.9.5-080-2002 "Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю".

Набір приміщень і вимоги до них

Нижче надано рекомендований перелік робочих і допоміжних приміщень бактеріологічної лабораторії протитуберкульозного закладу, що виконує весь комплекс мікробіологічних досліджень з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, з орієнтовною площею кожного приміщення.

У "заразній" зоні:

- приміщення для прийому матеріалу (6 м²);
- приміщення для первинної реєстрації матеріалу і видачі результатів досліджень (10 м²);
- приміщення для обробки матеріалу, приготування і фарбування мазків, проведення посівів, постановки тестів на чутливість до протитуберкульозних препаратів (20–25 м²)
- термальна або термостатна кімната (7 м²)
- приміщення для перегляду посівів та проведення світлової мікроскопії (12–16 м²);
- приміщення для люмінесцентної мікроскопії (12 м²);
- приміщення для роботи лікарів (бактеріологічна) (12 м²);
- автоклавна для знезараження матеріалу (16 м²);
- комора для дезінфікуючих засобів (4–6 м²);
- санвузол.

У "чистій" зоні:

- мийна (18 м²);

- препараторська-лаборантська (підготовка посуду) (12 м²);
- стерилізаційна (у сухожарових шафах) (15 м²);
- приміщення для виготовлення живильних середовищ з боксом (18/4 м²);
- чиста автоклавна (стерилізаційна) (16 м²);
- ординаторська для лікарів (12 м²);
- кабінет старшого лаборанта (10 м²);
- кабінет завідувача лабораторією (12 м²);
- кімната для холодильників (може не бути) (8–10 м²);
- складське приміщення (5–10 м²);
- санвузол;
- кімната для персоналу (14 м²);
- кімната для одягання робочого одягу (12 м²);
- гардероб для верхнього одягу (12 м²).

Приміщення лабораторії повинні бути обладнані водопроводом з гарячою і холодною водою та каналізацією відповідно до СНіП 2.04.01-85. Усі лабораторні кімнати обладнуються водопровідними раковинами зі змішувачами холодної та гарячої води для миття рук персоналу, які розміщують біля виходу. Рекомендується використовувати хірургічні або сенсорні водопровідні крани. Забороняється використовувати "повітряні рушники". Для витирання рук після миття слід користуватися одноразовими паперовими рушниками.

Безпосередньо біля раковини встановлюють пристрої, в яких повинні постійно знаходитися миючі засоби і для дезінфекції рук.

У деяких кімнатах (автоклавна в "заразній" зоні, мийна кімната) слід передбачити наявність спеціальних (широких) каналізаційних стоків (наприклад, для зливу води після прибирання лабораторії і інших потреб). Місця біля раковин, інших санітарно-технічних приладів, а також обладнання, експлуатація якого пов'язана зі зволоженням стін, облицьовують глазурованою плиткою або іншими вологостійкими матеріалами.

Усі приміщення лабораторії повинні мати природне та штучне освітлення, яке відповідає вимогам СНіП II.4-79 та ДСН 3.3.6.042-99. Для окремих кімнат (термальна) допускається відсутність природного освітлення. У кожній кімнаті повинен бути загальний вимикач. Світильники і арматура повинні бути закритого типу і доступні для вологої обробки.

Приміщення лабораторії повинні мати центральне опалення. Опалювальні прилади повинні бути з гладкою поверхнею, яка легко чиститься та дезінфікується.

Температура повітря в лабораторних кімнатах повинна підтримуватись у межах 18–20 °С. Для підтримання оптимального температурного режиму в робочих кімнатах та боксах рекомендовано встановлювати кондиціонери. Під час роботи з біологічним матеріалом їх вимикають.

Ширина коридору лабораторії повинна бути не менше 2 м. У лабораторії не повинно бути порогів. Двері з кімнат з автоклавами повинні відкриватися назовні.

Стіни, стеля і підлога лабораторії повинні бути покриті гладким, не адсорбуючим матеріалом, який можна легко мити і дезінфікувати. Крім того, цей матеріал повинен бути стійким до хімічних реактивів, використовуваних у лабораторії. Підлога не повинна бути слизькою. Стики опорядження стін, підлоги, стелі повинні мати закруглення (галтелі) для зручності санітарної обробки та прибирання.

Двері всіх виробничих приміщень повинні бути гладкими, без виступів. Вікна і двері приміщень "заразної" зони повинні бути герметичними.

Приміщення лабораторії, де проводять роботу із досліджуванним матеріалом, обладнуються ультрафіолетовими опромінювачами.

Приміщення лабораторій повинні розташовуватись відповідно до ходу виконання досліджень і забезпечуватись раціональним розміщенням до основних потоків технологічного процесу з "чистої" зони в "заразну".

"Чиста" зона лабораторії – приміщення, в яких не проводяться роботи з інфікованим матеріалом або культурами. Рух інфекційного матеріалу по лабораторії ніде не повинен перетинати потік повітря в "чисте" приміщення.

"Заразна" зона лабораторії – це приміщення, робота в яких найбільш небезпечна для персоналу. У цих приміщеннях проводять роботи з діагностичним матеріалом і культурами мікобактерій. Найбільш небезпечними є приміщення, в яких проводиться обробка діагностичного матеріалу (деконтамінація і посів).

У лабораторіях, де проводяться дослідження чутливості до медикаментозних препаратів, найбільш інфекційно небезпечною є зона, в якій готують мікобактеріальну суспензію для посіву. У "заразних" приміщеннях персонал повинен бути одягнений в спеціальний одяг. При переході в "чисту" зону верхній одяг повинен змінюватися. Посів на МБТ завжди повинен здійснюватися в окремому, ізольованому приміщенні.

Влаштування вентиляції

В усіх лабораторіях, що будуються або реконструюються, необхідно передбачити обладнання автономної припливно-витяжної вентиляції з встановленням фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається із "заразної" зони. Якщо робочі приміщення "заразної" зони оснащені боксами біологічної безпеки з ламінарним потоком повітря та HEPA фільтрами (фільтри тонкого очищення повітря), достатньо обладнання цих приміщень загальною обмінною припливно-витяжною вентиляцією без фільтрів тонкого очищення повітря. Вентиляція блоку лабораторії повинна забезпечувати по відношенню до прилеглих приміщень:

- для робочих приміщень з ламінарними боксами для роботи зі стерильним матеріалом – підпір повітря;

- для боксів (або робочих приміщень з ламінарними боксами) для роботи з патогенним матеріалом – розрідження повітря.

- неможливість попадання інфекційних аерозолів з "заразної" зони лабораторії в "чисту" зону лабораторії, інші приміщення і вентиляційну систему медичного закладу.

Магістральні коробки припливно-витяжної вентиляції, електричних, водопровідних, каналізаційних мереж розміщуються у спеціальних нішах коридорів, щоб забезпечити вільний доступ до них під час профілактичного огляду та ремонту.

Відповідно до СНіП 2.04.05-91, ДСН 3.3.6.042-99 бактеріологічні лабораторії з діагностики туберкульозу повинні забезпечувати необхідні (зокрема – інженерні) заходи безпеки при роботі персоналу із збудником туберкульозу:

- зниження концентрації інфекційних аерозолів в повітрі, що включають (по мірі збільшення складності) видалення і обмін повітря шляхом природної вентиляції, яка допустима тільки для неінфікованих приміщень;

- організацію в лабораторії примусової вентиляції повітря в приміщеннях і на робочих місцях (загальна і локальна вентиляція), що виключає попадання інфекційного аерозолу в коридори і інші суміжні приміщення;

- видалення і знезараження інфекційного аерозолу, що знаходиться в повітрі приміщень, з використанням технічних засобів.

Загальна примусова вентиляція (припливна, витяжна або припливно-витяжна) повинна забезпечувати видалення забрудненого (інфікованого) повітря з приміщень і перешкоджати виникненню застійних зон.

У разі використання припливної вентиляції як єдиного інженерного заходу щодо очищення повітря, вона повинна забезпечувати щонайменше шестикратний повітрообмін в інфікованій зоні лабораторії. З цією метою місця надходження і відбору повітря повинні бути розміщені так, щоб чисте повітря спочатку прямувало в ті частини кімнати, де працює персонал, а потім, обтікаючи джерело інфекції, поступало на викид.

Локальна вентиляція повинна забезпечувати видалення інфікованого повітря із зони роботи з інфікованим матеріалом. Вона може бути організована у вигляді локальних витяжок і інших технічних пристроїв.

При роботі з інфікованим матеріалом локальна витяжна вентиляція повинна бути оснащена бактерицидними фільтрами або іншими пристроями, що запобігають викиду інфекційного аерозолу назовні, а також зворотний струм повітря у момент виключення вентиляції. Лінійна швидкість потоку повітря таких пристроїв зазвичай складає 0,3–1,0 м/с.

Знезараження повітря і системи рециркуляції повітря усередині приміщень.

Системи знезараження повітря повинні забезпечувати зниження концентрації інфекційного аерозолу в повітрі і підтримку її на заданому нормативними документами рівні.

Пристрої знезараження повітря можуть використовуватися як в системі загальної вентиляції, так і в автономному режимі рециркуляції повітря у приміщенні. Перевагою використання пристроїв знезараження повітря рециркуляційного типу є можливість зменшення кратності повітрообміну і витрат електроенергії у порівнянні з системами загальної вентиляції, а також простота експлуатації і технічного обслуговування. Конструкції внутрішньо

кімнатних систем рециркуляції можуть розрізнятися, тому їх застосування повинне контролюватися відповідно підготовленими фахівцями.

Стаціонарні і портативні установки на основі фільтрів тонкої очистки ("HEPA") ефективні, проте є дорогими і вимагають постійного інженерного обслуговування. При використанні таких пристроїв необхідно контролювати стан фільтрів і здійснювати їх своєчасну заміну і утилізацію. Крім того, такі пристрої повинні гарантувати високу ефективність фільтрації інфекційного аерозолі і працювати безперервно для виключення можливості вторинного попадання відфільтрованого інфекційного аерозолі в повітря приміщення.

Пристрої, що інактивують мікроорганізми, повинні забезпечувати руйнування мікробних клітин в процесі обробки повітря і не робити негативного впливу на повітряне середовище, матеріали, обладнання і людину. Крім того, системи рециркуляції не повинні створювати турбулентних і коротко замкнутих потоків повітря і не повинні порушувати схему потоків загальної або локальної вентиляції.

У зв'язку з викладеним, такі установки повинні мати необхідні документи, що вирішують їх використання в протитуберкульозних установах, а також методичну документацію за правилами експлуатації і рекомендації по їх використанню в приміщенні. Вказані системи можуть бути представлені ламінарними шафами, фільтруючими або знезаражувальними пристроями і/або приладами, що поєднують вказані функції.

Основні вимоги до вентиляції

У лабораторіях, що виконують мікробіологічні дослідження з діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, слід передбачати автономну *припливно-витяжну* вентиляцію з установкою фільтрів тонкого очищення повітря, що викидається із "заразної" зони. При цьому вікна і двері приміщень "заразної" зони лабораторії повинні бути герметичними. Наявна витяжна вентиляція "заразної" зони лабораторії повинна бути ізольована від інших вентиляційних систем і обладнана фільтрами тонкої очистки повітря. При використанні для роботи з інфікованим матеріалом у лабораторії боксів біологічної безпеки тільки II класу і відсутності інших локальних витяжних систем, загальна система витяжної вентиляції може бути використана без установки фільтрів.

Що стосується кратності повітрообміну, то, згідно з чинними вітчизняними нормативами, у "заразній" зоні бактеріологічної лабораторії повинна бути забезпечена 6–8-кратна заміна повітря за годину (зарубіжні нормативи передбачають наявність 12-кратного обміну повітря за годину).

Відповідно до Методичних рекомендацій ВООЗ (1998) і Міжнародного Союзу боротьби з туберкульозом (1998) для лабораторних служб в рамках національних програм боротьби з туберкульозом в бактеріологічних лабораторіях, що працюють зі збудником туберкульозу, рекомендується передбачати системи вентиляції з негативним тиском в "заразній" зоні. Це дозволить запобігти можливості попадання інфікованого повітря в "чисту" зону лабораторії.

Згідно із зазначеними рекомендаціями, рух повітряних потоків в лабораторії повинен бути повністю контрольований і налаштований так, щоб повітряний потік прямував з "чистої" зони в "заразну". Вентиляційна система повинна бути збалансована таким чином, що свіже фільтроване вуличне повітря прямує в "чисті" зони, тоді як рівне за об'ємом повітря видаляється через "забруднені" зони лабораторії. Завдяки цьому існуватиме постійний повітряний потік з "чистої" зони лабораторії в "заразну".

Повітря, що поступає в лабораторію, має бути очищене від пилу за допомогою фільтру грубого очищення, а в зимовий час підігріте в калориферах. Повітря, що видаляється з лабораторії, повинне перед виходом пройти через фільтри тонкого очищення. Локальні витяжні системи (витяжні шафи, шафи біобезпеки I класу) підключаються до системи витяжної вентиляції "заразної" зони. Виняток можуть становити тільки шафи II класу біобезпеки, які можуть як підключатися до загальної витяжної системи, так і працювати автономно.

Стандарти повітрообміну і різниці тиску слід встановлювати в залежності від числа аналізів на рік і відсотка позитивних аналізів серед них. Якщо бактеріологічні методи виконуються у чіткій відповідності із стандартами безпеки і всі потенційно небезпечні процедури виконуються в шафі біологічної безпеки, ризик інфікування буде мінімальним.

6–12-кратний повітрообмін за годину достатній для видалення з приміщення 99,0 % аерозолів протягом 30–45 хвилин. Обладнання, що подає і видаляє повітря з лабораторії, слід розташовувати на протилежних стінах, при цьому напрям руху повітря здійснюється з "чистої" зони в "заразну". Надлишок що подається і рівень об'єму повітря, що видаляється, має бути достатній для створення необхідної різниці тиску між "чистими" і "заразними" приміщеннями.

Повітря повинне виводитися безпосередньо назовні на рівні не менше 3 метрів над поверхнею землі. Вивідний отвір вентиляційної труби не повинен знаходитися перед або під вікнами житлових або робочих приміщень.

Таке планування приміщень лабораторії дозволяє знизити ризик інфікування не тільки співробітників лабораторії, але і людей, що знаходяться в інших приміщеннях даного медичного закладу.

Монтаж вентиляційної системи необхідно проводити одночасно з влаштуванням приміщень лабораторії. Це дозволить прибрати вентиляційні труби під стелю і забезпечити тим самим зручність санітарної обробки робочих приміщень (миття і дезінфекцію).

3.2 Розміщення приладів та обладнання в лабораторії

Лабораторія повинна мати обладнання та засоби вимірювальної техніки (далі – ЗВТ), що необхідні для проведення досліджень. На кожен одиницю обладнання, що використовується у лабораторії, має бути паспорт від підприємства-виробника; розроблена, затверджена керівником установи та вивішена на робочому місці інструкція з експлуатації, з урахування вимог біологічної безпеки.

Прилади, що використовуються, повинні відповідати нормам безпеки і електромагнітної сумісності. Все лабораторне обладнання має бути заземлене, перевага віддається застосуванню трьох контактних штепсельних вилок.

Обладнання та ЗВТ повинні відповідати вимогам НД на методи досліджень, що проводить лабораторія, і утримуватися в умовах, що забезпечують їх зберігання, захист від пошкоджень та передчасного зношування.

На обладнання, що потребує періодичного технічного обслуговування, повинні бути затверджені графіки технічного обслуговування, а для ЗВТ – графіки перевірки.

Прилади, меблі та обладнання розміщують таким чином, щоб забезпечити найбільшу зручність у роботі, простоту використання, чищення, знезараження, контролю і найменші затрати часу на переходи.

Столи, на яких проводяться мікроскопічні дослідження при денному освітленні, повинні розміщуватись біля вікон.

Лабораторні меблі повинні бути з пластиковим покриттям або пофарбовані олійною (емалевою) фарбою світлих тонів. Лабораторні стільці повинні мати гігієнічне покриття, що добре миється. Внутрішні та зовнішні поверхні меблів повинні бути гладкими, без щілин та пазів, що утруднюють обробку знезаражуючими речовинами.

Робочі поверхні столів повинні бути із водонепроникного, кислото-лужностійкого, вогнетривкого матеріалу, який не псується від обробки УФ променями та дезінфікуючими розчинами. Стандартна ширина робочої поверхні 76 см.

Газові пальники повинні утримуватися в чистоті та порядку, для чого їх періодично розбирають і чистять; мати справні крани і м'які з'єднуючі шланги, що не допускають проникнення газу до приміщення.

Центрифугу розміщують так, щоб працівник був в змозі бачити і правильно розміщувати на її дні стакани.

Термостати і термостатні кімнати дезінфікують не рідше одного разу на місяць. Обробку їх здійснюють тільки при вимкненні із мережі.

При експлуатації термостата персоналу лабораторії забороняється:

- ставити в термостат легкозаймисті речовини;
- самостійно знімати запобіжні ковпаки з регулюючого обладнання.

При зберіганні в холодильниках заразного матеріалу необхідно вживати заходи для попередження його забруднення. Розморожування рефрижератора, що передбачене правилами експлуатації, об'єднують з його дезінфекцією.

Всі контейнери, що зберігаються в холодильнику (рефрижераторі), повинні мати чіткі етикетки із зазначенням матеріалу, що зберігається.

Контроль температурного режиму в термостатах і холодильниках проводиться щоденно з відміткою у відповідних формах.

Нижче наведений опис приміщень бактеріологічної лабораторії з діагностики туберкульозу і розташованого в них обладнання та лабораторних меблів.

Опис носить рекомендаційний характер і має використовуватися з урахуванням індивідуальних особливостей і загальної площі приміщення, в якому розміщується лабораторія.

Приміщення для прийому матеріалу на дослідження

Матеріал, що поступає в лабораторію, може подаватися через вікно/люк або через двері в окреме приміщення (прийом матеріалу), що знаходиться в "заразній" зоні лабораторії. На входних дверях в лабораторію необхідна наявність дзвінка для виклику співробітника лабораторії.

У кімнаті для прийому матеріалу рекомендується мати стіл для прийому матеріалу (над яким обов'язково слід розмістити УФ-опромінювач), шафу для зберігання щоденного запасу стерильних контейнерів для збору мокротиння, які роздаються у відділення лікувального закладу, і оборотних біксів з контейнерами, що роздаються у райони.

Приміщення для первинної реєстрації матеріалу

У цій кімнаті проводиться перегляд зразків матеріалу, що надходить в лабораторію. Працівник лабораторії повинен дістати контейнери з бікса, оглянути їх, обробити поверхню контейнерів розчином дезінфектанту, а потім обробити бікс.

Далі перевіряється відповідність даних супроводжуючої документації і фактичного вмісту контейнера, нумеруються зразки і необхідні дані заносяться до лабораторного реєстраційного журналу. Після закінчення цих операцій матеріал направляється для подальшої роботи.

Дане приміщення може бути обладнане спеціальними, такими, що витримують обробку дезінфектантами, лабораторними столами для розбору матеріалу з улаштуванням над ними місцевої витяжної вентиляції.

Крім того, у даному приміщенні рекомендується мати окремий стіл для журналу первинної реєстрації матеріалу, невелику сухожарову шафу для обробки направлень на проведення досліджень і холодильник для зберігання проб мокротиння.

Приміщення для проведення попередньої обробки діагностичного матеріалу, проведення посівів, приготування і фарбування мазків

Приміщення повинно бути обладнане ламінарною шафою біологічної безпеки 2-го класу, де проводиться залив деконтамінанту в контейнери з діагностичним матеріалом. У вказаному приміщенні встановлюють також термостат, в який поміщають проби, залиті деконтамінантом для обробки матеріалу, і центрифуги для центрифугування проб діагностичного матеріалу після його первинної обробки.

У приміщенні має бути все необхідне для приготування мазків і посіву на живильні середовища. Бажано, щоб зона, де виконуються найбільш небезпечні етапи, розташовувалася в найдалішій частині основної робочої зони. У даному приміщенні може бути встановлена інкубатор-пічка для висушування мазків, повинні бути лабораторні столи (для надписування предметних скелець,

пробірок, тощо) і шафи для зберігання щоденного запасу лабораторного посуду і інструментів.

Для фарбування виготовлених мазків рекомендується виділити окреме ізольоване робоче місце – у витяжній шафі з вбудованою в нього спеціальною двосекційною мийкою для фарбування мазків. В цьому приміщенні дозволяється визначення чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів.

Термальна кімната

В лабораторії може бути термальна кімната із стабільною температурою 37 °С, яка призначена для інкубації посівів. Вказана температура повинна підтримуватись на постійному рівні у всьому об'ємі даного приміщення. Вхід в термальну кімнату рекомендується обладнати *тамбуром* для запобігання різкого зниження температури при відкриванні дверей в термальну кімнату. Стіни, стеля, підлога кімнати, а також стелажі для культур повинні бути виконані з матеріалу, що піддається дезінфекційній обробці.

Якщо термальна кімната відсутня термостати (2–3 од.) об'ємом 700–1000 л встановлюють в робочій кімнаті, де здійснюються посіви клінічного матеріалу. Проведення перегляду культур може здійснюватися в окремій кімнаті, якщо дозволяє площа лабораторії. Оформлення результатів може проводитися тут, а потім дані можуть передаватися для внесення їх в комп'ютерну картотеку і лабораторний журнал.

Приміщення для світлової мікроскопії

У приміщенні встановлюються світлові мікроскопи і шафки для зберігання мазків. Рекомендується мати окремий стіл для реєстрації результатів.

За відсутності спеціально виділеного приміщення, і якщо дозволяє площа даної кімнати, в ній можна розмістити столи і шафи для зберігання і заповнення ручної картотеки, а також для реєстрації результатів досліджень в журналах і заповнення всілякої документації. У цій кімнаті може проводитися оформлення результатів, а потім дані можуть передаватися для внесення їх в комп'ютерну картотеку.

Приміщення для люмінесцентної мікроскопії

Для люмінесцентної мікроскопії рекомендується мати окрему кімнату. Це пов'язано з тим, що проводити мікроскопічне дослідження препаратів на люмінесцентному мікроскопі слід в затемненому приміщенні. Вона обладнується люмінесцентним мікроскопом і столом для роботи з документацією.

За відсутності в лабораторії достатньої кількості приміщень люмінесцентний мікроскоп може бути встановлений в кімнаті для світлової мікроскопії.

Приміщення для визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів

Постановка тестів на чутливість до антимікобактеріальних препаратів є найбільш небезпечною з епідемічної точки зору процедурою в бактеріологічній лабораторії, яка проводить дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу.

Для цього необхідним є ламінарна шафа 2-го класу біологічної безпеки. У безпосередній близькості від шафи рекомендується встановити лабораторний стіл для проведення підготовчих операцій до постановки тестів з розстановкою на ньому всього необхідного для роботи.

Приміщення для роботи лікарів

Дане приміщення призначене, в першу чергу, для роботи лікарів з документацією і може бути виділено за наявності в лабораторії достатньої кількості вільної площі.

В цьому випадку дане приміщення може бути використане для оформлення лікарями результатів досліджень, що видаються в клінічні підрозділи, а також для реєстрації результатів досліджень в журналах і заповнення різної документації.

Приміщення також може бути використане для роботи лікаря з виділеними культурами мікобактерій (в тому разі якщо в приміщенні, призначеному для перегляду посівів, недостатньо місця). Для виконання цієї роботи потрібно виділити в приміщенні окрему робочу зону і встановити в ній спеціальний лабораторний стіл, що має поверхню, що легко піддається обробці дезінфікуючими засобами. Над цим столом рекомендується встановити УФ-опромінювач.

Приміщення для знезараження інфікованого матеріалу в «брудних» автоклавах

Приміщення обладнують автоклавами, а також столами для брудних біксів і інфікованого посуду, та окремо – для стерильного посуду. Покриття стола має бути стійким до дії дезінфікуючих засобів.

У кімнаті повинен бути обладнаний спеціальний каналізаційний стік для зливу води після прибирання «заразної» зони лабораторії.

З кімнати для знезараження матеріал після автоклавування передають через вікно в мийну кімнату.

Вікно для передачі в мийну кімнату знезараженого посуду має бути досить широким і герметично закриватися. Для зручності передачі біксів не рекомендується розташовувати вікно дуже високо, бажано – на рівні столу.

Комора у "заразній" зоні

Використовується для зберігання дезінфікуючих засобів і прибирального інвентарю для «заразної» зони.

Тамбур-шлюз при переході з "заразної" зони в "чисту" і навпаки

Санпропускник

Персонал лабораторії входить в "заразний" блок лабораторії через тамбур. Перед початком роботи в "заразному" блоці співробітники знімають і залишають в тамбурі халати, призначені для роботи в "чистому" блоці, і надягають халати, призначені для роботи в "заразному" блоці. У свою чергу, після закінчення роботи в "заразному" блоці, виходячи з нього, співробітники залишають у тамбурі ті халати, в яких вони працювали в "заразній" зоні, і знову надягають свої халати для роботи в "чистій" зоні.

Халати, призначені для роботи в "чистому" блоці, рекомендується міняти не рідше, ніж 1 раз на тиждень або за потребою. Халати, призначені для роботи в «заразному» блоці, рекомендується міняти щодня, після закінчення роботи з інфікованим матеріалом.

У тамбурі повинен бути запас одноразових халатів, шапочок і бахіл. У тамбурі рекомендується встановити 2 окремі шафи для халатів (у одній вішати халати, призначені для роботи у "чистому" блоці, в іншій – для роботи в «заразному» блоці лабораторії). Крім того, в тамбурі повинні бути контейнери для скидання халатів, що використані в «заразній» зоні і підлягають дезінфекції і пранню, а також для одноразових халатів, шапочок і бахіл, що підлягають дезінфекції і утилізації.

У тамбурі повинна бути раковина для миття рук.

При нагоді, рекомендується також забезпечити наявність санпропускника при виході з "заразної" зони. В цьому випадку персонал лабораторії може покинути "заразну" зону і перейти у "чисту" як через санпропускник, так і через тамбур.

Мийна кімната

Рекомендується обладнати дану кімнату глибокою і широкою двосекційною мийкою для миття посуду, столами для посуду, шафою сушильно-стерилізаційною для підсушування вимитого посуду, шафою для зберігання чистого вимитого посуду, біксів, штативів тощо, електричною плитою (під побутовою витяжкою).

У цій кімнаті може бути встановлений дистильатор.

Дистильована вода потрібна в лабораторії для ополіскування посуду після миття, для заливки її в автоклави і для приготування розчинів для живильних середовищ і реактивів.

Кімнату рекомендується обладнати спеціальним каналізаційним стоком для зливу води після прибирання "чистої" зони лабораторії і залишків живильних середовищ після автоклавування.

Препараторська-лаборантська

Дане приміщення рекомендується обладнати лабораторними столами для роботи з посудом. Крім того, тут може бути встановлена шафа для зберігання

вати, паперу для пакування посуду, марлі та ін. матеріалів. Допускається встановлювати у препараторській сухожарову шафу.

Стерилізаційна

Дане приміщення обладнується сухожаровими шафами для стерилізації посуду. Крім цього, в приміщенні може бути встановлена шафа для зберігання стерильного посуду, а також шафа для зберігання підготовлених до видачі за межі лабораторії оборотних біксів з контейнерами.

Приміщення для виготовлення живильних середовищ із боксом для розливу

Приміщення обладнується електричною плитою для варки середовищ, лабораторними столами для виготовлення середовищ, реактивів, технічними і аналітичними вагами, рН-метром, мікрохвильовою пічкою, апаратом для згортання живильних середовищ (АЗПС). Якщо дозволяє площа приміщення, встановлюють шафи для зберігання стерильних сольових розчинів, реактивів, холодильники.

У боксі для розливу живильних середовищ встановлюється ламінарна шафа для розливу їх у стерильних умовах.

У цій же кімнаті, за умови достатніх її розмірів, біля раковини, можна встановити дистильатор.

Чиста автоклавна

У кімнаті для стерилізації встановлюють автоклав і лабораторний стіл.

Ординаторська для лікарів

Дане приміщення призначене, в першу чергу, для роботи лікарів з документацією в "чистій" зоні і може бути виділене як окреме приміщення за наявності в лабораторії достатньої кількості вільної площі.

Дане приміщення може бути використане для роботи з документацією на комп'ютері (за наявності комп'ютерної бази даних), а також для роботи лікарів з літературою та для складання звітів.

Кабінет старшого лаборанта

У цій кімнаті старший лаборант заповнює табель і іншу документацію (заявки, журнали і ін.), а також відпускає співробітникам лабораторії спирт і витратні матеріали. У кімнаті можуть бути розміщені сейфи і шафи для зберігання спирту, дорогих реактивів, невеликого запасу витратних матеріалів (в т.ч. вати, марлі і т. д.).

Кабінет завідувача лабораторією

Кімната для холодильників

Якщо площа лабораторії дозволяє, рекомендується виділити у "чистій" зоні лабораторії окреме приміщення для холодильників (у них зберігаються готові

живильні середовища, реактиви, тощо.). У цій кімнаті також може бути встановлена спеціальна шафа для реактивів (крім прекурсорів), яка замикається.

Матеріальна кімната

Використовується як складське приміщення. У приміщенні зберігається наявний в лабораторії запас реактивів (крім прекурсорів) і витратних матеріалів.

Відповідно до постанови Кабінету Міністрів України від 06.05.2000 р. № 770 "Про затвердження переліку наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів" окремі реактиви, такі як калію перманганат, сірчана кислота, соляна кислота віднесені до списку 2 таблиці IV "Прекурсори, стосовно яких встановлюються заходи контролю". Умови їх зберігання мають відповідати "Вимогам до об'єктів і приміщень, призначених для здійснення діяльності з обігу наркотичних засобів, психотропних речовин, прекурсорів та зберігання вилучених з незаконного обігу таких засобів і речовин", затвердженим наказом МВС від 15.05.2009 № 216, зареєстрованим в Міністерстві юстиції України 12 серпня 2009 р. за № 759/1677 (далі – Вимоги).

Відповідно до пунктів 2.1.6. та 3.1.6. зазначених Вимог приміщення, які використовуються для зберігання прекурсорів списку 2 таблиці IV Переліку, за умови місячного обсягу запасу цих речовин не більше, ніж 15 кг (л), повинні відповідати таким вимогам:

- окрема кімната в капітальній будівлі має бути обладнана сейфами або металевими шафами;
- вхідні двері повинні бути добре підігнані під дверну коробку, металеві або дерев'яні повнотілі, товщиною не менше 40 мм, мати не менше двох врізаних не самозамикальних замків;
- віконні отвори приміщень з внутрішнього боку чи між рамами мають бути обладнані металевими ґратами. Допускається використання декоративних ґрат чи жалюзі, які за міцністю не повинні поступатися зазначеним вище ґратам.

Приміщення повинні бути обладнані засобами автономної сигналізації, що захищають внутрішні об'єми і площі приміщень, сейфи (металеві шафи), що використовуються для зберігання, з виведенням сигналу "тривога" на пульти централізованого спостереження або місцеві звукові й світлові сигналізатори.

Кімната для персоналу

Кімната відпочинку і прийому їжі для співробітників лабораторії.

Приміщення для одягання робочого одягу

Для кожного співробітника лабораторії в кімнаті повинна бути встановлена двосекційна шафа: одна секція призначена для робочого одягу (халат, робочий костюм і ін. спецодяг), друга секція – для особистого одягу.

Гардероб для верхнього одягу

Для кожного співробітника в кімнаті повинна бути встановлена окрема шафа для верхнього одягу, вуличного взуття і сумок.

Гардероб для верхнього одягу та Приміщення для одягання робочого одягу входять до складу санпропускника, що розміщується при вході в лабораторний корпус з "чистої" зони.

Питання:

1. *Розкажіть про основні вимоги, якими слід керуватися, плануючи влаштування лабораторії, що виконує мікробіологічну діагностику туберкульозу.*
2. *Перерахуйте приміщення спеціалізованої бактеріологічної лабораторії і вкажіть їх орієнтовний метраж.*
3. *Покажіть на схемі і розкажіть епідеміологічно безпечний рух досліджуваного матеріалу в лабораторії, що здійснює виділення культури (бактеріологічна лабораторія другого рівня).*
4. *Опишіть обладнання вентиляції в бактеріологічній лабораторії, що виконує мікробіологічну діагностику туберкульозу.*

3.3 Опис основного обладнання та приладів

Оснащення бактеріологічних лабораторій протитуберкульозної служби сучасним обладнанням є найважливішим елементом забезпечення якості і безпеки їх роботи. Нормативи оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів викладено у наказі МОЗ України від 16.07.2008 за № 388, зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 04.08.2008 року за № 719/15410 "Про затвердження Нормативів оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів".

Обладнання

Відповідно до сучасних правил роботи в бактеріологічних лабораторіях маніпуляції з інфекційним матеріалом, що містить збудник туберкульозу, і тим більше з виділеними культурами збудника, рекомендується проводити тільки в сертифікованих шафах біобезпеки 2-го класу, що зареєстровані в Україні. Умови роботи в таких боксах дозволяють практично повністю захистити персонал, що працює них від небезпеки інфікування туберкульозом.

Ефективність і безпека обробки досліджуваного матеріалу перед посівом на живильні середовища багато в чому залежать від центрифуг, що використовуються для підготовки досліджуваного матеріалу. Для забезпечення безпеки персоналу потрібно використовувати тільки центрифуги з антиаерозольним захистом! Ефективність посіву залежить від повноти осадження мікобактеріальних клітин, температури і часу центрифугування. Оптимальні умови забезпечують центрифуги з відносною силою центрифугування не менше 3000 g і охолодженням.

Кожна лабораторія згідно ДНАОП 0.00-4.26-96 "Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими

засобами індивідуального захисту" та наказу Держнаглядохоронпраці 29.10.96 № 170, зареєстрованим в Міністерстві юстиції України 18.11.96 за № 667/1692 повинна бути забезпечена достатньою кількістю спеціального робочого одягу та засобів індивідуального захисту, що забезпечують захист персоналу лабораторії від інфікування у разі аварії.

Для ефективного дотримання заходів по забезпеченню вимог біологічної безпеки рекомендується використовувати в лабораторії не тільки одноразові рукавички і маски-респіратори, але також і одноразові халати, шапочки і бахіли.

У Додатку 1 надані нормативи оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу всіх рівнів відповідно до наказу МОЗ України від 16.07.2008 за № 388, зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 4 серпня 2008 року за № 719/15410.

Лабораторний посуд, інструменти та витратні матеріали

Крім обладнання, для роботи лабораторії потрібна також наявність лабораторного посуду і інструментів, а також витратних матеріалів і реактивів, запас яких повинен періодично поповнюватися. У Додатку 1 (див. таблицю 3) представлений рекомендований список лабораторного посуду, інструментів і витратних матеріалів, необхідних для бактеріологічної лабораторії протитуберкульозного закладу. У мікробіологічній лабораторії протитуберкульозної служби рекомендується використовувати одноразовий пластиковий посуд. Використанню такого посуду надається перевага для забезпечення біологічної безпеки і полегшення праці.

Пластикові інструменти або посуд багаторазового використання (наприклад, штативи для пробірок, промивні бутлі, циліндри та ін.) повинні бути виготовлені з пластику, який витримує автоклавування.

Центрифужні пробірки, призначені для центрифугування діагностичного матеріалу, повинні бути виготовлені тільки з пластику, оскільки скляні пробірки не витримують необхідного режиму центрифугування і б'ються, внаслідок чого утворюються інфекційні аерозолі. Для того, щоб під час центрифугування уникнути утворення тріщин на пластикових центрифужних пробірках і підтікання діагностичного матеріалу, рекомендується використовувати пробірки, виготовлені з поліпропілену, який є надійнішим, стійкішим і якіснішим матеріалом в порівнянні з полістиролом.

Рекомендований об'єм центрифужних пробірок – 50,0 мл. Використання центрифужних пробірок, такого об'єму дозволяє проводити центрифугування всього об'єму проби діагностичного матеріалу, що поступає на дослідження, за один раз.

При закупівлі центрифужних пробірок слід вибирати такі, які сумісні з наявною центрифугою. Економічно купувати пробірки, упаковані по 25–50 штук в поліетиленові пакети (без пакувальних штативів одноразового використання, виготовлених з пінопласту). При цьому, для вказаних пробірок лабораторія повинна мати в своєму розпорядженні достатню кількість штативів багаторазового використання, що автоклавуються.

Основне обладнання

Шафа біологічної безпеки. Обов'язковим компонентом обладнання в лабораторії протитуберкульозної служби, що здійснює посіви, є добре налагоджена і правильно функціонуюча шафа біологічної безпеки (ШББ). Ці системи були спеціально розроблені для забезпечення комплексного захисту персоналу, навколишнього середовища і матеріалу при проведенні мікробіологічних досліджень.

ШББ забезпечені фільтрами тонкої фільтрації НЕРА, через які проходить повітря, яке поступає у робочу зону і видаляється з ШББ. НЕРА-фільтри, що використовуються в мікробіологічній лабораторії, утримують частинки розміром від 3 мкм. Це дозволяє вловити всі бактерії, спори і віруси з ефективністю до 99,97 %.

У мікробіологічній лабораторії протитуберкульозної служби України застосовуються біологічні шафи безпеки 2-го класу, які забезпечують захист не тільки персоналу і навколишнього середовища, а й досліджуваного матеріалу. Ламінарні шафи 2-го класу біобезпеки обов'язкові для використання в тих випадках, коли є підвищений ризик контамінації матеріалу, наприклад, при здійсненні посівів та постановці тестів на чутливість МБТ до медикаментозних препаратів і при роботі з рідкими живильними середовищами.

Шафа біологічної безпеки 2-го класу забезпечує захист персоналу, навколишнього середовища і матеріалу, що досліджується. Потік повітря що рухається з приміщення повз лаборанта всередину ШББ через фронтальний отвір, відносить від нього аерозоль, що утворився, і забезпечує захист лаборанта. Крім того, потік очищеного НЕРА-фільтрами повітря поступає в робочу зону. Повітря, що пройшло через НЕРА-фільтр, не містить мікроорганізмів, що і забезпечує захист матеріалу, з яким працює лаборант, і дозволяє уникнути проросту і перехресної контамінації зразків. Оскільки перед викидом із ШББ повітря пропускається через НЕРА-фільтри, воно може бути або повернено в лабораторію (тип А) або викидатися назовні (тип В).

УВАГА! Жодна шафа безпеки не дозволяє повністю очистити повітря, яке викидається, від інфекційних аерозольних часток! Тому вбудовування вивідного повітропроводу ШББ в автономну систему лабораторії дозволяє найповніше забезпечити безпеку персоналу лабораторії. Встановлення ШББ не виключає необхідності створення систем вентиляції у лабораторії!

Установка ШББ. Місце установки ШББ має бути віддалене від входу у лабораторію і розташовуватися в стороні від проходів (рух повітря від людей, що проходять повз, може порушувати потоки повітря). ШББ також не слід розташовувати поблизу відкритих вікон або обладнання, що створює рух повітря (центрифуги).

Викид повітря з шафи безпеки 1-го класу повинен здійснюватися назовні.

Необхідно забезпечити безперебійне електроживлення ШББ, при відключенні електроенергії в процесі роботи інфекційні аерозольні частинки не

осідатимуть на НЕРА-фільтрах, а накопичуватимуться в робочій зоні і у разі зміни напрямку потоку повітря буде створювати значну небезпеку для здоров'я працюючих.

Відключення електроживлення шафи безпеки в процесі проведення в ньому мікробіологічних робіт повинне розглядатися як аварійна ситуація!

Робота у ШББ. Оскільки при посіві зростає ризик утворення аерозолі, усі маніпуляції по проведенню посіву виконуються в ШББ. Проте ШББ не в змозі захистити лаборанта при розливі матеріалу і/або від наслідків безграмотного і безвідповідального ставлення до правил техніки безпеки і роботи у ШББ.

Правила роботи у ШББ.

- ШББ має бути здатною працювати 24-години і підтримувати необхідний повітряний баланс. У разі відключення світла або після заміни фільтра необхідно дати шафі попрацювати 15 хвилин перед початком роботи. Робочі поверхні слід протерти дезінфікуючим розчином у концентрації, що забезпечує загибель мікобактерій, а потім промити стерильною водою.

- Усі матеріали, що потрібні для посіву готуються заздалегідь. Під час роботи це зведе до мінімуму рухи рук за межами ШББ, оскільки це може порушити завісу стерильного повітря, що поступає від фільтру.

- Поміщати в ШББ можна тільки ті матеріали, які використовуються негайно, додаткові середовища і реактиви розташовують поза шафою. Матеріали і обладнання, поміщені всередину ШББ, можуть викликати небажанні зміни повітряного потоку і призвести до перехресної контамінації. Перед початком роботи перевірте інтенсивність потоку повітря у шафі безпеки.

- До роботи, після того, як внесли руки в ШББ, зробіть невелику паузу (60 секунд). За цей час ШББ витягне все забруднене повітря.

- Переконайтеся, що є вільний доступ повітря у ШББ (фронтальна частина не закрита пакувальними матеріалами, тощо).

- Виконуйте усі маніпуляції, принаймні, на відстані 10–15 см від фронтальної поверхні шафи.

- На робочу поверхню поміщають паперовий рушник. Це в подальшому спростить обробку і попередить розбризкування та утворення аерозолі у разі проливання рідин. Після роботи рушник згортають і автоклавують.

- Усі матеріали і обладнання, при роботі якого утворюється аерозоль (наприклад, вортекс), поміщають якнайдалі від фронтальної частини, але так, щоб ними зручно було користуватися.

- Розташуйте усі масивні предмети (контейнери, що автоклавуються, підноси з піпетками і колби) по одну сторону ШББ.

- Зорієнтуйте обладнання і матеріали в порядку, що не допускає перехресної контамінації, дотримуючи потік від "чистої" зони в "заразну".

- Використовуйте для піпеток, що використані, тільки горизонтальні лотки, які містять достатній об'єм дезінфікуючого розчину (5,0 % хлорамін або розчин іншого засобу, дієвий щодо мікобактерій).

- Уважно виконуйте правила виконання мікробіологічних методик, звертаючи особливу увагу на етапи з підвищеним ризиком (розлив,

розбризування матеріалу, утворення аерозолі). Це зведе до мінімуму вірогідність інфікування персоналу. Маніпуляції з інфікованими матеріалами повинні проводитися на відстані не меншого 12,0 см від зони посіву, це зведе до мінімуму ризик перехресної контамінації.

- Не залишайте пробірки і контейнери для мокротиння відкритими, закривайте їх якнайшвидше.

Після закінчення робіт обробіть робочі поверхні ШББ 70,0 % етиловим спиртом.

Кожного разу перед заміною фільтру, при ремонті і техобслуговуванні обов'язково дезінфікуйте ШББ.

Уникайте наступної практики. Під час роботи не рекомендується:

- викидати матеріали, що вимагають дезінфекції, за межі ШББ,
- розташовувати контейнер з використаними піпетками за межами ШББ або відразу напроти входу в нього. Подібна практика створює завихрення повітряного потоку, піддає ризику інфікування лаборанта і порушує стерильність матеріалу, з яким він працює.

Центрифуги у лабораторії протитуберкульозної служби є необхідним обладнанням для проведення досліджень. Використання центрифуги підвищує ефективність дослідження в порівнянні з методом прямого (без центрифугування) посіву мокротиння на живильні середовища.

Основні вимоги до центрифуги:

- забезпечення відносної сили центрифугування 3000 g (що дозволяє досягнути осадження 95,0 % бактерійних клітин);
- рефрижераторна (при центрифугуванні температура досліджуваного зразка може значно підвищуватися, а наявність охолодження перешкоджає загибелі клітин мікобактерій і, відповідно, зниженню висіваєності);
- антиаерозольна (дозволяє забезпечити безпечну роботу завдяки наявності кришок із затискачами, а також використанням пластикових центрифужних пробірок).

Для оснащення лабораторії рекомендується модель центрифуги, що має максимально можливу кількість гнізд для центрифугування пробірок об'ємом 50,0 мл. Якщо лабораторія виконує щодня в середньому близько 100 або більше досліджень, що включають процедуру центрифугування діагностичного матеріалу, рекомендується оснастити її двома центрифугами на 14–16 гнізд і більше, що дає можливість проводити технологічний процес в оптимальному режимі. В цьому випадку об'єми наявних центрифуг дозволять швидко і своєчасно обробити діагностичний матеріал, що надходить до лабораторії.

При виборі центрифуги необхідно звернути увагу на її комплектацію (кришки із затискачами для кожного стакану ротора, адаптери для пробірок, тощо).

Потребам бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби найкраще відповідає центрифуга з охолодженням, з кришкою і кутовим або

бакет-ротором, забезпеченим центрифужними стаканами, що закриваються. Її зручно встановлювати на міцному столі або підлозі.

При установці центрифуги необхідно передбачити достатній простір навколо неї, щоб забезпечити нормальний обмін повітря і знизити вірогідність її перегрівання. Центрифуга повинна бути встановлена на стійкій горизонтальній поверхні, подалі від вагів та інших чутливих приладів.

Для кутового ротора передбачається наявність індивідуальних центрифужних стаканів для кожного з гнізд ротора, окремо для кожної центрифужної пробірки.

Індивідуальні центрифужні стакани для кожного з гнізд кутового ротора; підходять для різного типу пробірок (у стакані є адаптер для конічних пробірок, пробірки з «спідничкою» вставляються в стакан без адаптера).

У бакет-роторі використовуються центрифужні стакани, кожний з яких призначений для розміщення в ньому декількох центрифужних пробірок.

Як правило, центрифужні стакани виготовлені з неіржавіючої сталі і забезпечені гумовими прокладками. Зазвичай, центрифужні стакани виготовляються і використовуються попарно, причому на кожному стакані вказана його вага. Центрифужні стакани, що закриваються, розташовуються у роторі попарно один навпроти одного. Доцільно наперед помітити кожну пару фарбою одного кольору для швидкого вибору пар. Пари центрифужних стаканів доцільно позначати і при використанні бакет-ротора.

Центрифужні стакани повинні мати адаптери для центрифужних пробірок.

Завдяки значно більшій, у порівнянні з центрифужними пробірками, масі стаканів допустимо центрифугування пробірок з незначною різницею у вазі ($\pm 5,0$ % від ваги/об'єму зразка, що центрифугується), яка не викличе сильної вібрації і/або пошкодження пробірок. При використанні бакет-ротора і прискорення 3000 g різниця у вазі стаканів не повинна перевищувати 4,0–5,0 г.

Кришка центрифуги повинна бути обладнана спеціальним замком, який попереджає випадкове відкривання кришки під час обертання ротора.

У багатьох інструкціях при описі процедури центрифугування наведені швидкості обертання ротора в обертах за хвилину (об./хв.). Проте, ця величина відображає тільки швидкість обертання даного ротору, але не характеризує інтенсивність осадження (седиментації) або "відносну силу центрифугування" (далі – ВСЦ). ВСЦ, створена ротором, що обертається, залежить від швидкості обертання ротора (об./хв.) і відстані від осі обертання до точки, де проводиться вимірювання цієї сили, тобто, при однаковій швидкості обертання ВСЦ різна для роторів різних розмірів і типів. ВСЦ можна збільшити як шляхом збільшення швидкості обертання ротору, так і збільшенням відстані від його осі до рідини, яка центрифугується. Для характеристики ВСЦ використовують величину прискорення g – наприклад, 3000 g .

Для розрахунку ВСЦ можна використовувати наступну формулу:

$$ВСЦ = 1,12R_{max} (\text{об./хв.: } 1000)^2,$$

де R_{max} – це радіус обертання, тобто відстані від осі обертання ротору до дна центрифужної пробірки в мм.

Швидкість обертання ротора, що необхідна для отримання певної ВСЦ, можна визначити за такою формулою:

$$\text{об./хв.} = 1000 \times \sqrt{\text{ВСЦ} : 1,12 R_{\max}}$$

Якщо величина ВСЦ буде недостатньою, багато мікобактерій після центрифугування залишаться у зависі надосадової рідини і будуть видалені разом з нею. Для отримання якнайкращого результату при виділенні культури мікобактерій необхідно добиватися осадження 95,0 % бактерійних клітин. Для цього потрібно проводити центрифугування з ВСЦ 3000 g.

В залежності від типу ротора і швидкості його обертання, температура повітря у центрифугу і, відповідно, температура досліджуваного зразка може підвищуватися на 4–18 °С. При цьому, температура зразка у кутовому роторі міняється незначно, проте, температура вмісту пробірки у центрифужних стаканах бакет-ротора може перевищувати 40 °С. Таке підвищення температури може призвести до загибелі клітин мікобактерій і зниження висіваємості. Тому рекомендується використовувати центрифуги з охолодженням.

Під впливом відцентрової сили скляні пробірки можуть руйнуватися.

При цьому, рідина, що міститься в пробірці, розбризкується і утворює аерозоль. Тому при обробці потенційно інфекційного матеріалу необхідно використовувати пластикові пробірки з кришками, що загвинчуються, або спеціальні центрифужні пробірки з боросилікатного скла.

Стакани центрифуги перед початком роботи повинні бути добре урівноважені.

Якщо цього не зробити, може виникнути сильна вібрація, що може зруйнувати ротор. Якщо досліджується одна проба, то с протилежного боку ротора треба помістити аналогічну пробірку, що має таку ж саму вагу. Найпростіше це зробити, якщо на центрифужних пробірках нанесено позначки, що вказують однакові об'єми рідини.

Увага! Ніколи не торкайтеся ротору, який продовжує обертатися, оскільки це не тільки може бути причиною травми, але й призвести до ресуспендування осаду через різку зупинку пробірки. Для попередження цього деякі моделі центрифуг облаштовані спеціальним гальмом, що забезпечує повільну зупинку ротора.

Робота з центрифугою. Виберіть пару центрифужних пробірок однакової довжини і діаметру. Помістіть матеріал, що буде центрифугуватися в одну з пробірок. В другу пробірку помістіть інший зразок.

Ніколи не центрифугуйте пробірки, що заповнені більше, ніж на 2/3 об'єму!

Помістіть пробірки у відповідні центрифужні стакани і урівноважте їх, додаючи у них воду.

Ніколи не урівноважуйте стакани додаванням води у пробірки із зразками!

Розмістіть центрифужні стакани у діаметральних положеннях ротора. Закрийте кришку і переконайтесь, що до запуску центрифуги спідометр показує нульове значення (багато моделей центрифуг обладнані системами, що блокують запуск, до завантаження центрифуги). Повільно встановіть потрібну швидкість.

Заходи застереження:

- Прослідкуйте, щоб гумові ущільнювачі були на місці, щоб пробірки не побилися.
- Акуратно урівноважте пробірки.
- Переконайтеся, що урівноважені стакани розташовані один навпроти одного.
- Ніколи не намагайтесь зупинити або запустити центрифугу руками.
- Суворо дотримуйтесь рекомендацій виробника при встановленні швидкості.
- Після закінчення центрифугування обережно перенесіть закриті центрифужні стакани (а не пробірки!) у ШББ. Уникайте різкого струшування стаканів, адже це може призвести до ресуспендування осаду;
- Дайте стаканам постояти декілька хвилин, щоб аерозоль, яка утворилася, могла осісти. Відкривайте стакани тільки у включеній ШББ.

Зручніше використовувати центрифужні стакани із прозорими кришками, які дозволяють побачити зруйновані пробірки з інфекційним матеріалом до їх відкривання і підготуватися до здійснення аварійних заходів.

Після закінчення роботи поверхня центрифуги, ротор, центрифужні стакани і адаптери повинні бути оброблені 70,0 % спиртом.

Термостат

Інкубацію посівів проводять при температурі 36–37 °С протягом 10 тижнів у термостатах або спеціальній термостатній (термальній) кімнаті.

Пам'ятайте, що в термостатах з маленьким об'ємом при відкриванні дверцят відбуваються різкі коливання температури повітря. Намагайтесь забезпечити правильну циркуляцію повітря усередині термостата, не перевантажуючи його і використовуючи решітчасті полиці. Підтримуйте постійну температуру, уникаючи непотрібного відкривання термостата.

У лабораторіях з великими об'ємами культуральних досліджень доцільно використовувати термостатну (термальну) кімнату. *Усе облаштування термостатної кімнати повинно бути пожежобезпечним, а сама кімната відповідати нормам протипожежної безпеки.* Недоцільно використовувати дерев'яні полиці і перегородки. (При високій вологості повітря на них можуть рости плісняві гриби). Краще використовувати металеві або пластикові полиці, які можуть бути виготовлені безпосередньо на місці. Полиці не повинні бути фіксовані, щоб їх можна було легко видаляти і мити. Між полицями і стінами приміщення слід залишити проміжки (щілини) для забезпечення циркуляції повітря.

Термостатну кімнату необхідно дезінфікувати не рідше одного разу на місяць.

Автоматичний згортувач

При підготовці яєчних середовищ, необхідних для виділення збудників туберкульозу, доводиться використовувати обладнання, що дозволяє чітко

дозувати кількість тепла для забезпечення коагуляції білка. Паронагрівачі не придатні для цих цілей, тому що нагрівають живильне середовище занадто швидко і температура може бути надмірно високою.

Автоматичний згортувач (АЗ) для приготування яєчних середовищ повинен забезпечувати нагрівання до температури 80–85 °С і підтримання такої температури впродовж 45 хвилин. Сучасні АЗ забезпечують автоматичне регулювання температури і оснащені великим внутрішнім вентилятором. Внутрішні штативи (касети), в яких розміщуються пробірки у нахиленому положенні, повинні бути виготовлені з алюмінієвих пластин або з дроту, щоб не перешкоджати циркуляції гарячого повітря. АЗ повинен мати скляні дверці, що щільно закриваються і забезпечують підтримку усередині необхідної температури, а також термометр всередині для можливості контролювати температуру згортання середовища. Рекомендується наперед включати АЗ, щоб до моменту завантаження в ньому вже була досягнута необхідна температура.

Автоклав

Автоклав це обладнання підвищеної небезпеки. До роботи з лабораторними автоклавами допускаються особи, які пройшли спеціальне навчання і мають офіційний дозвіл на роботу з ними!

Мікобактерії туберкульозу швидше гинуть в умовах високої температури і вологості (насичена пара), ніж при використанні сухого жару. Пара вбиває мікобактерії туберкульозу, денатуруючи їх білки. Істотне значення для ефективності стерилізації паром має повітря, оскільки його присутність змінює взаємовідношення між тиском і температурою.

Наприклад, температура насиченої пари при 1 атм. становить 121 °С, але тільки в тому випадку, якщо заздалегідь повітря було видалене з автоклава. Якщо ж буде видалена тільки половина повітря, температура паро-повітряної суміші складе всього лише 112 °С. Крім того, наявність повітря між предметами, що поміщені в автоклав, перешкоджатиме проникненню пари в ці простори.

Все повітря, що знаходиться в автоклаві, до початку процесу стерилізації паром має бути видалене. Тому матеріал, що підлягає стерилізації, не слід дуже щільно упаковувати. Контамінований матеріал (наприклад, пробірки або відпрацьовані чашки Петрі) повинен бути поміщений в контейнер із щільним дном глибиною не більше 20 см. Між контейнерами слід залишити якомога більше вільного місця і *ні в якому разі не можна* закривати флакони кришками.

Автоклави підлягають обов'язковому щорічному технічному огляду представниками уповноважених інженерних організацій, манометри автоклавів – щорічній повірці в уповноважених органах технагляду. До роботи з автоклавами допускаються співробітники, що пройшли курс навчання по обслуговуванню судин під тиском і мають відповідне посвідчення.

Співробітники, які обслуговують автоклави, повинні проходити курси підвищення кваліфікації по обслуговуванню судин під тиском кожний рік з отриманням посвідчення про це.

Автоклави з заміщенням повітря парою зазвичай мають горизонтальне розташування і прямокутну форму, завдяки чому спрощується процес завантаження і вивантаження. Кришка автоклава повинна бути обладнана запобіжним пристроєм, що не допускає її відкривання при наявності в камері надлишкового тиску.

Ваги електронні

Ваги призначені для точного визначення ваги речовини. Ваги вимагають обережного поводження.

У лабораторній практиці застосовуються ваги різного ступеня точності зважування і різні за діапазоном наважок, що зважуються. Для бактеріологічних лабораторій, які проводять дослідження тільки методом посіву, найбільш придатні ваги з точністю зважування не менше 0,01 г і можливістю зважування не менше 100 г. Для лабораторій, які проводять дослідження чутливості до протитуберкульозних препаратів і видову ідентифікацію мікобактерій (бактеріологічні лабораторії II і III рівнів), додатково потрібні ваги, що забезпечують аналітичну точність зважування (не менше 0,0001 г) з можливістю зважити не менше 1 г.

Ваги повинні бути встановлені на стійкому столі із строго горизонтальною поверхнею, далеко від можливих джерел вібрації і руху повітря. Чим вище точність приладу, тим суворіші вимоги до його захисту від зовнішніх дій, особливо в процесі зважування. У найбільш поширених в даний час одночашечних електронних вагах додатково застосовується екран, що захищає речовину, яку зважують, від потоків повітря.

Ваги повинні проходити щорічну перевірку в уповноважених органах. Перед початком зважування необхідно переконатися в правильності роботи вагів (провести їх калібрування): для цього необхідно зважити гирю із набору повірених, масою, що відповідає масі наважок, які зважуються.

При зважуванні речовин дотримуйтесь наступних правил:

- зважуйте наважку з урахуванням чутливості вагів;
- проводьте зважування в спеціальному контейнері або на папері для зважування;
- врахуйте вагу контейнера (паперу для зважування) до того, як ви помістите на нього речовину, яку необхідно зважити;
- забезпечте найбільш повне перенесення зваженої речовини в судину для її подальшого розчинення;
- для наважок менше 10 міліграмів зважте контейнер для зважування (папір) після того, як ви перенесли зважену речовину, і врахуйте залишок речовини в контейнері (на папері);
- для кожної індивідуальної речовини використовуйте свій контейнер (папір) для зважування і шпатель для забору речовини.
- ***Не допускайте забруднення реактивів!***
- не допускайте перенесення речовини з контейнера (паперу) для зважування назад в банку з речовиною. У разі невеликого надлишку

речовини кращим виходом є перерахунок об'єму розчину, що готується.

Оберігайте ваги і важки від пилу, забруднень і вологи! Після роботи завжди закривайте ваги чохлом!

Аквадистилятор

Аквадистилятор призначений для виробництва дистильованої води шляхом теплової перегонки водопровідної води. Під час роботи аквадистилятор повинен бути забезпечений безперервною подачею водопровідної води, зливом води в каналізацію і електричним струмом відповідно до вимог, викладених в технічному паспорті приладу.

Потужність аквадистилятора (об'єм дистильованої води, що він виробляє л/година) повинна відповідати потребам лабораторії (обсягу досліджень, що проводяться).

Водяна баня

Вміст пробірки, поміщеної у водяну баню, зігрівається до необхідної температури значно швидше, ніж в термостаті. Тому водяна баня може бути дуже корисною в тих випадках, коли потрібна короточасна інкубація при підвищеній температурі, наприклад, при постановці деяких біохімічних тестів.

Сучасні водяні бані обладнані пристосуваннями для автоматичного перемішування рідини, а в деяких банях термометр і мішалка об'єднані в один блок, який легко видаляється для сервісного обслуговування.

Термоізоляція робочої ванни попереджає надмірні втрати тепла через стінки. Водяна баня повинна бути забезпечена кришкою, щоб попередити втрати тепла і зайве випаровування води. Кришка повинна розташовуватися похило, щоб краплі конденсату не падали на вміст бані. Для попередження утворення накипу на нагрівальних елементах і стінках водяної бані слід використовувати тільки дистильовану воду.

Штативи та кошики

У лабораторії необхідно мати два типи штативів:

горизонтальний – для спеціального укладання пробірок безпосередньо при засіві матеріалу в пробірки з щільним поживним середовищем; нахил штатива повинен бути відрегульований так, щоб не змочувати пробку посівною суспензією і одночасно забезпечувати горизонтальне положення поверхні косяка живильного середовища;

вертикальний – для тривалої інкубації пробірок з матеріалом або культурами.

Доцільніше користуватися штативами для пробірок і флаконів, що виготовлені із пластика, стійкого до автоклавування. Крім того, це сприяє зменшенню бою скляного посуду, що нерідко відбувається при використанні металевих штативів.

Традиційні дротяні кошики небезпечні при роботі з пробірками. У них пробірки нерідко б'ються; а розлитий матеріал витікає з таких кошиків. При роботі з культурами значно безпечніше використовувати пластикові коробки різних розмірів.

Питання:

1. *Перерахуйте основне обладнання, яким повинна бути оснащена мікробіологічна лабораторія протитуберкульозної установи.*
2. *У чому полягає принципова відмінність шаф біологічної безпеки 1-го та 2-го класів? Які шафи рекомендується використовувати в лабораторії для проведення різних видів досліджень?*
3. *Які вимоги і чому пред'являються до центрифуг, що використовуються для отримання осаду діагностичного матеріалу?*
4. *Яка чутливість вагів, які повинні використовуватися при приготуванні живильних середовищ для культивування мікроорганізмів?*
5. *Яка чутливість вагів, що використовуються для зважування наважок протитуберкульозних препаратів при приготуванні розчинів медикаментозних препаратів?*
6. *Чи можна зважувати наважки 500 міліграм на вагах аналітичного класу точності?*

4 Вимоги до забезпечення біологічної безпеки та безпеки праці в бактеріологічній лабораторії протитуберкульозної служби

Маніпуляції в лабораторії, в якій проводяться дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, можуть призводити до небезпечних для здоров'я персоналу наслідків. У зв'язку з цим, крім заходів безпеки, що запобігають ризику вражаючої дії фізичних і хімічних чинників, в лабораторіях, де проводять дослідження патогенних біологічних агентів (ПБА – патологічний матеріал біологічного походження, що імовірно містить інфекційні агенти), підозрілих на вміст мікобактерій туберкульозного комплексу, повинні бути розроблені і застосовуватися заходи, спрямовані на мінімізацію ризику внутрішньолaboratorного зараження персоналу.

За даними Центру по контролю за захворюваністю США, захворюваність на туберкульоз серед персоналу лабораторій, що працюють з культурами мікобактерій туберкульозу, в 3–5 разів вище, ніж у співробітників лабораторій, де не проводяться маніпуляції з цими бактерійними культурами. Потенційна загроза заразитися мультирезистентним штамом туберкульозу посилює існуючу проблему і висуває завдання щодо дотримання заходів безпеки в лабораторії як найбільш важливе.

4.1 Шляхи розповсюдження туберкульозної інфекції

Збудник туберкульозу належить до III групи патогенності (ДСП 9.9.5.035 99 "Безпека роботи з мікроорганізмами I–II груп патогенності" додаток 5.1 Класифікація патогенних для людини мікроорганізмів).

В лабораторних умовах МБТ можуть потрапляти в організм різними шляхами – аерозольним, ентеральним, через пошкоджену шкіру, слизові оболонки, тобто так, як і у звичайному житті.

Аерозольний механізм передачі туберкульозної інфекції

Найбільш поширеним механізмом передачі туберкульозної інфекції є аерозольний: зараження туберкульозом відбувається при вдиханні аерозольних частинок, внаслідок чого вони проникають в дрібні бронхи і адсорбуються на бронхіальних стінках. Дози бактерій, що призводять до інфікування людини туберкульозом, малі – від 1 до 10 бактерій, які можуть міститися в 1–3 аерозольних частинках.

При виконанні багатьох мікробіологічних методик утворюються аерозолі (при переливанні рідин, при ударі краплі рідини об поверхню). Крупні аерозольні частинки розміром більше 5 мкм швидко осідають і забруднюють шкіру, одяг і поверхні обладнання, проте найбільш небезпечні крихітні частинки розміром менше 5 мкм, що містять життєздатні МБТ, – краплинні ядра. Краплинні ядра можуть носитися в повітрі невизначено тривалий час і при вдиханні проникати в альвеоли, де осідати і викликати інфекцію.

Ризик внутрішньолaboratorного зараження залежить від типу роботи, що виконується в лабораторії. Ступінь ризику визначається концентрацією збудника в потенційно виникаючих аерозолях і частотою зустрічей з інфікованими матеріалами, що надходять на дослідження. Очевидно, що ступінь небезпеки лабораторних маніпуляцій з ПБА залежить не тільки від їх природи і вмісту в них інфекційного агента, але і від фактичної наявності та концентрації інфекційного агенту в зразках. Наприклад, ризик внутрішньолaboratorного зараження в лабораторіях, що готують мазки безпосередньо з мокротиння, значно нижче, ніж в лабораторіях, що готують мазки з концентрованого матеріалу або проводять його посів. Ризик зараження значно менше в лабораторіях мікроскопії з частотою виявлення мазків, що містять КСБ, менше 1,0 % в порівнянні з тими, в яких позитивні мазки становлять понад 10,0 % від усіх досліджених.

Найбільший ризик зараження (і, відповідно, найбільш жорсткі заходи безпеки і захисту персоналу) повинні застосовуватися в лабораторіях, що проводять дослідження культури збудника, наприклад, при дослідженнях його чутливості до протитуберкульозних препаратів та/або видової належності.

Найбільш ризиковані маніпуляції з культурою збудника, наприклад, при приготуванні бактерійної суспензії для дослідження чутливості до медикаментозних препаратів або видової ідентифікації виділеного штаму. Концентрація збудника в потенційно виникаючих аерозолях при приготуванні мазка з діагностичного матеріалу істотно нижче. При концентрації матеріалу методом центрифугування небезпека зараження істотно зростає.

Ризик аерозольного зараження залежить від частоти зустрічей із зразками, інфікованими мікобактеріями туберкульозу: він вищий у лабораторіях, де частка діагностичних матеріалів, що містять мікобактерії туберкульозного

комплексу, висока і досягає 10,0 % і більше порівняно з лабораторіями, де частка позитивних зразків не перевищує 3,0 %.

Аерозоль утворюється в процесі наступних маніпуляцій:

- При зборі мокротиння від хворих, що кашляють.
- При відкриванні щільно закритих контейнерів з мокротинням, якщо мокротиння затекло між кришкою і стінкою контейнера.
- При додаванні розчинів для деконтамінації до інфікованого діагностичного матеріалу. Їх слід додавати обережно і ніколи не змішувати, поки контейнер або пробірка відкриті. Після закінчення процедури обережно зливають надосадову рідину в контейнер з дезінфікуючим розчином через лійку.
- Струшування рідких матеріалів або бактерійних суспензій мікобактерій туберкульозного комплексу.
- Переливання інфікованих рідин. При переливанні інфікованого матеріалу в дезінфектант може відбуватися розбризкування і утворення аерозолі. Використання лійки з опущеним в рідину кінцем дозволить уникнути цього.
- Робота з бактеріологічною петлею. Працюйте з петлею, уникаючи енергійних і різких рухів. Петля з культурою або залишками діагностичного матеріалу, в першу чергу, очищається у посудині з піском і 70,0 % спиртом. Потім в полум'ї спиртівки обвуглюють часточки, що залишилися.
- Робота з піпеткою (у тому числі і автоматичною). Ніколи не набирайте рідину в піпетку ротом. При цьому існує небезпека не тільки заковтування інфікованої рідини, але і вдихання аерозолі, що утворився при піпетуванні. Не можна видувати рідину з піпетки, дайте їй стекти самопливом, інакше остання крапля при відриві створить бульбашки, які лопаються і створюють аерозоль (особливо часто це відбувається при використанні пастерівських піпеток).
- Центрифугування. Рекомендований тип центрифуги в лабораторії з діагностики туберкульозу – підлогова (або настільна) модель з кришкою і фіксованим кутом ротора, із стаканами з кришками, що перешкоджають розповсюдженню аерозолі. Доцільніше використовувати модель, у якій неможливе відкривання кришки до зупинки ротора. Пробірки слід закривати і врівноважувати, щоб уникнути їх руйнування при центрифугуванні. Якщо під час центрифугування пробірка розіб'ється або розіллється, то утвориться хмара інфекційного аерозолі. Закриті центрифужні стакани попередять його розповсюдження.

Більшість випадків інфікування в лабораторії, що виконує дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, відбуваються через недооцінку небезпеки утворення інфекційних аерозолів, що містять МБТ.

З метою зменшення небезпеки інфікування туберкульозом необхідно: мінімізувати утворення і розсіювання аерозолі; захистити лабораторних працівників від вдихання інфекційних аерозольних часток.

Аліментарне зараження

Інфекційний матеріал може бути проковтнутий при засмоктуванні інфікованої рідини піпеткою або занесений у рот брудними руками. Руки

можна забруднити не тільки в боксі, але і об зовнішню поверхню контейнера для мокротиння. Рекомендується працювати з контейнерами в рукавичках, проводити обробку контейнерів зовні, часто мити і дезінфікувати руки із застосуванням шкірних антисептиків.

Контактне зараження

Пацієнти з туберкульозом все частіше виявляються інфіковані ВІЛ і діагностичні матеріали від них – такі, як мокрота з кров'ю, кров і спинномозкова рідина, – можуть бути безпосереднім фактором передачі вірусу. У зв'язку з цим, необхідно також звернути увагу на мінімізацію не тільки можливого інфікування співробітників лабораторії збудником туберкульозу, але і на запобігання можливого інфікування ВІЛ. Контактне зараження може відбутися при уколі голкою, забрудненій МБТ або кров'ю ВІЛ-інфікованого пацієнта, тому ніколи не використовуйте шприци з голками замість піпеток. Можливі також порізи об відбиті краї скляного посуду або піпеток. *Слід уникати використання битого посуду. Найбільш небезпечні скляні пастерівські піпетки, тому, за можливості, їх слід замінювати пластиковими піпетками.*

Усі процедури з інфікованим матеріалом в мікробіологічній лабораторії слід проводити тільки в гумових рукавичках!

4.2 Заходи, щодо попередження ризику внутрішньолaboratorного зараження

У кожній лабораторії повинні бути розроблені правила забезпечення безпечної роботи, що враховують існуючі в даній лабораторії загрози здоров'ю співробітників і можливості забруднення навколишнього середовища.

Правила по забезпеченню біологічної безпеки в лабораторії повинні включати:

■ **адміністративні заходи** (що запобігають розповсюдженню інфекційних аерозолів із забруднених зон в неінфіковані приміщення лабораторії і лікувальної установи в цілому);

■ **інженерні (проектні і технічні) заходи** (спрямовані на зниження концентрації інфекційних аерозолів в повітрі – примусова вентиляція, використання ефективних пристроїв знезараження повітря шляхом фільтрації, опромінювання, тощо);

■ **персональні заходи** (заходи захисту органів дихання персоналу).

Адміністративні заходи

Організація безпечної роботи в клініко-діагностичній або бактеріологічній лабораторії повинна починатися **на адміністративному рівні**.

Кожна установа повинна мати наказ про розподіл обов'язків і відповідальності адміністрації та працівників за заходи з техніки безпеки, охорони праці і дотримання протиепідемічного режиму із зазначенням прізвищ і посад відповідальних осіб.

Обов'язки та права адміністрації і працівників визначені чинним законодавством і нормативно-правовими актами України.

Що стосується безпосередньо лабораторії, адміністративні заходи включають:

- розділення лабораторії на інфіковану зону, де відбувається рух і обробка заразного матеріалу, та неінфіковану зону з окремим входом в кожну;

- створення умов для забезпечення поточності руху матеріалу, що надходить на дослідження (в процесі прийому, обробки, дослідження та знезараження);

- відповідне призначення приміщень лабораторій; дотримання санітарно-гігієнічних норм і вибір адекватних дезінфікуючих засобів, з числа зареєстрованих в Україні і дозволених для дезінфекції об'єктів, контамінованих мікобактеріями туберкульозу;

- освітню підготовку персоналу, яка включає і питання щодо особливостей трансмісії мікобактерій туберкульозу;

- дотримання правил збору матеріалу (в першу чергу мокротиння);

- вибір методів, що скорочують час роботи із заразним матеріалом і лабораторних маніпуляцій, що підвищують безпеку.

Обов'язком керівника лабораторії є:

- розробити спільно із фахівцями служби з охорони праці закладу, в складі якого функціонує лабораторія, правила техніки безпеки з урахуванням існуючих небезпек і ризиків конкретної лабораторії;

- забезпечити якісне навчання персоналу методам безпечної роботи;

- інформувати персонал про особливо небезпечні методики, що потребують спеціальних заходів;

- інформувати персонал про зростаючий ризик ВІЛ-інфікування;

- організувати забезпечення персоналу адекватним захистом (інженерним обладнанням, індивідуальними засобами захисту і спецодягом);

- навчити персонал діяти при виникненні аварії або інциденту, що може призвести до внутрішньолaboratorного зараження;

- контролювати правильність виконання процедур персоналом, дотримання поточності досліджень і правил по забезпеченню безпеки;

- організувати регулярне проходження медоглядів персоналом.

Співробітник лабораторії відповідає:

- за дотримання встановлених в лабораторії правил безпечної роботи;

- ретельне проведення дослідження відповідно до методик що гарантує власну біологічну безпеку і безпеку інших співробітників лабораторії;

- правильне використання обладнання, що забезпечує біобезпеку;

- використання засобів індивідуального захисту;

- своєчасне інформування керівництва лабораторії про аварії та інциденти, що виникли, і можуть призвести до інфікування персоналу і навколишнього середовища.

Інженерні заходи

У міру зростання складності, інженерні заходи умовно можна розділити на наступні групи:

- організація примусової вентиляції повітря в приміщеннях і на робочих місцях (загальна і локальна вентиляція), що виключає попадання інфекційного аерозолю в коридори і інші суміжні приміщення;

- видалення або інактивація інфекційного аерозолю, що знаходиться в повітрі приміщень, з використанням технічних засобів, що дозволяють проводити знезараження (фільтрація повітря, його опромінювання, інша інактивація мікобактерій туберкульозу, що приводить до їх руйнування і та ін.);

- знезараження поверхонь в лабораторії (опромінювання, інші методи ефективної інактивації мікобактерій туберкульозу).

Деякі з вказаних заходів детально описані в розділі "Влаштування вентиляції. Загальні положення".

Ультрафіолетові (УФ) опромінювачі

При установці УФ-опромінювачів необхідно бути впевненим, що вони мають УФ-лампи із спектром, що забезпечує знезаражувальний ефект відносно мікобактерій туберкульозу. УФ установки виготовляються у вигляді відкритих бактерицидних опромінювачів, екранованих опромінювачів, а також закритих опромінювачів з примусовим рухом повітря. Для протитуберкульозних заходів допускається використання тільки тих УФ-опромінювачів, на які є документи, що підтверджують їхню ефективність відносно мікобактерій туберкульозу.

Як правило, бактерицидний ефект УФ-опромінювання повітря залежить від інтенсивності його обміну в приміщенні. Додаткове використання вентиляторів в закритих опромінюючих системах може подвоїти спостережуваний бактерицидний ефект, проте великі швидкості перемішування зменшують час дії УФ-опромінювання на одиницю об'єму повітря, що знижує ефективність приладу. Додаткова умова успішного застосування екранованих УФ-опромінювачів – наявність великого об'єму кубатури приміщення і їх тривала робота.

При опромінюванні поверхонь, які безпосередньо використовуються для роботи із заразним матеріалом, необхідно пам'ятати, що ефективність прямого опромінювання поверхні зворотно пропорційна квадрату відстані до неї. У зв'язку з цим, необхідно правильно користуватися розрахунками, що визначають знезаражувальний ефект енергії опромінювання на одиницю опромінюваної поверхні.

Слід також враховувати, що тільки опромінювачі з абсолютно чистою, вільною від пилу поверхнею здатні ефективно знезаражувати повітря і поверхні приміщення. З цієї причини очищення бактерицидних опромінювачів слід проводити марлевым тампоном, змоченим 96° етиловим спиртом.

Вологість приміщень є критичним параметром при використанні УФ-опромінювачів, а також знезаражувальних і фільтруючих приладів, що діють на основі електростатичних взаємодій (НЕРА-фільтри) або інших електромагнітних принципів. УФ-опромінювання найефективніше при

загальній вологості повітря 60,0–65,0 %. Збільшення вологості повітря до 95,0 % робить дезінфекцію за допомогою опромінювання неефективною. Це справедливо також відносно електростатичних фільтрів і приладів на основі електромагнітних взаємодій. Тому вологе гігієнічне прибирання приміщень не слід суміщати з різного роду опромінювальною або іншою електромагнітною обробкою повітря приміщень.

Персональний захист органів дихання

Ці заходи є обов'язковими для захисту обслуговуючого персоналу. Проте без відповідних адміністративних та інженерних заходів респіратори не забезпечують надійний захист медперсоналу від інфекції.

Захисні персональні маски (марлеві або паперові хірургічні) запобігають поширенню мікроорганізмів, захоплюючи великі рідкі частки біля рота чи носа, але не забезпечують захист людини в масці від вдихання підсохлих крапельних ядер. У зв'язку з цим рекомендується, щоб такі маски використовували хворі-бактеріовиділювачі у разі перебування їх межами лікарняних палат або ізоляторів.

Респіратори

Респіратори – це спеціальні види масок, які мають здатність затримувати аерозольні частинки розміром понад 1 мкм і щільно прилягають до обличчя, запобігаючи боковому підсмоктуванню повітря. Медичному персоналу, що контактує з інфекційним матеріалом, рекомендується використовувати респіратори, що забезпечують 95,0 % затримки частинок діаметром 3 мкм і більше. Наприклад, маски 9332 (ЗМ, США) або № 95, № 99 (США) або аналогічні.

Виготовлені промисловим способом захисні маски (респіратори № 95 і № 99, сертифіковані Національним інститутом профбезпеки і охорони здоров'я (США); № 9332, (ЗМ, США) здатні затримувати більше 95,0 % частинок діаметром від 3 мкм і використовуються при виконанні всіх маніпуляцій із забрудненим матеріалом і культурами. Ефективність подібних масок-респіраторів знижується при зволоженні і забрудненні, тому їх рекомендується використовувати одноразово, в крайньому випадку – зберігати загорнутими в чисту тканину, а не в пластикових пакетах, що утримують вологу, оскільки при зберіганні маски-респіратори повинні бути сухими і не мати складок від перегинів. Час ефективної роботи невідновних респіраторів багато в чому визначається ступенем забрудненості і вологості повітря і, зазвичай, становить не більше 50 годин. Маски-респіратори не повинні використовуватися довше за термін, вказаний в інструкції про застосування.

Згадані маски-респіратори не підлягають знезараженню теплом, дезінфікуючими розчинами, спиртом або іншими розчинниками, ультрафіолетом або іншим іонізуючим або радикал-утворюючим випромінюванням. Їх забороняється обробляти термічно, поміщати в зоні працюючого бактерицидного опромінювача, згинати для носіння в робочому одязі або зберігання, передавати в користування іншим особам.

Зручнішим є використання спеціальних респіраторів із змінним фільтром.

Згідно методичних рекомендацій "Організація, проведення епідеміологічного нагляду та дезінфекційних заходів у протитуберкульозних закладах і вогнищах туберкульозу", затверджених наказом МОЗ України від 21.05.2007 № 250 персонал протитуберкульозного закладу, в тому числі персонал діагностичних лабораторій при виконанні будь-яких робіт з інфікованими та потенційно інфікованими матеріалами та об'єктами, при виконанні робіт з прибирання та дезінфекції приміщень для захисту органів дихання повинні використовувати маски (півмаски, респіратори), які забезпечують рівень захисту від аерозольних часток не менше Р2 у відповідності до ДСТУ EN № 149:2003 "Півмаски фільтрувальні для захисту від аерозолів. Вимоги, випробування, маркування" (EN 149:2001, IDT).

Ніяке найдороще і найсучасніше обладнання не замінить дотримання заходів безпеки!

Дотримання гігієни та заходів безпеки є невід'ємним обов'язком кожного працівника лабораторії.

Лабораторна гігієна

У лабораторії, що виконує мікробіологічні дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, необхідно дотримуватися наступних вимог лабораторної гігієни.

- Вхід до лабораторії дозволяється тільки працівникам лабораторії.
- *Входити стороннім особам в лабораторію категорично заборонено!*
- В лабораторних приміщеннях повинно бути чисто, заборонено присутність будь-яких об'єктів, що не мають відношення до роботи.
- Всі поверхні в лабораторії і лабораторне обладнання повинні розглядатися як потенційно інфіковані і підлягають постійній дезінфекції з використанням відповідних засобів.
- Підлогу в лабораторних приміщеннях не слід натирати або підмітати. З метою запобігання утворення пилу в лабораторії слід регулярно проводити тільки вологе прибирання.
- Обов'язкове проведення вологого прибирання приміщення кожного дня з використанням дезінфекційних засобів в концентраціях і режимах, що впливають на мікобактерії туберкульозу.
- Дезінфекція повітря і поверхонь у приміщеннях за допомогою інженерних пристроїв (на основі електромагнітних, електростатичних фільтрів, УФ опромінювання, тощо) повинні проводитися після висушування приміщень.
- Чищення, сервісне обслуговування і перевірку обладнання для забезпечення безпеки цих операцій слід проводити тільки у присутності технічного спеціаліста.
- Категорично забороняється використання піпеток і наклеювання етикеток за допомогою рота.
- Рекомендується використовувати хірургічні або сенсорні водопровідні крани.

• Руки слід мити спеціальним бактерицидним милом зразу після роботи з потенційно інфікованим лабораторним посудом, після всіх мікробіологічних процедур, зняття захисного одягу, а також перед тим як покинути лабораторне приміщення. Для витирання рук після миття, слід користуватися одноразовими паперовими рушниками.

Забороняється користуватися "повітряними рушниками"!

- У робочих приміщеннях лабораторії заборонено:
 - приймати їжу, пити, палити, користуватися косметичними засобам;
 - зберігати будь-які речовини невідомого походження;
 - куштувати на смак і вдихати невідомі речовини;
 - проводити інші види робіт та вирощувати квіти у вазонах;
 - працювати без спеціального або санітарного одягу, спецвзуття та засобів індивідуального захисту;
 - сушити будь-що на опалюваних приладах;
 - захищувати проходи, коридори, підходи до засобів пожежогасіння.

4.3 Методи знезараження об'єктів

У зв'язку з широким поширенням збудника туберкульозу з множинною стійкістю до медикаментозних препаратів, збільшенням частоти випадків захворювань, викликаних мікобактеріями, що не належать до *M. tuberculosis complex* і характеризуються високою природною резистентністю, найважливішим елементом комплексу неспецифічних протиепідемічних заходів є ефективне знезараження різних об'єктів з метою розриву шляхів передачі збудника інфекції від джерела інфекції до сприйнятливої макроорганізми.

До основних методів надійного знезараження об'єктів, контамінованих мікобактеріями, відносяться:

- *хімічні методи* (застосування хімічних препаратів – дезінфікуючих засобів, що мають туберкулоцидну дію);
- *фізичні методи* (кип'ятіння, автоклавування, спалювання).

Хімічні методи

Нині для дезінфекції в лікувально-профілактичних закладах, пропонується велика кількість зареєстрованих дезінфікуючих препаратів (близько 500 найменувань). Ці засоби розрізняються за:

- складом діючих речовин (альдегіди, хлор активні сполуки та ін.);
- механізмом дії на мікробну клітину;
- мірою антимікробної активності і безпеки для персоналу (деякі засоби необхідно застосовувати з використанням засобів індивідуального захисту);
- призначенням (дезінфекція поверхонь, виділень хворого, повітря, медичних виробів – далі МВ тощо).

Для того, щоб з цього різноманіття обґрунтовано вибрати ефективний і безпечний дезінфекційний засіб, необхідно керуватися наступними критеріями:

- характеристика об'єкту знезараження, як фактора передачі інфекції;

■ характеристика дезінфікуючого засобу:

- за ефективністю відносно мікобактерій;
- за дією на конструкційні матеріали об'єкту, що підлягає знезараженню;
- за небезпекою для персоналу і пацієнтів в процесі обробки;
- за економічними витратами при його використанні.

Характеристика хімічних сполук (діючих речовин – ДР), що застосовуються у складі сучасних дезінфікуючих засобів, надана в таблиці 1.

У разі розробки на основі зазначених у таблиці сполук композиційних дезінфікуючих препаратів (поєднання декількох ДР, функціональних домішок) більшість недоліків усуваються, що дозволяє значно розширити можливу сферу їх застосування.

Для потреб лабораторії повинен зберігатися, як мінімум, піврічний запас дезінфікуючих засобів з різних хімічних груп і різного призначення. Щоб уникнути розвитку стійкості мікобактерій до дезінфікуючих засобів необхідна їх зміна (ротація) через 3–6 місяців використання, або одночасно слід застосовувати кілька дезінфікуючих засобів з різним механізмом дії на мікробні клітини.

Дезінфікуючі засоби застосовують суворо у відповідності з інструкцією або методичними вказівками щодо їх застосування, затвердженими в установленому порядку.

Найбільш перспективними для фтизіатричної практики є композиційні препарати, що включають третинні аміни, кисневмісні і хлорактивні сполуки, надкислоти і альдегіди.

Фізичні методи

Оскільки ці методи більш надійні і безпечні, їм віддають перевагу при знезараженні об'єктів в мікробіологічних лабораторіях. Найчастіше застосовують кип'ятіння, паровий метод (в паровому стерилізаторі - автоклаві) і спалювання.

Способом кип'ятіння у воді або 2,0 % розчині натрію двовуглекислого (сода харчова) знезаражують лабораторний посуд, контейнери для збору мокротиння, посуд з-під виділень, шланги гумові, пробки, груші для піпетування, інструменти після розтину тварин, спецодяг персоналу, марлеві респіратори, рушники, ганчірки для прибирання. Знезараження проводиться протягом 15–45 хвилин з моменту закипання.

Автоклавуванню піддають лабораторний посуд, контейнери для збору мокротиння, мокротиння, бактеріологічні посіви, повітряні бактеріальні фільтри, трупи лабораторних тварин, банки та бачки для тварин, підстилковий матеріал, рідкі відходи, інструменти. Автоклавування з метою знезараження інфікованих матеріалів проводять при температурі $(132 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ($2,0 \text{ кгс/см}^2$) протягом 30–60 хвилин в залежності від виду об'єкта.

Спалюванню піддають медичні відходи: трупи лабораторних тварин, підстилковий матеріал, сміття.

Таблиця 1

Основні характеристики діючих речовин дезінфікуючих засобів

Діюча речовина	Активність	Переваги	Недоліки	Переважне використання
Катіонні поверхнево активні речовини (КПАВ) : четвертинні амонієві сполуки; солі амінів; похідні гуанідину та ін.	Бактерії, гриби, деякі віруси	Не пошкоджують об'єкти, що обробляються; стабільні при зберіганні; мають відносно низьку токсичність, особливо при інгаляційній дії; наявність миючих властивостей; залишкова антимікробна дія	Вибіркова віруліцидна і слабка туберкулоцидна (окрім солей амінів) дія, відсутність спороцидної дії; нейтралізація милом і синтетичними миючими засобами.	Дезінфекція поверхонь у приміщеннях, предметів обстановки, апаратів, приладів, санітарно-технічного обладнання.
Хлораактивні сполуки	Бактерії, віруси, гриби, спори мікроорганізмів	Низька вартість; широкий спектр антимікробної дії, включаючи мікобактерії; висока активність і швидкість дії; наявність дезодоруючого і відбілюючого ефекту	Зниження активності в присутності органічних речовин; різкий запах; подразнююча дія на слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів; утворення у воді стійких галогенорганічних сполук,	Дезінфекція санітарно-технічного обладнання, виділень (фекалії, сеча, мокротиння), біологічних рідин і інших органічних субстратів, посуду з-під виділень, медичних
			небезпечних як потенційні канцерогени, мутагени, тератогени; пошкоджуюча дія на об'єкти (метали, тканини тощо)	відходів
Кисневмісні сполуки (перекис водню, пероксодігидрат фториду калію та ін.)	Бактерії, віруси, грибки, спори мікроорганізмів	Широкий спектр антимікробної дії, включаючи мікобактерії; відсутність запаху; розпад в навколишньому середовищі на нетоксичні продукти - молекулярний кисень і воду	Прояв антимікробної дії у високих концентраціях; подразнююча дія на слизові оболонки і шкіру; шкідлива дія на метали, тканини та інші матеріали; низька стабільність	Дезінфекція, передстерилізаційне очищення і стерилізація МВ

Надкислоти	Бактерії, віруси, грибки, спори мікроорганізмів	Широкий спектр антимікробної дії, включаючи мікобактерії; висока активність, швидкість дії	Різкий запах, подразнююча дія на шкіру і слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів. Можлива пошкоджуюча дія на деякі матеріали виробів; низька стабільність	Дезінфекція і стерилізація МВ
Альдегіди (глутаровий, ортофталевий та ін.)	Бактерії, віруси, грибки, спори мікроорганізмів	Широкий спектр антимікробної дії, включаючи мікобактерії; хороша сумісність з матеріалами, що дозволяє обробляти вироби з будь-яких матеріалів	Висока токсичність; іноді потрібна активація засобу перед застосуванням; фіксує білкові забруднення; сорбується матеріалами (пластмаси, гуми та ін.), у зв'язку з чим вимагає ретельного відмивання з оброблених об'єктів, тривалого провітрювання	Дезінфекція і стерилізація МВ
Феноли	Бактерії, деякі віруси, гриби	Ефективність відносно мікобактерій. Не пошкоджує об'єкти, що обробляються	Неприємний стійкий запах. Вибіркова дія на віруси, відсутність спороцидної дії	Дезінфекція поверхонь в приміщеннях, виділень хворих
Спирти (етилловий, пропіловий та ін.)	Бактерії, віруси	Відносно низька токсичність	Слабка туберкулоцидна і фунгіцидна дія, відсутність спороцидної дії; фіксує білкові забруднення; пошкоджують об'єкти, не стійкі до спиртів (органічне скло, фарби, лаки, клей і ін.), пожежо небезпечність	Шкірні антисептики; дезінфекція невеликих за площею поверхонь

Автоклавування

В спеціалізованих бактеріологічних лабораторіях протитуберкульозної служби для знезараження забрудненого посуду і матеріалів, як правило, використовують такий метод, як автоклавування. Відпрацьований посуд поміщають в автоклав і проводять його знезараження при певному режимі.

Автоклавування є оптимальним методом стерилізації, тому персонал повинен бути навчений правильній роботі цим методом. Автоклав має знаходитися на території лабораторії для запобігання виносу контамінованих

матеріалів за її межі. Якщо автоклав знаходиться поза лабораторією, потенційно інфікований матеріал повинен доставлятися туди в закритих бідсах (контейнерах, відрах, баках).

Одноразові матеріали після автоклавування спалюють або утилізують іншим способом. Скляний посуд миється, стерилізується і може використовуватися повторно.

Проведена стерилізація (знезараження) фіксується у формі № 257/о Журнал контролю роботи стерилізаторів повітряного, парового (автоклава), затвердженій наказом МОЗ України від 04.01.2001 № 1.

Роботу автоклавів перевіряють при кожному завантаженні хімічними тестами (термохімічними індикаторами) і максимальними термометрами та щомісячно – бактеріологічним методом з використанням комерційних біологічних тестів, зареєстрованих МОЗ України.

Категорично забороняється:

- залишати працюючий автоклав без нагляду;
- заливати воду в автоклав, коли він знаходиться під тиском;
- працювати з автоклавом, який має дефекти;
- допускати в автоклавну під час роботи осіб, які не мають відношення до роботи автоклава;
- зберігати в автоклавній сторонні предмети, захаращувати та забруднювати приміщення.

4.4 Поводження з відходами у лабораторіях, які працюють із збудником туберкульозу

Організація видалення лабораторних відходів має наступні цілі:

а) мінімізацію небезпек при поводженні, збиранні, транспортуванні, переробці і видаленні відходів;

б) мінімізацію шкідливої дії на оточуюче середовище.

1. Відповідно до Закону України "Про відходи" усі відходи лабораторій протитуберкульозних установ належать до категорії небезпечних, тобто таких, що мають фізичні, хімічні, біологічні чи інші небезпечні властивості, які створюють або можуть створити значну небезпеку для навколишнього природного середовища і здоров'я людини та які потребують спеціальних методів і засобів поводження з ними.

2. Усі відходи лабораторій протитуберкульозних установ підлягають дезінфекції у відповідності з діючими нормативними документами.

3. Відходи повинні бути піддані обов'язковій дезінфекції перед збиранням до одноразової упаковки безпосередньо на місцях первинного збору відходів методом занурення в дезінфікуючий розчин, підготовлений в спеціально виділеній для цієї мети ємкості.

4. Для дезінфекції використовують тільки зареєстровані в Україні дезінфекційні засоби і рекомендовані до застосування у медичних закладах. Концентрації та експозиції дезінфекційних засобів зазначені у відповідних методичних вказівках (інструкціях, регламентах) по їх застосуванню. При

проведенні дезінфекції відходів слід використовувати режими, що забезпечують знищення збудника туберкульозу.

5. При проведенні дезінфекції відходів, що утворюються в лабораторіях протитуберкульозних закладів, застосовуються спеціально виділені для цих цілей автоклави.

У периферійних лабораторіях, за відсутності автоклавів, знезараження інфікованого матеріалу, як виключення, може здійснюватися кип'ятінням та/або спалюванням.

6. Збирання відходів здійснюється в герметичну одноразову упаковку. М'яка упаковка (одноразові пакети) повинна бути закріплена тільки на спеціальних стійках-візках. Після заповнення пакету приблизно на 3/4 з нього видаляється повітря, і співробітник, відповідальний за збір відходів у цьому медичному підрозділі, не знімаючи пакету зі стійки-візки, здійснює його герметизацію і маркування, з дотриманням вимог техніки безпеки при роботі зі збудниками 3–4-й груп патогенності.

7. Культури мікроорганізмів і штами, вакцини повинні збиратися в герметичну одноразову тверду упаковку (ємкості).

8. Видалення пакетів (ємкостей), заповнених відходами з місць їх утворення здійснюється по мірі заповнення, але не рідше, ніж раз за зміну.

9. При проведенні збору відходів не допускається:

- пересипати небезпечні відходи з однієї ємкості в іншу;
- встановлювати одноразову упаковку (пакети на стійках-візках, ємкості) і багаторазові баки для збору відходів на відстані менше одного метра від електронагрівальних приладів і менше п'яти метрів від джерел відкритого полум'я;
- використовувати м'яку упаковку (одноразові пакети) для збору гострого медичного інструментарію та інших гострих предметів;
- утрамбовувати будь-які відходи руками;
- здійснювати збір відходів без рукавичок.

10. При порушенні цілісності одноразового пакету (розрив, поріз) його необхідно помістити в інший одноразовий пакет і провести повторну герметизацію.

11. При виявленні розсипання небезпечних відходів дезінфекція даного місця проводиться негайно. Для цієї мети заклад повинен мати запас готових до застосування дезінфекційних засобів.

12. Рекомендованим методом знешкодження (знищення) відходів лабораторій протитуберкульозних установ є термічний з використанням піролізних установок (печей).

4.5 Обладнання, спецодяг, засоби індивідуального захисту для забезпечення безпеки

Шафа біологічної безпеки

Основним обладнанням, що забезпечує безпеку в лабораторії, яка виконує бактеріологічні дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, є ШББ, яка ретельно обслуговується і правильно функціонує

(див. розділ.3.3). У лабораторії, що здійснює посів, можуть бути використані ШББ двох типів.

ШББ 2-го класу з рециркуляцією повітря забезпечує подвійний захист – оператора і діагностичного матеріалу або культур мікроорганізмів, з якими проводиться робота.

Це досягається завдяки тому, що у ШББ діють два повітряних потоки: один – фронтальний, що втягує повітря від оператора, захищаючи його, та другий – внутрішній вертикальний спадаючий, що забезпечує рух повітряного потоку через фільтри "HEPA" над робочою зоною. Ламінарна вертикальна ШББ 2-го класу подає в робочу зону повітря профільтроване, очищене від бактерій та спор. Відпрацьоване повітря надходить під тиском через фільтр, очищається, і більша його частина знову надходить у робочу зону. Частина відпрацьованого повітря (від 15,0 до 25,0 %, залежно від моделі шафи) викидається назовні. Оскільки відпрацьоване повітря очищається і залишається стерильним, його надходження в лабораторію безпечне.

Сила тяги ШББ встановлюється виробником і становить: у ШББ 1-го класу – 30 см/с, в ШББ 2-го класу – 40–50 см/с. Технічні характеристики ШББ (в першу чергу – об'єм повітря, що протягується) підлягають щорічній перевірці і повинні тестуватися кваліфікованим фахівцем. Регулярні перевірки (щоквартальні або частіше, залежно від ступеня запиленості атмосфери) повітряного потоку повинні виконуватись за допомогою анемометра або іншого спеціально призначеного для цього приладу. Істотне зниження швидкості повітряного потоку свідчить про забруднення фільтрів та необхідність їх заміни.

Оцінка швидкості повітряного потоку на робочій поверхні ШББ

В цьому тесті дається оцінка розрахованої, або безпосередньо вимірної швидкості повітряного потоку, що проходить через робочу зону. Визначається і встановлюється прийнятна швидкість повітряного потоку, що надходить у ШББ і подається з фільтра.

Повітряний потік в ШББ необхідно виміряти не менше, ніж у 5 точках площини робочого вікна, після чого обчислюється середнє значення. Ні в одному значенні показів приладу розбіжності не повинні перевищувати 0,1 м/с. Наявність більших розбіжностей свідчить про нерівномірність потоку і, як результат, – призведе до турбулентності всередині ШББ.

При роботі з ШББ слід дотримуватися таких заходів обережності.

- Використовувати мікробіологічні методи, які виключають формування аерозолів. Це зведе до мінімуму контакт персоналу з інфекційним матеріалом.

- Для виключення перехресної контамінації чисті матеріали завжди слід тримати на відстані не менше 12,0 см від місця утворення аерозолів. Не тримати пробірки відкритими, закривати їх як можна швидше. Це знизить ймовірність перехресного засіву.

- Не використовувати відкрите полум'я у ШББ. Це утворює завихрення, переривається потік повітря, що надходить до робочої поверхні. Усередині

ШББ краще використовувати невеликі електричні пальники для прожарювання петель.

- Поміщати відпрацьовані піпетки та забруднений посуд в ємкість з дезрозчином у ШББ. Занурення в ємкість проводити з максимальною обережністю, щоб уникнути розбризкування. Витримувати необхідний термін дезінфекції.

- ШББ слід знезаражувати не менше 1 разу на рік, фільтр видаляють, для цього необхідно створити формальдегідну пару, що знищить МБТ на фільтрі. Така обробка необхідна завжди при заміні фільтра або внутрішнього ремонту. Найбільш широко використовується метод отримання формальдегідної пари шляхом додавання перманганату калію до розчину формальдегіду.

Методика знезараження ШББ перед видаленням фільтра, ремонтом (рекомендації ВООЗ і Центрів з контролю за захворюваністю США)

1) Видалити усі матеріали і прилади з ШББ і в безпосередній близькості від нього. Переконайтеся, що ШББ включена.

2) Заклеїти всі щілини і вентиляційні решітки поліетиленом, проклеїти скотчем навколо дверного прорізу для запобігання проникнення пари в сусідні приміщення.

3) На кубічний метр об'єму, який деконтамінують, беруть 25,0 мл 40,0 % розчину формальдегіду і 15,0 г перманганату калію. Поміщають кристали перманганату в глибокий металевий контейнер всередині ШББ. Обливають перманганат розчином формальдегіду і негайно залишають лабораторію, оскільки в ході реакції швидко вивільняється тепло і газ. Закривають і запечатують двері.

4) Залиште формальдегід взаємодіяти на ніч, а краще на вихідні, не вимикаючи ШББ.

5) Видаліть весь поліетилен, скотч, провітріть кімнату до повного видалення формальдегіду, помийте підлоги, стіни і обладнання. Якщо виявляються залишки білого порошку, протріть поверхні 10,0 % розчином аміаку (використовуйте рукавички).

6) Вимкніть ШББ і виконуйте заміну фільтра або ремонт.

Спеціальний одяг. Засоби індивідуального захисту

Під час роботи в лабораторії персоналу слід одягати спеціальний захисний одяг. Кожному співробітнику необхідно мати окремий спецодяг для роботи в "чистому" і "заразному" блоках лабораторії.

При вході в "заразну" зону лабораторії всі особи повинні повністю замінити свій верхній одяг і взуття, в яких вони ходять по вулицях або в інших приміщеннях, на спеціальний одяг: халат або спеціальний костюм, головний убір, бахіли, а також, при необхідності, захисний фартух, рукавички, захисна маска-респіратор. Після закінчення роботи в "заразній" зоні лабораторії і переході в "чисту" зону цей захисний одяг слід зняти і помістити в закритий контейнер або спеціальний мішок для автоклавування або дезінфекції та подальшого прання.

Халат повинен закривати все тіло, верхню частину грудної клітини, шию, рукава доходять до зап'ясть.

Рукавички слід одягати при роботі з потенційно небезпечним матеріалом, поверхнями, обладнанням. Рукавички також захищають порізи на руці від інфікування. Рукавички повинні закривати краї рукавів халату. При пошкодженні або видимому забрудненні рукавичок їх слід негайно зняти і перед використанням іншої пари ретельно вимити руки з милом. Одноразові рукавички не слід мити або використовувати повторно!

Спеціальні маски, що фільтрують до 95,0 % часточок розміром від 1 до 5 мкм, завжди надівають при роботі з інфікованим матеріалом, коли можливе утворення аерозолю.

Захисний одяг, що використовується в "чистому" блоці, слід знімати перед виходом з лабораторії, брудний одяг перед відправкою на прання поміщають у контейнер, що закривається.

4.6 Заходи при надзвичайній ситуації в лабораторії

В основу заходів має бути покладене усвідомлення того, що реально аварії можуть відбуватися. У зв'язку з цим, у кожній лабораторії повинен бути розроблений план дій для усунення потенційно небезпечних наслідків до виникнення аварії, а також необхідно постійно проводити оцінку лабораторних маніпуляцій, з метою пошуку шляхів зведення до мінімуму аварійних ситуацій.

Кращим шляхом захисту у випадку аварії буде добре продуманий план швидких і узгоджених дій щодо усунення наслідків. Ніякий інцидент в бактеріологічній лабораторії не можна розглядати як незначний, проте в кожному випадку необхідна оцінка ситуації для здійснення належних заходів.

Аварії, які відбуваються в лабораторії, можна розділити на два типи: перші утворюють обмежену кількість аерозолю, при інших формуються великі обсяги потенційно заразного аерозолю.

До перших можна віднести, наприклад, випадок розбивання пробірки з культурою або контейнера з мокротинням або розливання мокроти. У цих прикладах щільне середовище і в'язка консистенція мокротиння значно обмежують утворення аерозолю.

При аварії другого типу великі обсяги інфекційного аерозолю утворюються, коли розбиваються пробірки з рідкою культурою або суспензією МБТ.

Заходи щодо локалізації та ліквідації наслідків аварій

1. При аваріях роботу з ПБА негайно припиняють, ставлять до відома керівника лабораторії або особу, що його заміщає, і вживають наступні заходи:

- усі відкриті частини тіла обробляють дезінфікуючим розчином або 70,0 % спиртом;

- при попаданні інфекційного матеріалу на слизові оболонки їх негайно обробляють: очі – 1,0 % розчином борної кислоти, декількома краплями 1,0 % розчину азотнокислого срібла або струменем води; в ніс закачують, а рот і

горло прополіскуюють 0,05 % розчином марганцевокислого калію або 1,0 % розчином борної кислоти.

2. При аварії, пов'язаній з пораненням або іншим ушкодженням шкіри, рукавички (якщо робота провадилася в них) обробляють дезрозчином, знімають, з ранки видавлюють кров, руки обробляють 70,0 % спиртом, потім промивають водою з милом, ранку змазують розчином йоду.

3. Проводять знезараження місця аварії. Після закінчення робіт захисний одяг замочують в дезінфікуючому розчині. Усі співробітники, які перебували в зоні аварії, повинні прийняти душ.

4. При аварії під час роботи на центрифугі кришку повільно відкривають тільки через 30–40 хвилин (після осідання аерозолі). Центрифужні склянки і розбите скло поміщають в дезінфікуючий розчин, поверхню кришки, внутрішні частини центрифуги, її зовнішню поверхню дезінфікують. Дезінфекцію центрифуги проводять після її відключення від електромережі.

5. При аварії з розбризкуванням ПБА особи, які перебували в приміщенні, де сталася аварія, залишають приміщення, обробляють відкриті частини тіла і слизові, замочують засоби індивідуального захисту в дезінфікуючому розчині, приймають душ.

Заходи з ліквідації наслідків аварії здійснюють співробітники лабораторії, одягнені в протичумний (хірургічний) халат, хустку, чоботи (калоші, пластикові бахіли), гумові рукавички, окуляри і респіратор.

При проведенні дезінфекції методом зрошення, у якості засобу індивідуального захисту органів дихання використовуються респіратори марки РУ-60 М або РПГ-68 з патроном, відповідно до дезінфектанту, що використовується або протигаз типу ДП-5.

6. Про аварію, що сталася, та проведені заходи керівник лабораторії подає доповідну записку на ім'я керівника організації і голови комісії з контролю за дотриманням вимог біологічної безпеки, у якій вказує час і дату аварії, її характер, перераховує співробітників, які перебували на місці аварії, у тому числі осіб, які проводили дезінфекційні заходи, а також вжиті заходи.

7. У лабораторіях для ліквідації наслідків аварії, а також профілактики можливого ураження персоналу, необхідно мати: аптечку для надання екстреної медичної допомоги, запас дезінфікуючих засобів, засоби індивідуального захисту, ємкості для замочування їх, розбризкувачі або автомакс, які зберігаються в спеціально відведеному місці.

В аптечці екстреної допомоги повинні знаходитися: 70,0 % етиловий спирт, розчин йоду, сухі наважки марганцевокислого калію, азотнокислого срібла і борної кислоти, які в разі аварії можна розчинити у відповідному об'ємі дистильованої води, стерильна дистильована вода, очні піпетки, ножиці, перев'язувальні засоби, пластир бактерицидний.

Відповідальним за комплектування аптечки екстреної медичної допомоги є керівник підрозділу.

8. За особами, які перебували в приміщенні, де сталася аварія, встановлюють медичне спостереження на термін інкубаційного періоду.

9. В лабораторії повинен бути журнал реєстрації аварій, де зазначається: дата, час, місце, характер аварії, прізвище, ім'я та по батькові осіб, які були безпосередньо в зоні її впливу, а також проведені заходи.

Орієнтовний план дій при аварії 1-го типу (крім перерахованого вище)

- Негайно накрийте розлитий матеріал, щоб уникнути подальшого утворення аерозолію.

- Намочіть покривало (газета, ганчірка, халат) дезінфектантом і нанесіть препарат навколо місця розливу.

- Залиште не менше, ніж на 2 години, змочуючи покриття дезінфектантом у разі висихання.

- Помістіть усі (розбиті пробірки й використане покриття) у контейнер і проавтоклавуйте.

- Вимийте підлогу та обладнання з додаванням дезінфекційного розчину.

Орієнтовний план дій при аварії 2-го типу

- Покинути приміщення усім, крім винуватця інциденту.

- Зупинити циркуляцію повітря, закрити всі щілини, вентиляційні решітки (поліетиленом, скотчем).

- Включити розпилювач дезрозчину, покинути кімнату і запечатати двері.

- Дати апарату витратити весь об'єм дезрозчину, залишити кімнату не менше, ніж на 2 години.

- Надіти всі елементи захисного одягу перед поверненням в кімнату.

- Залити розливу культуру дезрозчином і залишити на час, необхідний для дезінфекції.

- Помістити осколки пробірок, залишки дезрозчину у відповідний контейнер.

- Вимити підлогу, стіни і поверхні обладнання.

Приблизний план дій при аваріях усередині ШББ

У випадку розливання інфекційного матеріалу всередині ШББ, шафу не вимикати. При невеликому утворенні аерозолію рекомендується наступний план дій:

- накрийте залиту ділянку щоб уникнути подальше утворення аерозолію;

- просочіть використаний матеріал (ганчірка, халат) дезрозчином і залийте ним навколо;

- покиньте кімнату мінімум на 2 години, ШББ за цей час витягне весь аерозоль, що утворився;

- помістіть всі розбиті пробірки, ганчірки у відповідний контейнер;

- вимийте внутрішню частину шафи з дезрозчином, а також підлогу і обладнання, негайно покиньте кімнату.

У разі утворення великого об'єму аерозолію рекомендується наступний план дій:

- ШББ не вимикати і не входити до кімнати, принаймні, 4 години – за цей час ШББ витягне або розбавить повітря кімнати профільтрованим повітрям;

- увімкнути апарат для розпилення дезрозчину, залишити приміщення до осідання аерозолію;

- використовувати формальдегід, як описано для знезараження фільтра.

Питання:

1. Які механізми та шляхи інфікування мікобактеріями туберкульозу реалізуються в умовах лабораторій?
2. Яка структура заходів, спрямованих на зниження ризику внутрішньолабораторного зараження?
3. Перелічіть основні правила лабораторної гігієни співробітників лабораторії.
4. Охарактеризуйте основні методи знезараження об'єктів, контамінованих мікобактеріями.
5. Які групи дезінфікуючих засобів найбільш часто використовуються для знезараження об'єктів, контамінованих мікобактеріями?
6. Визначте основні положення, які забезпечують безпечне поводження з відходами лабораторій протитуберкульозних установ.
7. Перелічіть заходи, що проводяться при аварійних ситуаціях в лабораторіях.

5 Бактеріологічні методи дослідження з використанням живильних середовищ

5.1 Деякі біологічні особливості роду *Mycobacterium* (21 group Bergey's Manual Determinative Bacteriology, Ninth Edition)

До роду *Micobacterium* родини *Micobacteriaceae* включені кислото- і спиртостійкі (ознака особливо виражена у патогенних видів) аеробні нерухомі грампозитивні прямі або вигнуті паличкоподібні бактерії. Іноді вони утворюють нитковидні або міцеліальні структури, які фрагментуються при легкому механічному впливі на палички чи кокоподібні елементи.

Слово "мікобактерія" походить з грецьких слів *myces* – гриб і *bacterium*, *bastron* – паличка, прутик. Компонент назви "гриб" зумовлений тенденцією цих мікроорганізмів утворювати нитчасті і розгалужені форми, схожі на цвіль.

Для мікобактерій характерним є високий вміст ліпідів і восків (до 60,0 %) у клітинних стінках, утворених пептидоглікано-арабіногалактановим комплексом; деякі види утворюють каротиноїдні пігменти, що не дифундують. Каталазо- і арилсульфатазопозитивні, резистентні до дії лізоциму. Ростуть повільно або дуже повільно (сапрофітні види значно швидше). Мікобактерії широко поширені в навколишньому середовищі – воді, ґрунті, у рослин і тварин. Незважаючи на те, що в даний час ідентифіковано близько 50 видів, рід нараховує близько 200 видів; типовий вид – *Mycobacterium tuberculosis*. За ознакою патогенності розрізняють власне патогенні, що спричиняють конкретні захворювання, і атипові мікобактерії, серед яких є умовно-патогенні і сапрофітні. Для систематики атипових мікобактерій запропоновані різні класифікації, засновані на генетичній спорідненості з *M. tuberculosis* або спорідненості з сапрофітними видами; серед запропонованих варіантів найбільше поширення знайшла класифікація Раньона (1959), в основу якої покладені дві властивості – колір колоній і швидкість росту. За нею виділяють 4 групи атипових мікроорганізмів.

У лабораторній практиці основними методами індикації та ідентифікації різних мікобактерій є бактеріоскопічний метод дослідження (пряма мікроскопія, люмінесцентна мікроскопія), культуральний метод (швидкість росту, форми колоній і мікроколоній, здатність до утворення пігменту, ріст при різних температурах, здатність до росту на мясопептонному агарі, толерантність до NaCl і деякі біохімічні особливості, що надані нижче), біологічний і молекулярно-генетичний методи.

M. tuberculosis – тонкі, прямі чи злегка вигнуті палички розмірами 1,0 – 10,0 x 0,2 – 0,6 мкм, зі злегка закругленими кінцями, у цитоплазмі містять зернисті утворення (2 –10). Морфологія істотно варіює в залежності від віку культури й умов культивування – в молодих культурах палички довші, а в старих схильні до простого розгалуження. Іноді утворюють коковидні структури і L-форми, що зберігають патогенність, а також форми, що фільтруються, патогенна роль яких залишається недостатньо вивченою.

Нерухомі, спор не утворюють, позбавлені капсул, але мають мікрокапсулу, яка відокремлена від клітинної стінки осмієфобною зоною.

Кислотостійкі, що обумовлено високим вмістом ліпідів і міколової кислоти в клітинній стінці, а також утворюють кислотолабільні гранули, які переважно складаються з метафосфату (зерна Муха), розташовуються вільно або в цитоплазмі паличок. Грампозитивні, анілінові фарби сприймають погано; за Цілем-Нільсеном забарвлюються в яскраво-червоний колір; за Мухом-Вайссом – у фіолетовий (йодофільність); гранули забарвлюються у відповідний колір.

Аероби, але здатні рости у факультативно-анаеробних умовах. Вміст в атмосфері вирощування 5,0 – 10,0 % CO₂ сприяє більш швидкому росту. Розмножуються повільно, в середньому 14 – 18 годин. Температурний оптимум 37 – 38 °C; потреба в рН 7,0 – 7,2 (але можуть рости в межах 4,5 – 8,0). Для росту потребують в присутності білкового субстрату і гліцерину, а також вуглецю, хлору, сірки, фосфору, азоту, факторів росту (біотину, нікотинової кислоти, рибофлавіну та ін.), іонів (Mg⁺⁺, K⁺, Na⁺, Fe⁺⁺). Для вирощування найчастіше використовують щільні яечні середовища (Левенштейна-Єнсена, Фінна-П та ін.). На рідких середовищах ріст спостерігають на 5 – 7 добу у вигляді сухої зморшкуватої плівки (R-форма), що підіймається на стінки пробірки; середовище залишається прозорим. У середовищах, що містять детергент (твін-80), дають рівномірний ріст у товщі середовища (особливо при періодичному струшуванні). На рідких середовищах і при внутрішньоклітинному розвитку добре виявляється характерний корд-фактор (тригалоza-6,6-димиколат), що обумовлює зближення бактеріальних клітин у мікроколоніях, їх ріст у вигляді серпантиноподібних утворень ("кіс") і має відношення до вірулентності збудника. На щільних середовищах відзначають ріст у вигляді сухого зморшкуватого нальоту кремового кольору; колонії з піднятим центром, що нагадують цвітну капусту, крихкуваті, погано змочуються водою. Колонії легко знімаються з середовища, а при прожарюванні тріскотять. Під впливом антибактеріальних препаратів можуть дисоціювати з утворенням м'яких вологих S-колоній або рости у вигляді гладких пігментованих колоній. Відмінна риса *M. tuberculosis* – здатність до

синтезу значної кількості нікотинової кислоти (ніацину), це використовують для її диференціальної діагностики з іншими мікобактеріями (ніациновий тест); одна з умов - необхідність посіву на середовище Левенштейна-Єнсена, що не містить малахітового зеленого (тому що барвник вступає в реакцію з реагентами, що використані). На середовищах з жовцю утворюють сіруватий маслянистий наліт, обумовлений подовженими паличками.

Проведення широкого комплексу мікробіологічних досліджень обумовлено зміною епідемічної ситуації, патоморфозом туберкульозу, зміною ряду властивостей збудника, що утруднюють мікробіологічну діагностику туберкульозу.

До числа їх належить:

- олігобацилярність хворих, що виражається як невеликим числом мікобактерій у діагностичному матеріалі, так і епізодичністю бактеріовиділення. У зв'язку з цим достовірна діагностика бактеріовиділення повинна ґрунтуватися на комплексі мікробіологічних досліджень;

- зміна культуральних властивостей мікобактерій, втрата ними здатності до росту на деяких штучних живильних середовищах. Тому посів діагностичного матеріалу необхідно проводити не менш, ніж на два різні живильні середовища, або використовувати попереднє підрощування на рідких живильних середовищах;

- зміна тинкторіальних властивостей збудника, втрата мікобактеріями кислотостійкості і пов'язана з цим недостатня інформативність бактеріоскопічних методів дослідження при забарвленні за Цілем-Нільсеном. Додаткове використання люмінесцентної мікроскопії і комплексність мікробіологічного дослідження дозволяють виключити цю проблему;

- збільшення ролі неспецифічної мікрофлори у виникненні супутніх захворювань і ускладнень при туберкульозі. У ряді випадків, особливо у хворих з неясною етіологією захворювання, мікробіологічна ідентифікація збудника повинна проводитися за життєвими показаннями, інтервал між одержанням матеріалу від хворого і посівом його на відповідні живильні середовища має бути максимально коротким і не перевищувати 2 години.

5.2 Діагностичний матеріал

Лабораторія, що проводить мікробіологічні дослідження з метою виділення МБТ, повинна бути готова отримати різноманітний біологічний матеріал на дослідження, а саме:

- мокротиння;
- виділення верхніх дихальних шляхів, після подразнюючої інгаляції;
- промивні води бронхів;
- бронхоальвеолярні змиви (БАЗ);
- бронхоальвеолярний лаваж (БАЛ);
- матеріал, отриманий при бронхоскопії;
- транстрахеальний та внутрішньолегеновий біоптати;
- промивні води шлунка;
- сеча;

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

Усі наведені вище матеріали можна розділити на 2 групи:

- асептично зібраний матеріал, який, як правило, не містить іншу мікрофлору;
- матеріал, що містить звичайну флору, або зібраний в антисептичних умовах.

Мокротиння

Найчастіше з метою діагностики туберкульозу досліджується мокротиння хворого. У хворого з продуктивним кашлем не виникає проблем з отриманням мокротиння. Якщо хворий не може відкашляти мокротиння, слід використовувати інші методи (відхаркувальні препарати, застосування подразнювальних аерозольних інгаляцій, промивання трахеї, бронхів тощо).

Асептично зібрані рідини

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

Асептично зібрані тканини

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

Сеча

Сеча (середня частина ранкової порції або вся ранкова порція) збирається в стерильний посуд після ретельного туалету зовнішніх статевих органів. Аналіз сечі на мікобактерії повинен передбачати обов'язкове триразове дослідження. В лабораторії сечу центрифугують, використовуючи метод накопичення осаду. Особливістю існування *M. tuberculosis* в рідинах є здатність їх тривалий час перебувати у зваженому стані. Тому рекомендується робити центрифугування при 3000 g всього матеріалу, а не його донної фракції, що одержується після відстоювання в природних умовах.

Збір добової сечі для бактеріологічного дослідження не практикується. Це пояснюється тим, що при накопиченні сечі протягом доби неможливо зберегти її без накопичення мікрофлори. Зберігання ємкості з сечею у холодному місці може призвести до випадання солей, що несприятливо відбивається на подальшій обробці осаду. Крім того, в сечі містяться бактерицидні продукти,

які можуть не тільки пригнічувати життєздатність мікобактерій, але протягом доби навіть руйнувати мікробні клітини. У той же час при тривалому зберіганні сечі неможливо уникнути розмноження в ній гнилісної і гноєрідної мікрофлори.

5.3 Організація збору, зберігання і транспортування діагностичного матеріалу

Процедура збирання мокротиння

Збір мокротиння для дослідження на мікобактерії туберкульозу – дуже відповідальний етап діагностичної процедури, від чіткості проведення якого багато в чому залежить результат дослідження.

Необхідно мати на увазі, що в момент відкашлювання хворим мокротиння створюється дуже високий ризик повітряно-крапельного поширення інфекції. Тому бажано, щоб збір мокротиння проводився в спеціально виділеному для цих цілей окремому добре вентильованому приміщенні (пункті збору мокротиння), оснащеному бактерицидними лампами і засобами дезінфекції, або на відкритому повітрі.

Ідеальним варіантом є встановлення в кімнаті для збору мокротиння спеціальної kabіни для збору мокротиння з інтенсивною витяжною вентиляцією або відокремлення частини приміщення скляною перегородкою для ізоляції місця збору мокротиння і захисту медичного працівника.

Збір мокротиння повинен проводитися у присутності і при безпосередній участі медичного працівника. Особам, відповідальним за збір мокротиння, необхідно керуватися наступними правилами.

1. Пояснити хворому причини дослідження і необхідність відкашлювати не слину або носоглотковий слиз, а вміст глибоких відділів дихальних шляхів, що досягається в результаті продуктивного кашлю, що виникає після декількох (2–3) глибоких вдихів.

Також необхідно попередити хворого, що він повинен попередньо прополоскати ротову порожнину кип'яченою водою, що дозволяє механічно видалити основну частину мікрофлори, що вегетує в ротовій порожнині і залишки їжі, які забруднюють мокротиння і ускладнюють його обробку.

2. Медичний працівник, який бере участь у зборі мокротиння, крім халата і шапочки повинен бути у респіраторі, гумових рукавичках і гумовому фартуху. Він повинен перебувати за спиною хворого, вибираючи своє положення таким чином, щоб напрямок руху повітря був від нього – до хворого. Медичний працівник повинен відкрити контейнер для збору мокротиння, зняти з нього кришку і передати хворому донну частину контейнера.

В ідеальному випадку пацієнт відкашлює мокротиння в спеціальній kabіні, встановленій у приміщенні для збору мокротиння, або в тій частині приміщення для збору мокротиння, яка спеціально ізольована для відкашлювання мокротиння пацієнтом. У цьому випадку медичний працівник може передати пацієнтові контейнер для збору мокротиння, не відкриваючи його, і спостерігати за процесом збору мокротиння через скло.

3. Стоячи позаду пацієнта або в ізольованій частині кімнати, медичний працівник спостерігає за збором мокротиння. Медпрацівникові слід рекомендувати пацієнту тримати контейнер як найближче до губ і відразу ж спльовувати в нього мокротиння по мірі його відкашлювання.

4. Після завершення процедури збору мокротиння медичний працівник повинен закрити контейнер кришкою (або перевірити, наскільки щільно закрив його пацієнт) і оцінити кількість і якість зібраного мокротиння.

Якщо мокротиння отримати не вдалося, контейнер вважається використаним і підлягає знезараженню.

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

Контейнери для збору діагностичного матеріалу

Для збору діагностичного матеріалу повинні використовуватись спеціальні контейнери, які:

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

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

- мають об'єм 30,0–50,0 мл;

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

Найкращим варіантом є використання для збору діагностичного матеріалу одноразових пластикових прозорих контейнерів об'ємом близько 50,0–100 мл. Матеріал, з якого виготовлений контейнер, повинен розплавлятися (деформуватися) при автоклавуванні.

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

Зберігання і транспортування матеріалу

В цілях підвищення висівання термін між збиранням матеріалу і його обробкою має бути мінімальним. Матеріал відразу після збору слід відправляти

в лабораторію (протягом 24 годин). У разі віддаленості лабораторії від місця взяття матеріалу його відправка в лабораторію може здійснюватися два рази на тиждень. У цьому випадку контейнери із зібраним матеріалом повинні зберігатися в холодильнику при температурі 4–8 °С не більше 72 годин. При необхідності зберігання понад 72 години, до діагностичного матеріалу додають консервант, у цьому випадку термін зберігання збільшується до 5 діб.

Асептичний матеріал повинен бути відправлений в лабораторію негайно!

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

- якщо передбачувана затримка не перевищує 24 години, матеріал змішують з однаковим об'ємом 10,0 % розчину тризаміщеного фосфату натрію;

- змішати матеріал з однаковим об'ємом 1,0 % розчину цетилпіридин хлориду у 2,0 % хлориді натрію. Мікобактерії туберкульозу залишаються життєздатними до 1 тижня;

- додати до матеріалу двократний об'єм 2,0–3,0 % розчину борної кислоти.

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

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

Жоден із зазначених вище методів не є оптимальним, і своєчасна доставка є єдиною запорукою збереження матеріалу!

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

Переважає більшість матеріалу, що відправляється у лабораторію, направляється до неї в однакових контейнерах, куди забирається мокротиння, тому доцільно мати в лабораторії кілька спеціальних металевих або пластикових транспортувальних ящиків.

Вони влаштовані таким чином, щоб фіксувати 20–30 контейнерів з діагностичним матеріалом у вертикальному положенні. Кришка ящиків повинна надійно закриватися, щоб виключити можливість самовільного відкривання кришки і висипання контейнерів із зразками. Для транспортування можна використовувати металеві бікси. Під час транспортування матеріал повинен, по можливості, охолоджуватися і не перебувати на сонці.

На зразки, в залежності від мети дослідження, заповнюється направлення за формою № 200 – 1/о «Направлення на бактеріоскопічне дослідження ТБ 05» (далі – форма ТБ 05), або за формою № 200 – 2/о «Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06».

Крім того на кожний контейнер (ящик/бікс) заповнюють форму № 240 – 1/о «Опис зразків мокротиння, які направляються в лабораторію ТБ 05а» (далі – форма ТБ 05а).

Форма ТБ 05а заповнюється у двох примірниках відповідальними особами закладів та установ охорони здоров'я незалежно від форми власності та підпорядкування, які відповідають за збір мокротиння.

У кінці зазначаються цифровим способом дата направлення/доставки зразків мокротиння у лабораторію, а також прізвище та ініціали особи, яка проводила збір зразків мокротиння, і особи, яка прийняла зразки у лабораторію.

Форма ТБ 05а направляється в лабораторію разом із зразками мокротиння, зазначеними у формі ТБ 05 та формі ТБ 06.

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

Перед відправкою зібраного матеріалу медичний працівник повинен перевірити:

1) чи відповідає кількість контейнерів з мокротинням їх кількості, зазначеній у списку Форми ТБ 05а;

2) чи відповідає номер кожного контейнера номерам, вказаним у Форми ТБ 05а;

3) чи є у списку всі необхідні дані про кожного пацієнта.

Після перевірки даних супроводжувальної документації медпрацівник:

– вказує дату відправлення матеріалу на дослідження та ставить свій підпис;

– вкладає в файл (конверт, поліетиленовий пакет) супроводжувальний лист (ТБ05а) та заповнені бланки направлень на мікроскопічне дослідження на кожную пробу матеріалу і прикріплює конверт до транспортного контейнеру (біксу, ящику) зовні;

– ретельно закриває транспортний контейнер.

Інструкції щодо взяття (збору), зберігання, консервування та правила (розклад) відправлення/доставки матеріалу, правила вибракування матеріалу повинні бути включені в Настанову з якості і перебувати на робочих місцях у пунктах збору матеріалу і в лабораторії.

5.4 Прийом та реєстрація матеріалу

Прийом матеріалу повинен проводитися в спеціально відведеному місці. Бікси/транспортувальні ящики з контейнерами повинні бажано відкривати у витяжній шафі, або на спеціально виділеному столі з дотриманням таких вимог.

■ Надіти одноразові рукавички. Якщо транспортний контейнер (далі – бікс) відкривається у шафі біобезпеки, потрібно одягнути антиаерозольний респіратор.

■ Провести зовнішню обробку бікса відповідним дезінфектантом.

■ Обережно відкрити бікс і перевірити цілісність контейнерів. Биті контейнери знезаражують шляхом занурення в дезінфектант, кип'ятіння або

автоклавування. Матеріал з таких зразків не досліджується. У цьому випадку необхідно запросити новий зразок на аналіз.

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

- Продезінфікувати внутрішню частину бікса. Якщо виявлено забруднення бікса, проавтоклаувати його або занурити в дезінфікуючий розчин.

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

- Присвоїти матеріалу лабораторний порядковий номер – перший вільний номер журналу Форма первинної облікової документації № 252-1/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріоскопічні дослідження) ТБ 04/1» (один на 3 зразки від одного пацієнта), або Форма первинної облікової документації № 252-1/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2» (один на 3 зразки від одного пацієнта). Позначити відповідним номером контейнер (на бічній стінці) і внести номер в бланк направлення.

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

***Увага!** Будьте уважні при присвоєнні номера і маркуванні контейнера. Помилки на цьому етапі призведуть до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів.*

Оцінка об'єму та якості матеріалу, що надійшов

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

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

- поведінку відносно проб незадовільної якості;

- заходи при виявленні пошкоджених або не герметично закритих контейнерів.

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

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

Всі отримані первинні проби повинні бути зареєстровані в формах первинної облікової документації № 252-1/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріоскопічні дослідження) ТБ 04/1», або № 252-1/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2» із ретельним заповненням усіх граф, відповідно до направлення.

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

Питання:

1. *Які діагностичні матеріали можуть використовуватися при проведенні бактеріологічного дослідження для виділення мікобактерій? Які матеріали досліджуються у вашій лабораторії?*
2. *У якому випадку слід застосовувати консерванти? Які консерванти і режими їх застосування повинні використовуватися? Які умови найбільш повно забезпечують якість матеріалу, що надходить в лабораторію?*
3. *Перелічіть вимоги до контейнерів, в які збирається діагностичний матеріал і в яких матеріал транспортується в лабораторію.*
4. *Які дії з матеріалом, що надійшов у лабораторію повинні проводитися співробітниками лабораторії?*
5. *Які можливі причини вибракування матеріалу? Чи є правила вибракування матеріалу у вашій лабораторії? Які?*

5.5 Обробка діагностичного матеріалу, деконтамінація та концентрація зразків

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

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

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

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

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

5.5.1 Стандартні методи розрідження та деконтамінації

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

Обробка матеріалу розчином тризаміщеного фосфорнокислого натрію

Розчин тризаміщеного фосфорнокислого натрію може використовуватися наступної концентрації:

– 10,0 %, як зазначено у наказі МОЗ України № 45.

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

Методика обробки

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

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

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

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

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

5. Використану піпетку опустити в ємкість з дезінфікуючим розчином.

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

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

8. 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 дистильованої води.

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

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

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

Приготування розчинів

1. 100 г тризаміщеного фосфату натрію розчиняють в 800 мл дистильованої води і доводять об'єм розчину до 10,0 мл.

2. 6,0 мл концентрованої соляної кислоти додають до 94,0 мл дистильованої води.

Ніколи не додавати воду в кислоту!

Методика обробки сечі

Оскільки в сечі, як правило, присутня невелика кількість мікобактерій, для підвищення висіву можна рекомендувати так званий метод "подвійної обробки сечі". Він полягає в наступному:

1. 50,0–70,0 мл сечі заливають 20,0 мл Na_3PO_4 і залишають на 2 години при кімнатній температурі.

2. Через 2 години асептично надосадову рідину зливають у дезінфікуючий розчин, а осад переносять в центрифужну пробірку.

3. Пробірки врівноважують і центрифугують 15 хвилин при 3000 g.

4. Надосадову рідину зливають в дезінфікуючий розчин, а осад заливають таким же об'ємом Na_3PO_4 і інкубують в термостаті 18–20 годин при температурі 37 °C.

5. Далі центрифугують, як описано вище.

Метод з використанням N-ацетил-L-цистеїну і гідроксиду натрію (NALC-NaOH)

У регіонах з достатніми матеріальними ресурсами можуть застосовуватися більш дорогі методи гомогенізації і деконтамінації, наприклад, метод з використанням NALC-NaOH.

Застосування муколітичного препарату NALC, що використовується для швидкого розрідження мокротиння, дозволяє прискорити процес деконтамінації і зменшити концентрацію деконтамінуючої речовини (NaOH) до 1,0 %. NALC швидко втрачає свою активність в розчиненому вигляді, тому його розчин повинен готуватися щодня і вживатися свіжим. У муколітичну

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

Цей метод дає більшу висіваємість мікобактерій, проте вимагає більших матеріальних витрат. Методика застосування даного препарату приводиться в інструкції, що додається до нього.

Приготування реагентів для обробки клінічних зразків

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

Розчини готують таким чином:

- розчин NaOH: 4,0 г NaOH розчинити в 100 мл дистильованої води;
- розчин цитрату натрію: 2,9 г Na-цитрату дигідрату або 2,6 г Na-цитрату безводного розчинити в 100 мл дистильованої води.

Вказані розчини змішують в рівному об'ємі, стерилізують і зберігають в стерильному закритому посуді для подальшого використання.

Другий варіант приготування розчину NaOH-цитрат – в 10,0 мл дистильованої води розчинити:

- гідроксид натрію (NaOH) – 20,0 г
- цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) – 14,5 г.

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

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

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

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

- а) 9,47 г безводного Na_2HPO_4 розчиняють в 10,0 мл дистильованої води;
- б) 9,07 г KH_2PO_4 розчиняють в 10,0 мл дистильованої води.

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

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

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

Стерилізація буфера проводиться в автоклаві при 121 °С протягом 15 хвилин в ємкості з кришкою, що частково відкручена. Після охолодження розчину до кімнатної температури кришку слід щільно закрити.

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

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

■ Щільно закривши кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за допомогою вортекса (протягом 5–20 секунд), прагнучи досягти повного розрідження; рекомендується кілька разів перевернути пробірку, щоб усі ділянки внутрішніх поверхонь пробірки і кришки піддалися дії розчину.

Увага! Уникайте посиленого струшування, щоб запобігти окисленню і інактивації NALC. Необхідний ступінь інтенсивності змішування деконтамінуючого розчину з оброблюваним матеріалом забезпечується під час центрифугування.

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

■ Додати в пробірку стерильний фосфатний буфер (рН = 6,8) до відмітки «50 мл» (для зниження дії NAOH і зменшення щільності розчину перед центрифугуванням); щільно закрити кришку і перемішати вміст пробірки струшуванням, щоб змити всі внутрішні поверхні пробірки і кришки.

■ Центрифугувати зразок протягом 15–20 хвилин при 3000 g в антиаерозольній центрифугі для осадження 95,0 % наявних в матеріалі мікобактерій.

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

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

Обробка матеріалу 4,0 % розчином їдкого натру (модифікований метод Петрова)

Загальний час обробки матеріалу лугом 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. Даний показник не залежить від додаткової загибелі бактерій за рахунок підвищеної температури при центрифугуванні та інших факторів.

Розчин їдкого натру токсичний по відношенню як до забруднюючих мікроорганізмів, так і до мікобактерій туберкульозу. Тому при використанні даного методу необхідно суворо дотримуватись вказаних термінів обробки.

Методика обробки

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

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

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

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

5. 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.

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

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

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

9. До осаду додати 1–2 краплі 10,0 % розчину соляної кислоти для отримання нейтрального значення рН, що визначається індикаторною паперовою смужкою.

10. Закрити пробірку і струснути її вміст.

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

Приготування розчинів:

1. 4,0 % розчин їдкого натру (NaOH).

40 г їдкого натру заливають дистильованою водою до об'єму 10,0 мл.

2. 10,0 % розчин соляної кислоти.

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

Розчини стерилізують в автоклаві при 1 атмосфері протягом 20 хвилин.

5.5.2 Інші методи обробки матеріалу

Обробка матеріалу 3,0 % сірчаною кислотою

Загальний час обробки кислотою не повинен перевищувати 20 хв!

Незважаючи на те, що мікобактерії туберкульозу не втрачають життєздатності в сильно закисленому середовищі, необхідно пам'ятати, що тривала експозиція матеріалу в розчині сірчаної кислоти згубно діє на мікобактерії. Тому розчином сірчаної кислоти проводять обробку матеріалу, що містить велику кількість супутньої мікрофлори. Цей метод рекомендований для обробки сечі, гнійних ексудатів і виділень ран, шматочків тканин, органів експериментальних тварин тощо.

Методика обробки

1. Для отримання осаду правильно зібраний матеріал (60–100 мл) використовують цілком, оскільки мікобактерії, маючи питому вагу близьку до 1,0, можуть довго не осідати, перебуваючи в завислому стані.

2. З цього матеріалу методом нашарування поетапним центрифугуванням отримати осад. Для цього перенести в 1–2 центрифужні пробірки приблизно по 15–20 мл матеріалу.

3. Урівноважити пробірки й центрифугувати матеріал при 3000 g протягом 15 хвилин.

4. Надосадову рідину відібрати 5,0–10,0 мл піпеткою і перенести її в ємкість з дезінфікуючим розчином, залишивши в кожній пробірці 0,8–1,2 мл осаду.

5. Отримані в різних пробірках осад з одного і того ж матеріалу за допомогою тієї ж стерильної піпетки перенести в одну пробірку, щільно закрити її пробкою і струснути.

6. Використану піпетку опустити в ємкість з дезінфікуючим розчином.

7. До отриманого осаду додати рівний об'єм 3,0 % розчину сірчаної кислоти.

8. Витримати суміш з кислотою 10 хвилин при кімнатній температурі. *Не перевищувати час експозиції!*

9. Центрифугувати суміш при 3000 g протягом 10 хвилин.

10. Стерильною піпеткою на 5,0–10,0 мл відібрати надосадову рідину і перенести її в ємкість з дезінфікуючим розчином, залишивши приблизно 0,8–1,2 мл осаду.

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

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

13. Стерильною піпеткою на 5,0–10,0 мл відібрати надосадову рідину і перенести її в ємкість з дезінфікуючим розчином, залишивши приблизно 1,5 мл осаду.

14. Додати в пробірку 1–2 краплі 4,0 % їдкого натру до отримання нейтрального значення рН, що визначається індикаторною паперовою смужкою.

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

Приготування розчинів

1. 3,0 % розчин сірчаної кислоти.

До 97,0 мл дистильованої води додають 3,0 мл концентрованої сірчаної кислоти, обережно нашаровуючи її по стінках судин.

УВАГА! Кислоту слід додавати у воду, а не навпаки!

Не піпетуйте концентровану сірчану кислоту ротом!

2. 4,0 % розчин їдкого натру.

40 г NaOH заливають дистильованою водою до об'єму 10,0 мл.

Метод з використанням 5,0% щавлевої кислоти або 4,0 % сірчаної кислоти

Іноді лабораторним працівникам доводиться стикатися з надмірно високою контамінацією проб. У таких випадках можна застосувати жорсткіші методи деконтамінації з використанням 5,0 % щавлевої кислоти або 4,0 – 6,0 % сірчаної кислоти.

Ці методи нерідко дають добрі результати в тих випадках, коли проби мокротиння виявляються масивно забрудненими *Pseudomonas sp.* і іншими грамнегативними мікроорганізмами.

Процедура обробки відповідає обробці 3,0 % розчином сірчаної кислоти (див. вище).

5.5.3 Зразки діагностичного матеріалу, які не потребують деконтамінації

Наступні біологічні рідини і тканини не потребують деконтамінації, якщо вони були взяті в стерильні флакони з дотриманням правил асептики:

- спинномозкова, синовіальна і інші рідини із закритих порожнин;
- кістковий мозок;
- гній з "холодних" абсцесів;

5.5.4. Внутрішньолaboratorний контроль якості деконтамінації

Проводиться щодня

Для контролю якості деконтамінації необхідно провести обробку штамів МБ, згідно з прийнятою у лабораторії процедурою деконтамінації одночасно з клінічними зразками. Як тест-штам використовують лабораторний (музейний) штам *M. smegmatis* або *M. fortuitum*. Необхідно приготувати суспензію цієї культури, розлити суспензію контрольного штаму в дві пробірки, одну з яких піддати процедурі деконтамінації одночасно з клінічними зразками.

Зробити з кожного із зразків декілька розведень таким чином:

- розвести бактеріальну суспензію за стандартом мутності 1 McF (3×10^8 мікробних тіл в 1,0 мл) – суспензія № 1;
- приготувати серійні 10-кратні розведення кожної культури з суспензії № 1, щоб одержати 3×10^3 і 3×10^4 бактерій в 1,0 мл.

Далі засіяти по 0,2 мл обробленої і необробленої суспензій 3×10^3 і 3×10^4 на чашки Петрі з кров'яним агаром. Інкубувати чашки з посівами при 37 °C 24 години. Засіяні розведення повинні дати ріст 1–10 і 10–100 колоній відповідно.

Процедура деконтамінації вважається задовільною, якщо число колоній в контрольних пробах, підданих деконтамінації, у 2–4 рази нижче, ніж у відповідних необроблених контрольних пробах.

Результати висіву контрольних проб фіксують в журналі реєстрації посівів або у спеціальному журналі.

Проводиться щомісячно

У лабораторіях з кількістю досліджень 20 зразків на день і менше необхідно щомісячно контролювати рівень проростів пробірок неспецифічною мікрофлорою, які засівають матеріалом після деконтамінації. При цьому ведеться облік усіх пробірок з посівами.

Відсоток проростів менше 2,0, свідчить про жорстку де контамінацію, яка дуже сильно впливає на мікрофлору, і частина штамів мікобактерій гіне. В цьому випадку негативні результати посіву діагностичного матеріалу, який був підданий деконтамінації в контрольований термін, можуть виявитися помилковими. Відсоток проростів більше 5,0, свідчить про недостатню деконтамінацію. В цьому випадку також необхідно провести додаткову санобробку приміщень лабораторії. У разі виявлення проростів, обумовлених нижчими грибами, необхідно також перевірити температуру культивування мікроорганізмів.

Факт «проросту» відмічається у формі первинної облікової документації № 252-1/о «Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2», а також у бланках результатів досліджень – друга частина (відривна) форм первинної облікової документації ТБ 06 та ТБ 06а "Результат культурального дослідження (посіву) попередній".

Оцінку частки проростів проводять щомісячно.

Результати оцінки проростів – менш трудомісткий процес, ніж щоденний контроль якості з використанням контрольних штамів, проте він не дозволяє проводити оперативний контроль і виправлення недоліків деконтамінації відразу після їх виявлення, оскільки проводиться раз на місяць. При цьому результати значної кількості зразків від пацієнтів можуть виявитися помилковими (хибнонегативними).

5.6 Живильні середовища, посіви і культивування

5.6.1 Характеристика живильних середовищ

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

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

Кожне з цих середовищ має свої переваги і недоліки. Оптимальне середовище для культивування МБТ повинне бути недорогим, простим в приготуванні, складатися з доступних компонентів. Крім того, середовище повинне пригнічувати ріст супутньої мікрофлори, забезпечувати хороший ріст при посіві невеликої кількості мікобактерій і можливість попередньої диференціації колоній, що вирости, за морфологічними ознаками. Тобто оптимальне середовище повинне мати добрі інгібуючі, ростові та диференційні

властивості. Яєчні середовища найбільшою мірою відповідають вищезазначеним вимогам при проведенні посіву з мокротиння.

Переваги яєчних середовищ:

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

Недолік яєчних середовищ:

- поява росту мікобактерій на протязі від 2 до 12 тижнів і більше.
- якщо у процесі культивування з'являється ріст супутньої мікрофлори, він відмічається на всій поверхні живильного середовища, внаслідок чого ці пробірки доводиться відбраковувати.

Для підвищення результативності бактеріологічного дослідження рекомендується застосовувати посів діагностичного матеріалу одночасно на 2–3 живильних середовища різного складу.

В результаті численних порівняльних випробувань встановлено, що для бактеріологічної діагностики туберкульозу слід використовувати як мінімум два різних за складом живильних середовища. Найбільш широко використовуються в Україні 2 яєчних середовища – Левенштейна-Єнсена і Фінна-II.

Середовище Левенштейна-Єнсена

Середовище Левенштейна-Єнсена застосовується у всьому світі як стандартне середовище для первинного виділення збудника туберкульозу і визначення його чутливості до антимікобактеріальних препаратів. Це середовище рекомендовано для використання у всіх мікробіологічних лабораторіях протитуберкульозної служби України з метою отримання порівняних результатів.

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

Середовище Фінна-II

Середовище Фінна-II рекомендоване в Україні як друге стандартне середовище для виділення мікобактерій. Воно відрізняється від середовища Левенштейна-Єнсена тим, що замість L-аспарагіна в ньому використовується глутаміновокислий натрій (глутамат натрію) і склад солей розрахований таким чином, що кінцева кислотність середовища має нижчі значення (рН 6,3–6,5),

ніж у середовищі Левенштейна-Єнсена (рН 7,2–7,4), і більшу стабільність. Ці властивості обумовлюють більш високу ефективність середовища при посіві матеріалу, обробленого лужними детергентами.

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

5.6.2 Приготування щільних живильних середовищ для культивування мікобактерій

Приготування якісних живильних середовищ – надважливий етап мікробіологічного дослідження до якого слід ставитись особливо уважно.

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

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

Усі реактиви, що використовують для приготування живильних середовищ, повинні мати ступінь очищення не менше категорії "хімічно чистий" (ХЧ).

Посуд для приготування живильних середовищ має бути досить великого об'єму, щоб було зручно перемішати середовище. Не слід готувати в одній ємкості більше 20,0 мл середовища.

При приготуванні середовищ необхідно використовувати хімічно чистий лабораторний посуд, а також свіжо приготовану дистильовану воду. Приготування середовища має чітко відповідати інструкціям.

Слід пам'ятати, що всі живильні середовища чутливі до нагрівання, тому не слід їх нагрівати довше, ніж того потребує процедура.

Неприпустимо відступати від методики приготування!

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

■ Приміщення, де готують живильні середовища, утримують в максимальній чистоті. Рекомендується регулярно мити підлогу з додаванням дезінфікуючого засобу, а також протирати дезінфектантом обладнання і робочі поверхні. Перед приготуванням середовищ необхідна обробка приміщення УФ-опромінювачем.

■ Використовувати тільки стерильний посуд.
■ Використовувати точно зважені кількості реагентів.
■ Правильно проводити приготування розчинів: використовувати мірний посуд, доводити об'єм розчину по нижній межі меніска.

■ Постійно контролювати температуру у згортувачі. Не допускати перегріву середовищ у згортувачі.

■ Строго дотримуватись вимог асептики.

■ Ретельно обробляти поверхню яєць перед їх розбиванням для

приготуванні яєчної маси

- Не піддавати готове середовище дії УФ-променів. Зберігати готові середовища у темному прохолодному місці.

- Проводити контроль якості кожної партії приготованих середовищ.

- Не економити при розливі середовища у пробірки, рекомендується розливати в пробірки по 5,0 мл середовища.

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

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

Середовище Левенштейна-Єнсена

Склад середовища

1) Розчин мінеральних солей:

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

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

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

2). Розчин малахітового зеленого:

Малахітовий зелений	– 2,0 г
Стерильна дистильована вода	– 100 мл

Приготування розчину вимагає великої акуратності, у зв'язку з тим, що порошок малахітового зеленого дуже летучий!

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

3). Яєчна маса.

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

Перш ніж почати роботу з чистими і сухими яйцями, рекомендується ретельно вимити руки з милом і щіткою. Потім в стерильному боксі розбивають яйця стерильним ножом в стерильний посуд, доводячи загальний об'єм яєчної маси до 10,0 мл (для цього потрібно в середньому 20–25 яєць в залежності від їх розміру).

Увага! Необхідна кількість яєчної маси визначається за об'ємом, а не по кількості яєць!

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

Приготування середовища

У велику стерильну ємкість, дотримуючи правила стерильності, поміщають наступні розчини:

- | | |
|---------------------------|------------|
| розчин мінеральних солей | – 600 мл; |
| гомогенізована яєчна маса | – 1000 мл. |

Суміш ретельно перемішують і фільтрують через стерильний марлевий фільтр, що має не менш 4 шарів марлі. Додають 20,0 мл розчину малахітового зеленого, ретельно перемішують, уникаючи утворення піни, і далі *протягом не більше 15 хвилин* розливають в пробірки приблизно по 5,0 мл, стежачи за тим, щоб в розчині не сформувався осад. *Не допускайте попадання піни в пробірки!*

Згортання середовища

Для згортання середовища використовуються спеціальні апарати – згортувачі. Пробірки з розлитим в них середовищем поміщають в спеціальні касети з підібраним кутом нахилу для формування косяка середовища заввишки 8–10 см. Штативи встановлюють в згортувач і проводять коагуляцію при 80–85 °С протягом 45 хвилин.

Увага! Згортання не є процедурою стерилізації, а лише коагуляції.

Стерильність середовища забезпечується стерильними умовами його приготування і розливу!

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

Зберігання середовища

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

Середовище Фінна-II

Склад середовища

1) Розчин мінеральних солей:

Магній сірчаноокислий $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,5 г
Натрій лимоннокислий $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 5,5\text{H}_2\text{O}$	– 1,0 г
Галун залізоамонійний $\text{Fe}(\text{NH}_4) \cdot (\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$	– 0,05 г
Калій однозаміщений фосфорнокислий KH_2PO_4	– 20,0 г
Амоній лимоннокислий однозаміщений $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}$	– 5,0 г
Натрій глютаміновоокислий однозаміщений $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	– 10,0 г
Гліцерин	– 20,0 мл
Вода дистильована	– до 1000 мл

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

2) Розчин малахітового зеленого.

3) Яєчна маса.

Див. аналогічні розділи в описі середовища Левенштейна-Єнсена.

Приготування середовища. Згортання середовища та зберігання.

Див. аналогічні розділи в опису середовища Левенштейна-Єнсена.

5.6.3 Внутрішньолабораторний контроль якості щільних живильних середовищ

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

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

Тест на стерильність

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

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

Тест на перевірку ростових якостей середовища

Необхідно проводити тестування ростових якостей кожної партії середовища за допомогою стандартного тест-штаму. Як тест-штам рекомендується використовувати лабораторний (музейний) штам *M. tuberculosis H₃₇Rv*. Для приготування суспензії цієї культури необхідно зробити змив з 4-тижневого косяка щільного середовища з рясним суцільним ростом, гомогенізувати суспензію за допомогою струшування з скляними намистами на струшувачі протягом 1 хвилини і приготувати декілька її розведень таким чином.

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

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

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

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

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

Реєстрація результатів контролю якості середовища

Результати контролю якості середовищ фіксують в журналі приготування середовищ. У журналі приготування середовищ повинні бути вказані: дата приготування середовища; об'єм приготованого середовища або кількість розлитих пробірок; 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 використовуйте партію середовища, якщо ріст на ньому гірше, ніж на попередній партії.

Питання до розділу:

1. *Перерахуйте основні живильні середовища, які широко використовуються у спеціалізованих бактеріологічних лабораторіях для культивування мікобактерій.*
2. *Яких правил потрібно дотримуватися при приготуванні живильних*

середовищ?

3. *Як контролюється якість приготованих середовищ у вашій лабораторії? Які зміни в процедуру внутрішньолaborаторного контролю посіву ви введете?*

5.6.4 Техніка посіву та інкубації на щільному середовищі

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

Процедура посіву

Робоче місце мікробіолога організовується так, щоб воно було зручне для оператора і дозволяло максимально виключити операторські помилки.

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

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

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

■ 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 рівні об'єми набраного матеріалу (приблизно по 0,5–0,6 мл) в 2 пробірки з різними щільними живильними середовищами.

■ Пробірки з живильним середовищем при посіві повинні знаходитися в похилому положенні (під кутом 40–45 °).

■ Посівний матеріал нанести на верхню третину косяка живильного середовища.

■ Засіяні пробірки закрити ватно-марлевими пробками і помістити у вертикальному положенні в штатив так, щоб посівний матеріал рівномірно розподілився по всій поверхні косяка живильного середовища; краще використовувати пробірки з кришками, що загвинчуються.

■ Залишок осаду забрати тією ж піпеткою і нанести на заздалегідь підготовлене і пронумероване предметне скло 2–3 краплі осаду для отримання мазка для мікроскопічного дослідження, розподіливши матеріал рівномірним шаром в центрі скла на площі приблизно 1,0 x 2,0 см.

■ Використану для посіву і приготування мазка піпетку опустити в ємкість з дезінфікуючим розчином.

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

пробки матеріалом посіву в разі використання ватно-марлевих пробок.

Інкубація

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

Оптимальна температура інкубації – 37 °С.

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

У процесі інкубації посівів необхідно дотримуватись наступного:

- у разі використання ватно-марлевих пробок після закінчення першої доби інкубації їх замінюють герметичними;
- пробірки переводять у вертикальне положення;
- інкубацію проводять протягом 10 тижнів при обов'язковому щотижневому перегляді пробірок з посівами;
- для полегшення процедури щотижневого перегляду і обліку, посіви, які виконані протягом одного дня, бажано розмішувати в окремих ящиках з матеріалу, який піддається обробці дезінфектантами і автоклавуванню, або штативах у порядку номерів реєстрації; кожен штатив або ящик слід супроводжувати етикеткою, на якій указується дата посіву, перший і останній реєстраційний номер партії.

5.6.5 Оцінка та облік результатів посівів діагностичного матеріалу на щільному середовищі

Оцінка результатів посіву

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

1. Спостереження за посівами і перегляд пробірок з посівами слід проводити щотижня.
2. За відсутності росту посіви повинні витримуватися в термостаті протягом 10 тижнів. Негативний результат бактеріологічного дослідження може бути виданий тільки після закінчення цього терміну інкубації.
3. Під час чергового перегляду слід відбирати всі пробірки, в яких є ріст колоній, розставляючи їх по порядку номерів реєстрації матеріалу.
4. При оцінці результатів реєструвати наступні параметри:
 - "появу росту" – дату появи росту в пробірках (в тому випадку, якщо ріст з'являється одночасно в обох пробірках). Якщо культура виросла тільки в одній з пробірок (при цьому є хороший ріст культури у відповідні терміни), а в другій ріст відсутній, рекомендується зареєструвати дату появи росту і показник росту в пробірці з культурою, що виросла, і використовувати її для подальшої роботи,

не чекаючи появи росту колоній в іншій пробірці. Другу пробірку залишають в термостаті для подальшої інкубації і за наявності в ній росту надалі реєструють отримані результати;

■ **"інтенсивність росту"** – число колоній, що вирости в кожній з пробірок. За наявності одночасного росту у всіх пробірках рекомендується оцінити кількість колонієутворюючих одиниць у кожній пробірці, що засіяна даним матеріалом. Цей показник має важливе діагностичне і прогностичне значення, особливо якщо посіви проводяться в динаміці спостереження за хворим в процесі хіміотерапії;

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

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

При цьому необхідно мати на увазі наступне:

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

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

■ **перш ніж дати негативну відповідь після 10 тижнів культивування**, необхідно переконатися у відсутності росту мікобактерій, що дуже повільно ростуть, в числі яких можуть бути і *M. tuberculosis*.

При оцінці результатів необхідно пам'ятати, що використовувані для посіву живильні середовища є збагаченим субстратом, який легко утилізується іншими мікроорганізмами. Це обумовлює високий ризик забруднення посівів різними бактеріями і грибами, колонії яких візуально важко відрізнити від мікобактерій.

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

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

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

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

Характеристика колоній *M. tuberculosis*

Вірулентні культури мікобактерій туберкульозу зазвичай ростуть на щільних живильних середовищах у вигляді R-колоній різної величини і вигляду, мають жовтуватий або злегка кремовий відтінок (колір слонової кістки), шорстку поверхню, що нагадує манну крупу або цвітну капусту. Колонії, як правило, сухі, зморшкуваті, але у разі дисоціації можуть зустрічатися і вологі, злегка пігментовані колонії, рожево-жовтий пігмент яких різко відрізняється від оранжевого або жовтого пігменту сапрофітних або деяких нетуберкульозних мікобактерій. Останні зазвичай ростуть в 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).

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

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

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

Нетуберкульозні і авірулентні сапрофітні мікобактерії можуть варіювати за формою колоній і морфологією клітин. Деякі з них грубіші, товщі, іноді менш інтенсивно забарвлені, рідко утворюють джгутоподібні скупчення ("корд-

фактор”, як правило, відсутній). Проте деякі види нетуберкульозних мікобактерій (фотохромогенні) можуть рости у вигляді характерної для мікобактерій туберкульозу R-формі. Багато нетуберкульозних і сапрофітних мікобактерій мають кислотостійкі зерна, схожі за морфологією з такими у вірулентних мікобактерій туберкульозу.

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

Облік результатів посіву

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

- поява росту колоній на щільних живильних середовищах не раніше, ніж через 3–4 тижні інкубації,
- наявність колоній характерної морфології і забарвлення,
- мікроскопічне підтвердження кислотостійкості виділеного мікроорганізму при забарвленні за методом Ціля-Нільсена, – слід провести кількісну оцінку інтенсивності росту.

Всі характеристики мікобактерій, що вирости на щільних живильних середовищах, заносяться в лабораторний журнал обліку результатів культуральних досліджень, в бланки відповідей, а також у картотеку. За наявності комп'ютерної бази даних поосібного обліку результати дослідження зберігаються і в електронному форматі.

Питання:

1. Опишіть робоче місце мікробіолога для проведення процедури посіву.
2. Перерахуйте послідовність дій при проведенні процедури посіву.
3. Перерахуйте основні правила інкубації посівів.
4. Охарактеризуйте типові колонії *M. tuberculosis*. Яким чином можна підтвердити належність колоній культури, що вирости, до роду *Mycobacterium*; до комплексу *M. tuberculosis*?
5. Як проводиться оцінка і облік результатів посіву?

5.6.6 Дослідження з використанням рідких живильних середовищ

5.6.6.1 Автоматичні та напівавтоматичні аналізатори

Необхідність впровадження нових методів сучасної і якісної мікробіологічної діагностики туберкульозу очевидна, оскільки використання традиційних методик не завжди дозволяє отримати своєчасні, інформативні та надійні результати.

Основним недоліком класичного методу виділення мікобактерій на щільних середовищах є його тривалість. Скорочення термінів культивування мікобактерій із збереженням або збільшенням чутливості та специфічності методу є основним напрямком розвитку мікробіологічної діагностики туберкульозу.

До теперішнього часу мікобактеріологічна лабораторія пройшла кілька етапів на шляху скорочення термінів бактеріологічної діагностики туберкульозу, починаючи з практичного використання у 80-х роках минулого століття принципово нового радіометричного методу виявлення росту і визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів за допомогою системи BACTEC 460, розробленої компанією Becton Dickinson (BD).

Відомо, що рідкі середовища (або бульйони) забезпечують більш швидке отримання результату порівняно з щільними. Фаза логарифмічного росту популяції мікобактерій досягається вже до 5–10-го дня після інокуляції в бульйон матеріалу від хворого на туберкульоз. У той же час застосування рідких середовищ ускладнюється трудомістким процесом власної детекції розмноження мікобактерій, а також високим рівнем їх контамінації іншими мікроорганізмами.

Еволюція методів культивування мікобактерій у рідких середовищах відбувалася в напрямку розробки відносно дешевого і технічно доступного методу швидкої детекції, що здійснюється з найбільшим ступенем біозахисту персоналу.

У 1977 р. G. Middlebrook описав спосіб радіометричної детекції росту мікобактерій в селективному рідкому середовищі, що поклало початок створення найбільш поширених і комерційно доступних систем бульйонного культивування: BACTEC 460 (BD), BBL Septi-Chek AFB (BD), BBL MGIT (BD), BACTEC MGIT 960 (BD), MB/BacT (Organon Teknika) і BacT/Alert 3D (BioMérieux).

Напівавтоматична система BACTEC 460 для вирощування та ідентифікації мікобактерій використовує рідке середовище Middlebrook 7H12. Ріст мікобактерій в ньому визначається шляхом реєстрації рівня міченого CO₂, що утворюється в процесі мікробної утилізації субстрату з пальмітиновою кислотою, що містить радіоактивний ¹⁴C. Впровадження BACTEC 460 дозволило скоротити терміни виявлення збудника туберкульозу до 14 днів, а також проводити швидку ідентифікацію комплексу *M. tuberculosis* і визначати чутливість мікобактерій до медикаментозних препаратів.

В індустріально розвинених країнах система BACTEC 460 отримала широке розповсюдження і стала своєрідним референс-методом для новостворюваних систем бульйонного культивування. Золотим діагностичним стандартом для практичних лабораторій є поєднання подібної системи з щільними середовищами, що дозволяє досягти кращих результатів як за термінами, так і за ефективністю культурального виявлення мікобактерій.

Відображенням цього принципу є розроблена надалі, оригінальна і досить проста мануальна двофазна система BBL Septi-Chek AFB, об'єднуюча в єдине ціле флакон з рідким середовищем і косяки щільних середовищ.

Крім рідкої фази, бульйону Middlebrook 7H9, в системі BBL Septi-Chek AFB присутні три щільні середовища: неселективний агар Middlebrook 7H11, яєчне середовище Левенштейна-Єнсена і шоколадний агар, які формують щільну фазу в атмосфері, збагаченої CO₂. Посівний матеріал інокують в

бульйон, що заповнює флакон у нижній частині системи. Щодня вручну флакон перевертають, щоб бульйон обмивав косяки. Крім мікобактерій на середовищах даної системи можуть рости і інші мікроорганізми. Швидкість росту мікобактерій туберкульозу на Septi-Chek AFB вище, ніж на ізольованому щільному середовищі, але трохи нижче, ніж на системі BACTEC 460.

При очевидних перевагах, радіометрична система BACTEC 460 має ряд недоліків – таких, як напівавтоматичний моніторинг росту культури, значна трудомісткість операцій, робота з радіоізотопами і необхідність утилізації радіоактивних відходів. Для їх подолання була запропонована більш досконала технологія флуоресцентної реєстрації росту мікроорганізмів, яка лягла в основу розробки мануальної (неавтоматизованої) системи BBL MGIT (BD), що з'явилася в лабораторіях з 1994 року.

Пробірка MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube), крім 4,0 мл модифікованого середовища Middlebrook 7H9, містить у придонній частині під силіконом флуоресцентний індикатор – тріс-4,7-дифеніл-1,10-фенантролін рутеніум хлорид пентагідрат, "погашений" високими концентраціями кисню.

В процесі споживання виростаючими клітинами розчиненого в середовищі O₂ індикатор починає світитися у променях джерела ультрафіолетового опромінення. Збільшення мікробної популяції супроводжується посиленням світіння, інтенсивність якого можна оцінити за допомогою транслюмінатора або портативного світловимірювального приладу Micromgit.

Відносно недорога і компактна система BBL MGIT, призначена для швидкої культуральної діагностики мікобактеріозів і визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів, може бути використана як експрес-метод, при польових випробуваннях, в умовах обмежених ресурсів. Надалі описаний принцип флуоресцентної детекції росту був використаний при розробці повністю автоматизованої системи бульйонного культивування мікобактерій BACTEC MGIT 960 (BD), яка є найбільш досконалою серед існуючих аналогічних систем, широко поширена в лабораторіях всього світу.

Одна з комерційно доступних автоматизованих систем MB/VacT була запатентована голландською фірмою Organon Teknika у 1995 р. на базі VacT/ALERT – системи для автоматичного тестування біо- і гемокультур.

Для визначення росту мікобактерій в системі MB/VacT використовується технологія колориметричного CO₂-детектування. Унікальні MB/VacT-флакони зі штрих-кодом містять придонний сенсор, зміна кольору якого спостерігається при закисленні середовища внаслідок мікробного метаболізму, що реєструється комп'ютером, який аналізує та інтерпретує дані.

Система MB/VacT складається з декількох інкубаторно-детекторних модулів (до 9), керованих одним комп'ютером. Місткість одного MB/VacT-модуля становить 240 або 120 пробірок. Культуральний флакон MB/VacT, так як пробірка MGIT, містить бульйон Middlebrook 7H9, який перед посівом діагностичного матеріалу збагачують живильними речовинами, антиоксидантами і альбуміном, що зв'язує токсини, які утворюються у процесі росту мікроорганізмів. Для придушення контамінуючої мікрофлори, аналогічно системі MGIT, що використовує суміш бактеріостатичних препаратів PANTA, в

бульйон додають розчин, що містить поліміксин, амфотерицин, налідиксову кислоту, триметоприм, азлоцилін. Особливістю MB/VacT-флакона є закріплена гумова пробка, через яку голкою зі шприцом інокуюють посівний матеріал, що також дозволяє захистити рідке середовище від забруднення. Після внесення досліджуваного зразка флакони поміщають в інкубаторно-детекторні блоки. Коли в 1,0 мл середовища кількість колоній утворюючих одиниць починає перевищувати 10^6 , звуковий сигнал, що супроводжується появою інформації на дисплеї, вказує на завершення дослідження.

У переважній більшості випадків позитивний результат, що свідчить про ріст МБТ, реєструється системою протягом 2–3 тижнів. При негативному результаті видалення флаконів з інкубатора здійснюють через 42 доби.

Іншим, більш досконалим представником вищезазначених систем є система нового покоління VacT/ALERT 3D, яку представляє компанія BioMerieux. Крім виявлення росту мікобактерій система призначена також для визначення бактерій і грибів в гемокультурах.

Прилад має контрольний модуль, під керуванням якого можуть перебувати до 6 інкубаційних модулів, розрахованих на 60, 120 або 240 лунок для процесорних флаконів. Інкубаційний модуль складається з висувних секцій, які мають по три блоки на 20 лунок кожен. При включенні шейкера для стимуляції росту модуль працює в режимі отримання гемокультури. При відключенні шейкера і використанні спеціальних програмних алгоритмів для повільно ростучих мікроорганізмів, модуль працює в режимі культивування мікобактерій. В системі VacT/ALERT 3D для отримання бульйонної культури мікобактерій застосовують процесорні флакони із середовищем Middlebrook 7H9, такі ж, як у системі MB/VacT.

Значним кроком у розвитку прискорених методів бактеріологічного виявлення мікобактерій стала інноваційна система BACTEC MGIT 960 (BD), що з'явилася в лабораторіях в середині 90-х років минулого століття. Вона являє собою повністю автоматизований комплекс для одночасної інкубації та моніторингу 960 пробірок. Культивування мікобактерій здійснюється в індикаторній пробірці MGIT, що містить 7,0 мл модифікованого середовища Middlebrook 7H9. Дана система дозволяє виявляти у клінічних зразках більшість штамів МБТ протягом 10–20 днів і визначати чутливість культури збудника до медикаментозних препаратів в термін, що не перевищує двох тижнів.

Слід підкреслити, що BACTEC MGIT 960 є єдиною повністю автоматизованою системою для визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів, яка забезпечує прискорене тестування культури до практично усіх препаратів, в тому числі і до піразинамиду.

Як показали численні випробування, впровадження діагностичного ланцюжка, що включає, крім традиційних щільних середовищ, систему BACTEC MGIT 960, удвічі скорочує час отримання культури і визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів, збільшує частоту виявлення збудника в олігобацилярному матеріалі від хворих на туберкульоз, а

також підвищує точність і повторюваність результатів мікробіологічного дослідження.

5.6.6.2 Основні принципи культивування мікобактерій на рідких живильних середовищах

Враховуючи істотні трудовитрати персоналу при виконанні процедур дослідження, а також досить високу вартість витратних матеріалів, мікробіологічні дослідження діагностичного матеріалу з використанням автоматизованих систем бульйонного культивування рекомендується проводити в наступних випадках:

- для диференціальної діагностики туберкульозу;
- вперше виявленим хворим на туберкульоз (1 категорія);
- хворим з поширеним і гостро прогресуючим туберкульозним процесом;
- при рецидивах туберкульозу (2 категорія);
- діти (3 категорія).

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

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

Виявлення мікобактерій з використанням автоматизованої 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 необхідно для більш повного задоволення живильних потреб мікобактерій, які можуть дати ріст лише на одному із середовищ. Цей принцип дозволяє також уникнути деяких помилок, пов'язаних з технічними похибками, неправильною інтерпретацією росту в позитивній пробірці.

З метою підтвердження належності культури, що виросла на рідкому середовищі будь-якого аналізатора, до комплексу МБТ **необхідно проводити бактеріоскопію за Цілем-Нільсеном і субкультивування на щільному яєчному середовищі вмісту позитивної процесорної ємкості**. Використання ПЛР-аналізу з метою диференціювання комплексу МБТ і НТМБ при отриманні позитивних результатів на автоматизованій системі може на 7 і більше днів скоротити час бактеріологічної діагностики туберкульозу.

5.6.6.3 Застосування автоматизованої системи MGIT 960 для бактеріологічної діагностики туберкульозу

Матеріально-технічне забезпечення методу

Прилад BACTEC MGIT 960 працює на принципах технології MGIT: індикаторні пробірки після внесення у них діагностичного матеріалу інкубуються у приладі, і періодично піддаються УФ-тестуванню.

Прилад важить 351 кг, його розміри невеликі (92x135x85см), спеціальних умов для його розміщення в лабораторії не потрібно. Він складається з трьох секцій, що вміщують по 320 пробірок кожна, таким чином, максимальне одночасне завантаження приладу – 960 пробірок. Контроль за внесенням до індикаторної пробірки матеріалом здійснює вбудований у прилад комп'ютер. Рідкокристалічний дисплей і спеціальні індикатори на кожній секції дають інформацію про наявність позитивних і негативних посівів.

Важливим компонентом системи BACTEC MGIT 960 є пробірка MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) з флуоресцентним індикатором, світіння якого погашене киснем. Мікробна популяція, що розмножується, активно поглинає кисень, вивільняючи флуоресцентний компонент, який починає світитися в промені ультрафіолетового світла.

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

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

Реагенти і витратні матеріали

Більшу частину необхідних реагентів і аксесуарів можна замовити за каталогом фірми Becton Dickinson (BD).

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

Пробірки призначені для культивування мікобактерій з використанням приладу BACTEC 960. У кожній пластиковій пробірці з кришкою, що загвинчується, міститься 7,0 мл середовища Міддлбука 7H9, яке перед інокуляцією збагачується живильними добавками і антимікробними речовинами для запобігання контамінації. Інокулятом можуть служити заздалегідь оброблені (розріджені, деконтаміновані і концентровані) клінічні зразки, за винятком сечі, стерильні біологічні рідини (виключаючи кров) і культури мікобактерій. Пробірки також призначені для визначення медикаментозної чутливості мікобактерій, за виключенням піразинаміду. Пробірки поставляються у картонній коробці, що містить 100 пробірок. Температура зберігання 2–25 °С.

MGIT 960 Supplement (Додатковий набір)

Набір включає 6 флаконів з 15,0 мл ростової добавки OADC, що містить олеїнову кислоту, бичачий альбумін, глюкозу і каталазу, а також 6 флаконів з ліофілізованою сумішшю антибіотиків PANTA, що містять поліміксин Б, амфотерицин Б, налідиксову кислоту, триметоприм і азлоцилін. Кожен набір розрахований приблизно на 100 пробірок, температура зберігання 2–25 °С.

MGIT 960 SIRE Kit

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

BACTEC MGIT 960 PZA Kit

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

Пробірки MGIT 960 PZA

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

MycPrep

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

- 10 флаконів (по 75,0 мл або по 150 мл) 2,0 % розчину гідроксиду натрію (NaOH), причому в кожному флаконі міститься скляна ампула з

порошкоподібним муколітиком N-ацетил-L-цистеїном (NALC);

- 5 пакетів фосфатного буфера.

Безпосередньо перед використанням розчину NALC-NaOH (перед додаванням його в рівному об'ємі до досліджуваного зразка) ампулу слід роздавити усередині флакона. Кожен пакет з солями для фосфатного буфера розчиняють в 0,5 л очищеної води і заздалегідь стерилізують автоклавуванням. Температура зберігання набору 15–20 °С.

Реагенти для обробки клінічних зразків можна приготувати в умовах лабораторії

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

- гідроксид натрію (NaOH) 20,0 г
- цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 14,5 г

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

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

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

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

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

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

Опис методу

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

Підготовка матеріалу для посіву

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

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

- щільно закрити кришку, змішати вміст пробірки струшуванням або за

допомогою вортексу 15–30 сек, прагнучи досягти повного розрідження, і залишити на 15 хв. при кімнатній температурі для де контамінації, перевертати для змішування кожні 5 хв.;

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

- центрифугувати зразок протягом 20 хв. при 3000 g, залишити в ШББ на 5 хв. для осадження аерозолів;

- видалити надосадову рідину;

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

Використовувати отриманий матеріал для:

- 1) посіву в пробірки MGIT;
- 2) посіву на щільне середовище;
- 3) приготування мазків.

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

Посів діагностичного матеріалу в пробірки MGIT

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

- зняти кришку, що відкручується, з пробірки MGIT;
- додати вміст флакона із збагачувальною добавкою MGIT (Growth supplement) (15,0 мл) у флакон з ліофілізованими антибіотиками PANTA;
- перенести 0,8 мл отриманої суміші в пробірку MGIT;
- внести 0,5 мл осаду діагностичного матеріалу до пробірки MGIT і паралельно провести посів 0,2–0,5 мл матеріалу на щільне середовище Левенштейна-Єнсена або Фінна-П та нанести каплю на предметне скло, яке промарковане заздалегідь;
- переконавшись, що пробка пробірки щільно закручена, перевернути для перемішування вмісту та провести завантаження пробірки в прилад BACTEC 960 відповідно до інструкції з експлуатації.

Інкубація пробірок у системі

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

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

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

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

5. При появі інформації про позитивний результат необхідно відкрити вказаний ящик, натиснути кнопку «positive», що з'явилася на екрані, витягнути відповідну пробірку з гнізда (замість червоної індикації, що вказувала

безпосередньо на місце «позитивної» пробірки, з'являється зелена, що вказує на гніздо, що звільнилося) і відсканувати штрих-код.

6. Пробірки, у яких не зафіксовано приладом ріст 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.

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

Оцінка результатів культивування на автоматизованій системі

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

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

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

- Провести субкультивування на щільне яєчне 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 МБТ і нетуберкульозних мікобактерій.

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

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

Порядок видачі результату

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

- позитивний сигнал приладу + наявність мікроколоній у вигляді "кіс" при бактеріоскопії, позитивної проби, забарвленої за Цилем-Нільсеном;

- позитивний сигнал приладу + кислотостійкі бактерії при бактеріоскопії + характерний ріст колоній на щільному середовищі + відсутність росту на

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

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

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

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

Гарантований **негативний результат** росту МБТ на автоматизованих системах видається на 42-й день після перегляду посіву на щільному середовищі. За наявності ознак можливого росту МБТ на щільному середовищі (наприклад, є колонії у вигляді пластівців у рідкій фазі над косяком) негативна відповідь видається за результатами росту мікобактерій на щільному середовищі через 12 тижнів (84 дні).

Контроль якості виконується при отриманні кожної нової партії пробірок з використанням колекційних штамів мікобактерій: *M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. kansasii* ATCC 12478 і *M. fortuitum* ATCC 6841. Контроль якості можливо проводити за допомогою інших лабораторних штамів. Зокрема, штам *M. tuberculosis* H₃₇Rv (при посіві в пробірку MGIT 0,5 мл мікробної суспензії, приготованої по 0,5 стандарту McFarland і розведенню 1:100) повинен дати ріст, підтверджений позитивним сигналом BACTEC 960, на 7–9-й день після внесення до приладу.

Контамінація при використанні системи MGIT і її попередження

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

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

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

- додати рівний об'єм стерильного 4,0 % розчину NaOH і провести

обробку за методом Петрова;

- зробити посів на щільне яєчне середовище.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.7 Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу, видова ідентифікація мікобактерій

5.7.1 Попередня ідентифікація комплексу *M. tuberculosis* (родова ідентифікація)

Алгоритм первинної ідентифікації комплексу *M. tuberculosis*

У бактеріологічних лабораторіях II–III рівнів має проводитися визначення належності виділених або доставлених культур мікроорганізмів.

Основою ідентифікації є такі характеристики:

- швидкість росту бактерій – більше 10 днів;
- морфологія і забарвлення колоній;
- результати дослідження мазків, приготованих з виділеної культури і забарвлених за методом Ціля-Нільсена.

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

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

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

Колонії більшості НТМБ морфологічно не схожі з МБТ. 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 МБТ. Забарвлення колоній НТМБ може бути від білого, тілесного і кремового кольору до світло-жовтого, жовтого і помаранчевого. Ріст культури НТМБ може бути пишним або таким, що стелиться, і має випіт – дисгонічним.

Морфологічно колонії споріднених мікроорганізмів відрізняються від колоній МБТ, проте деякі види нетуберкульозних мікобактерій (фотохромогенні) можуть рости у вигляді характерної для мікобактерій туберкульозу R-формі. Оскільки НТМБ також можуть викликати захворювання людини (мікобактеріози), вони також підлягають вибору для подальшої ідентифікації.

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

Методика виконання

1. Приготувати мазки із всіх культур, відібраних при перегляді посівів.
2. Забарвити мазки за методом Ціля-Нільсена.
3. Провести мікроскопію мазків.

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

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

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

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

На підставі морфології колоній і позитивного забарвлення мазка з культури видається попередня відповідь про виділення *M. tuberculosis*.

Група споріднених мікроорганізмів (нокардії, родококи та ін.) відрізняється частковою або слабкою кислотостійкістю. У мазку можна одночасно зустріти 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 (таблиця 2).

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 і коринебактерії добре сприймають забарвлення за Грамом – грампозитивні.

Таблиця 2

Характеристика мікобактерій і споріднених таксонів

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

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

і значний поліморфізм при мікроскопічному дослідженні мазка. Нокардії і родококи не мають важливого клінічного значення і можуть вивчатися в наукових лабораторіях.

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

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

5.7.2 Диференціація *M. tuberculosis complex* від нетуберкульозних мікобактерій

Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу від нетуберкульозних мікобактерій повинна проводитися в лабораторіях 2-го і 3-го рівнів. Культури, віднесені за морфологічними властивостями до мікобактерій туберкульозного комплексу, необхідно диференціювати від нетуберкульозних мікобактерій.

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

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

Слід з особливою увагою видавати відповідь на вперше виділену культуру з діагностичного матеріалу від дітей, оскільки лікар несе велику відповідальність за видачу хибнопозитивного результату дослідження у дитини.

Ідентифікація мікобактерій туберкульозного комплексу і НТМБ заснована на їх культуральних властивостях і здатності росту на диференційно-діагностичних середовищах.

Бактеріологічна характеристика мікобактерій туберкульозу:

1. На середовищі Левенштейна–Єнсена утворюють сухі колонії з нерівними краями, кольору слонової кістки.
2. Ріст тільки при 35–37 °С.
3. Ріст на щільних живильних середовищах не раніше 3 тижнів. Ріст

субкультури може з'явитися через 10–14 днів.

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

Диференційно-діагностичні середовища

Середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл саліциловокислого натрію

Реактиви.

1. Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).
2. Натрій саліциловокислий – 50,0 мг.

Методика приготування.

До наважки натрію саліциловокислого 50,0 мг додати 1,0 мл етилового спирту для дезінфекції, 2,0 мл стерильної дистильованої води та 97,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена до згортання. Ретельно розмішати. Середовище з вмістом 500 мкг/мл саліциловокислого натрію розлити в пробірки по 5,0 мл і згортувати при 85 °С протягом 45 хв.

Середовище Левенштейна-Єнсена з 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти (ПНБК)

Реактиви.

1. Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).
2. Паранітробензойна кислота – 50,0 мг.
3. 4,0 % розчин їдкого натру.
4. 10,0 % розчин соляної кислоти.

Методика приготування.

Наважку ПНБК (50,0 мг) ретельно розтерти в стерильній ступці, додати 1,0 мл етилового спирту, 4,0 мл дистильованої стерильної води і 20–24 краплі 4,0 % розчину їдкого натру до отримання рН 8,0 (за індикаторним папірцем). За допомогою 10,0 % розчину соляної кислоти 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 паранітробензойної кислоти розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 45 хв.

Середовище з тіоацетазоном (тібоном)

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

Реактиви.

1. Тіоацетазон (тібон) – 10,0 мг.
2. Етиловий спирт 96 °.
3. Середовище Левенштейна-Єнсена – 100 мл (до згортання).

Методика приготування.

Готують розчин тіоацетазону з 1000 мкг/мл препарату. Для цього до наважки 10,0 мг тібону, висипаної у пробірку, додають 1,0 мл етилового спирту і 9,0 мл стерильної дистильованої води, отримують розведення 1000 мкг/мл.

1,0 мл цього розведення додають до 99,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена, одержують концентрацію тібону 10,0 мкг/мл і розливають у пробірки по 5,0 мл. Середовище в пробірках згортають в скошеному вигляді при 85 °С протягом 30 хв.

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

Мікобактерії туберкульозного комплексу не ростуть на середовищах із саліциловокислим натрієм та паранітробензойною кислотою, а також з тіоацетазоном (тібоном) і ця властивість служить для диференціації M. tuberculosis та M. bovis від нетуберкульозних мікобактерій.

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

Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl

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

Інгредієнти.

1. Натрій хлористий (хімічно-чистий).
2. Сольова основа середовища Левенштейна-Єнсена.
3. Яєчна суміш середовища Левенштейна-Єнсена.

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

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

Диференціальна діагностика мікобактерій туберкульозного комплексу і нетуберкульозних мікобактерій надана в табл. 3.

Таблиця 3

Диференціальна діагностика мікобактерій туберкульозного комплексу і нетуберкульозних мікобактерій

Властивість культури	<i>Мікобактерії туберкульозного комплексу</i>	<i>Нетуберкульозні мікобактерії</i>
Поява видимих колоній протягом 1 тижня	–	±
Пігментація колоній	–	±
Строгі мезофіли (ріст тільки при 35–37 °С)	+	–
Ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм	–	+
Ріст на середовищі з ПНБК	–	+
Ріст на середовищі з тіоацетазоном (тібон)	–	+
Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl	–	±

На підставі відсутності росту на діагностичних середовищах з саліциловокислим натрієм або ПНБК, утворення сформованих не пігментованих колоній протягом 3–4 тижнів при температурі 37 °С досліджену культуру можна віднести до мікобактерій туберкульозного комплексу.

Виявлення корд-фактора

Крім росту на цих середовищах, використовують здатність мікобактерій по-різному рости на рідких живильних середовищах. Нетуберкульозні мікобактерії ростуть дифузно у вигляді кучок, на відміну від істинних туберкульозних мікобактерій, що ростуть плівкою, або придонно, мають корд-фактор і ростуть у вигляді “кіс”, “джгутів”, “вусів” – у тісному переплетенні окремих паличок одна з одною. Це може служити диференціальною ознакою. Проте, стійкі до препаратів групи ГІНК мікобактерії туберкульозу цілком або частково втрачають корд-фактор. Тому для диференціації туберкульозних культур від нетуберкульозних визначення корд-фактору треба використовувати в комплексі з іншими тестами.

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

5.7.3 Видова ідентифікація мікобактерій туберкульозного комплексу

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

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

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

Визначення ніацину (ніациновий тест)

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

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

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

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

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

Приготування реактивів.

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

2. 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).

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

4. Індикаторні смужки готують із фільтрувального паперу Filtrak 11. Один кінець смужки, розміром 60 х 8 мм, позначають простим олівцем. Пастерівськими піпетками на папір наносять по одній краплі щойно приготовлених реактивів у наступному порядку: 20,0 % розчин ПАСК – на позначений олівцем кінець, 60,0 % розчин роданистого калію – посередині смужки і 50,0 % розчин хлораміну «Б» – на інший кінець. Між краплями повинні залишатися сухі проміжки. Папірці висушують при кімнатній температурі в темряві протягом 24 годин, після чого зберігають їх у холодильнику в пробірках, що загвинчуються, або закритих гумовими корками. Індикаторні смужки залишаються активними протягом 3-х місяців. Для одержання більш чіткої реакції рекомендується наносити повторно 1 краплю хлораміну "Б" на вже висохлу краплю.

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

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

Індикаторну смужку поміщають кінцем, поміченим олівцем, у пробірку з 0,6 мл досліджуваного екстракту мікобактерій. Пробірку закривають пробкою та витримують при кімнатній температурі, періодично струшують, поки вся смужка не просочиться екстрактом. При позитивному ніациновому тесті через 15–30 хвилин рідина забарвлюється в яскраво-жовтий колір. Дегазація пробірки після проведення реакції здійснюється шляхом додавання 10,0 % розчину нашатирного спирту.

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

В даний час існують комерційні набори готових паперових смужок, крапельних наборів для проведення ніацинового тесту, що значно його спрощує і стандартизує (наприклад, BD, DIFCO та ін.).

Необхідно пам'ятати, що ряд нетуберкульозних мікобактерій – *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 МБТ, виділені від хворих, які тривалий час одержують протитуберкульозні препарати, слабо продукують ніацин. У подібних випадках необхідно повторити тест. Культуру пересіяти, щоб одержати пишний ріст і використати для тестування 3–4-тижневу культуру.

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

Визначення нітратредуктази

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

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

Реактиви.

1. 0,067 М фосфатний буфер (рН-7,1), що містить 0,1 % нітрату натрію.
2. 2,0 % розчин (вага/об'єм) пара-диметиламінобензальдегіду в 10,0 % НСІ.
3. 10,0 % розчин соляної кислоти.

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

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

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

Визначення здатності росту культури на середовищі з гідратид тіофен-2-карбоксилічною кислотою (ТСН)

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

Реактиви.

1. Середовище Левенштейна-Єнсена – 600 мл (до згортання).
2. Гідратид-тіофен-2-карбоксилічної кислоти.
3. Приготувати наважку ТСН 20,0 мг, розчинити у 20,0 мл стерильної дистильованої води. Одержали розведення 1000 мкг/мл. Розчин А.
4. До 12,0 мл стерильної дистильованої води додати 3,0 мл розчину А. Отримали розведення 200 мкг/мл. Розчин Б.
5. Приготування середовища Левенштейна-Єнсена з ТСН:
 - а) розведення – 199 мл середовища + 1,0 мл розчину Б – розведення 1,0 мкг/мл;
 - б) розведення – 195 мл середовища + 5,0 мл розчину Б – розведення 5,0 мкг/мл;

в) контрольна пробірка з середовищем без реактиву.

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

Методика виконання.

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

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

Визначення здатності до росту на середовищі з нікотинамідом

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

Реактиви.

1. Середовище Левенштейна-Єнсена (до згортання).

2. Нікотинамід.

3. Приготування основного розчину нікотинаміду:

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

4. Приготування робочого розчину:

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

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

5. Приготування середовища з нікотинамідом:

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

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

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

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

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

Визначення чутливості до циклосерину

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

Реактиви.

1. Середовище Левенштейна-Єнсена (200 мл до згортання).
2. Циклосерин.
3. Наважку циклосерину 20,0 мг розчинити в 5,0 мл дистильованої води, розведення 4000 мкг/мл.
4. До 99,0 мл середовища Левенштейна-Єнсена додати 1,0 мл приготованого розчину. Кінцева концентрація препарату – 40,0 мкг/мл.
5. Одночасно приготувати 100 мл контрольного середовища.
6. Досліджуване і контрольне середовища розлити в пробірки по 5,0 мл, згортувати при температурі 85 °С протягом 45 хв.

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

M. tuberculosis і *M. bovis* чутливі до циклосерину, вакцинний штам BCG росте на середовищі з циклосерином. У табл. 4 приведено 7 методів, які дозволяють диференціювати *M. tuberculosis* і *M. bovis*.

Диференціація мікобактерій за окисно-відновними ферментами

У окисно-відновних процесах мікробної клітини активну участь приймають такі ферменти, як каталаза і пероксидаза. У *M. tuberculosis* і *M. bovis*, чутливих до препаратів групи ГІНК (гідразида ізонікотинової кислоти), виявляється активність обох ферментів паралельно. При цьому у чутливих культур спостерігається швидке активне виділення пухирців кисню, обумовлене діяльністю каталази, і забарвлення колоній у темно-коричневий колір, обумовлене діяльністю пероксидази. Поява коричневого пігменту пояснюється переходом пірогалолу в пурпурогалин в присутності перекису

Таблиця 4

Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу

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

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

водню під впливом пероксидази. У культур *M. tuberculosis*, стійких до препаратів групи ГІНК, активність цих ферментів різко знижена, при

визначенні каталазної активності пухирці кисню виділяються в невеликій кількості, повільно або майже відсутні, а при визначенні активності пероксидази колонії або ледь забарвлюються, або (при високому ступені стійкості до ізоніазиду) залишаються безбарвними. На відміну від *M. tuberculosis*, у нетуберкульозних мікобактерій, незалежно від стійкості до ГІНК, каталазна активність завжди різко позитивна, пероксидазна ж, як правило, не виявляється.

Визначення каталазної і пероксидазної активності одночасно

(модифікована методика Богена)

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

Реактиви.

1. 0,5 % пірогалол: 50,0 мг чистого пірогалолу розчинити в 10,0 мл дистильованої води.

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

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

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

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

Ступінь активності каталази позначають по 3-бальній системі:

- (3+) ясне виділення пухирців кисню в 1-шу хвилину;
- (2+) помірне виділення пухирців кисню;
- (1+) поодинокі пухирці.

При відсутності пухирців реакція вважається негативною (–).

Активність пероксидази оцінюється також по 3-бальній системі:

- (3+) темно-коричнєве забарвлення колоній;
- (2+) коричнєве забарвлення колоній;
- (1+) блідо-коричнєве забарвлення колоній.

При негативній реакції колір колоній не змінюється.

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

Термостабільність каталази

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

Визначення активності термостабільної каталази

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

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

Співвідношення окисно-відновних ферментів у різних видів мікобактерій показано в табл. 5.

Реакція гідролізу твіну-80

Важливою реакцією для ідентифікації мікобактерій всередині II і III груп (за Раньоном), є реакція гідролізу твіну-80. Твін-80 зв'язує нейтральний червоний, і суміш до реакції має солом'яно-жовтий колір. Принцип реакції – у ензимному гідролізі твіну-80. При цьому відбувається звільнення нейтрального

Таблиця 5

Ідентифікація мікобактерій по окисно-відновним ферментам і ніациновій пробі

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

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

Реактиви.

1. 1/15 М фосфатний буфер (рН=7) – 100,0 мл.
2. Твін-80 – 0,5 мл.
3. 0,1 % основний нейтральний червоний – 2,0 мл. Краще розчинити 0,1 г нейтраль-рот не в 100,0, а в 85,0 мл дистильованої води.

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

Хід дослідження. Емульгують 3 бактеріологічні лопатки культури в пробірках із приготованим субстратом (Твін-80 із нейтральним червоним). Пробірки поміщають у термостат. Реакцію перевіряють через 4 години, на 5-у і

10-у добу. Тест вважається позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до 10-ої доби, негативним, якщо забарвлення не з'явилося (модифікована методика Вайна). Контролем є пробірка з середовищем без реактивів.

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

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

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

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

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

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

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

5.7.4 Ключові тести і схеми ідентифікації мікобактерій

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

Види мікобактерій	Тести	Результати тесту, властиві для даного виду мікобактерій
<i>M. tuberculosis</i>	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	+
	Відновлення нітратів	+

	Каталаза при 68 °С.	–
	Утворення пігменту в темряві	–
	Ріст на середовищі з 500 мкг/мл ПНБ	–
M. bovis	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Каталаза при 68 °С	–
	Утворення пігменту в темряві	–
	Ріст на середовищі з 500 мкг/ мл ПНБ	–
M. kansasii	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	+
	Каталаза при 68 °С	+
	Утворення пігменту після освітлення	+
	Гідроліз твіну-80	+
M. scrofulaceum	Швидкість росту	Повільний
	Каталаза при 68 °С	+
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	–
M. gordonae (M. aquae)	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення нітратів	–
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	+
M. xenopi	Швидкість росту	Повільний
	Відновлення	–
	нітратів	
	Утворення пігменту в темряві	+
	Гідроліз твіну-80	–
M. avium	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–
	Відновлення нітратів	–
	Гідроліз твіну-80	–
M. intracellulare	Швидкість росту	Повільний
	Ніацин	–

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

Крім перерахованих тестів, для усіх безпігментних культур необхідно вивчати ніацинову пробу, і якщо вона негативна, перевіряти амідазну активність. Використання описаних тестів дає можливість розділити нетуберкульозні культури на патогенні для людини і випадкові супутні сапрофіти, які не впливають на захворювання. Для клініки особливе значення мають наступні види нетуберкульозних мікобактерій: ***M. kansasii***, ***M. marinum***, ***M. scrofulaceum***, ***M. xenopi***, ***M. avium***, ***M. intracellulareae***, ***M. fortuitum***.

Для нетуберкульозних мікобактерій, крім вказаних нами особливостей (швидкості росту, пігментоутворення, морфології колоній і паличок, температурного оптимуму), характерними є: негативна ніацинова проба, відсутність пероксидазної активності при високій активності каталази, виражена термостабільність каталази у більшості мікобактерій, ріст на

живильних середовищах із паранітробензойною кислотою і саліциловокислим натрієм, відсутність у більшості випадків корд-фактору. Характерним також для нетуберкульозних мікобактерій є первинна стійкість до більшості антимікобактеріальних препаратів. Для диференціації *M. tuberculosis* і *M. bovis* від нетуберкульозних мікобактерій, відмінності їх один від одного, а також для розрізнення нетуберкульозних мікобактерій всередині груп зручно користуватися розміщеними нижче схемами.

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

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

Тести	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	Інші мікобактерії
Ніациновий тест	+	—	—
Ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена із 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти 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	+	—

I група– фотохромогенні мікобактерії

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

Для розрізнення всередині групи необхідні наступні тести:

утворення пігменту, гідроліз твіну-80, ніацинова проба (*M. simiae* ±), відновлення нітратів, ріст при 25 °С і 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 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>	+	+	+	–	+

5.7.5 Внутрішньолaboratorний контроль якості попередньої ідентифікації та визначення виду мікобактерій

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

Для внутрішньолaboratorного контролю якості процедур, що проводяться, одночасно з діагностичними пробами необхідно тестувати контрольні культури *M. tuberculosis H₃₇Rv*, *M. bovis* і *M. fortuitum* або *M. gordonae*. У зв'язку з цим необхідно вести музей цих культур.

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

Результати внутрішньолaborаторного контролю якості досліджень повинні реєструватися в спеціальному журналі або в журналі реєстрації досліджень на чутливість до медикаментозних препаратів і видову ідентифікацію.

Питання:

1. З якою метою проводиться первинна (попередня) ідентифікація комплексу *M. tuberculosis*?
2. Які методи застосовуються при первинній ідентифікації комплексу *M. tuberculosis*?
3. Яка властивість мікобактерій вважається головною ознакою роду мікобактерій?
4. Які диференціально-діагностичні середовища застосовуються для диференціації мікобактерій туберкульозного комплексу і не туберкульозних мікобактерій?
5. Які біохімічні тести застосовуються для видової ідентифікації мікобактерій туберкульозного комплексу?
6. Які дослідження з ідентифікації мікобактерій проводяться у вашій лабораторії?
7. Які властивості не туберкульозних мікобактерій вивчають при первинній ідентифікації не туберкульозних мікобактерій?
8. На які групи розділяються не туберкульозні мікобактерії за швидкістю росту на щільних живильних середовищах?
9. На які групи розділяються не туберкульозні мікобактерії за їх здатністю утворювати пігмент?
10. Які тести для ідентифікації не туберкульозних мікобактерій ви застосовуєте у своїй лабораторії?

5.8 Дослідження по визначенню медикаментозної чутливості мікобактерій

5.8.1 Основні поняття

Стійкість мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів є однією з найсерйозніших проблем сучасної фтизіатрії. Визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів є необхідним для своєчасної корекції лікування, а також є важливим показником епідемічної напруженості щодо туберкульозу в окремих регіонах і навіть в масштабах країни. Визначення медикаментозної стійкості мікобактерій є основою проведення епідеміологічного надзору та прогнозування епідеміологічної ситуації.

Чутливість мікобактерій до ПТП – це нездатність бактерійних клітин виділеного штаму рости на живильному середовищі з критичною концентрацією препарату, яка пригнічує або затримує ріст мікобактерій за стандартних умов постановки досліджу.

Стійкість (резистентність) мікобактерій – це здатність клітин мікобактерій розмножуватись в середовищі в присутності протитуберкульозного препарату в критичній концентрації.

Критична концентрація – це концентрація препарату, яка внесена в живильне середовище для диференціації штамів на стійкі або чутливі.

Якщо спостерігається ріст штаму мікобактерій в середовищі з “критичною” концентрацією протитуберкульозного препарату – штам вважається стійким.

Якщо ріст мікобактерій за тих же умов не спостерігається – штам вважається чутливим.

Для різних ПТП встановлена певна критична концентрація. Вона відрізняється від мінімальної інгібуючої концентрації, яка пригнічує ріст мікобактерій, і має клінічне значення, оскільки відображає дію препарату на МБТ в умовах макроорганізму і вибрана з урахуванням фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей ПТП.

Для різних за складом живильних середовищ критична концентрація одного і того ж препарату різна. Значення критичних концентрацій ПТП істотно відрізняються при використанні різних методів визначення стійкості МБТ.

Велике значення для ухвалення конкретних рішень про проведення терапії хворого на туберкульоз **має структура резистентності МБТ до медикаментозних препаратів**. Відповідно до міжнародних стандартів розрізняють наступні категорії стійкості МБТ до ПТП.

Монорезистентність – стійкість тільки до одного (будь-якого) протитуберкульозного препарату.

Полірезистентність – стійкість до двох і більше протитуберкульозних препаратів, за виключенням резистентності одночасно до ізоніазиду та рифампіцину.

Множинна стійкість до медикаментозних препаратів або мультирезистентність (MP, або MDR від англ. Multy Drug Resistance) – це особлива категорія серед полірезистентних штамів, у яких є стійкість до ізоніазиду та рифампіцину одночасно, незалежно від резистентності до інших препаратів.

Лікування хворих з MP МБТ має особливі труднощі, оскільки ізоніазид і рифампіцин залишаються до теперішнього часу найбільш ефективними ПТП.

Поширена медикаментозна резистентність (XDR). У 2006 р. в міжнародній класифікації з'явився цей термін. Це стійкість, принаймні, до ізоніазиду, рифампіцину, фторхінолонів і до одного з трьох ін'єкційних препаратів (капреоміцину, канаміцину або амікацину).

Для оцінки епідситуації в міжнародній практиці прийнято розрізняти стійкість мікобактерій до медикаментозних препаратів у раніше не лікованих (первинну) і лікованих хворих (набута).

Стійкість мікобактерій до медикаментозних препаратів у раніше не лікованих хворих визначається як стійкість, виявлена у мікобактерій, виділених від пацієнта, що ніколи не лікувався від туберкульозу або одержував лікування менше одного місяця.

В даному випадку вважається, що хворий заразився штамом мікобактерій стійким до медикаментозних препаратів. Первинна стійкість до ПТП характеризує стан мікобактеріальної популяції, циркулюючої на даній території, і її показники є важливими для оцінки ступеня напруженості епідемічної ситуації.

Стійкість мікобактерій у хворих, що раніше не лікувались, має велике клінічне і епідеміологічне значення, тому для правильної її оцінки надзвичайно важливо досліджувати культуру, виділену з діагностичного матеріалу, зібраного до початку лікування.

Частота стійкості до медикаментозних препаратів у раніше не лікованих хворих визначається як відношення кількості вперше виявлених хворих на туберкульоз з резистентними МБТ до всіх обстежених вперше виявлених бацилярних хворих за певний період (як правило, квартал, календарний рік).

Стійкість до медикаментозних препаратів мікобактерій у раніше лікованих хворих визначається як стійкість, що виявлена у хворого на туберкульоз, який одержував лікування протягом одного місяця.

Частота набуті стійкості до медикаментозних препаратів визначається як відношення кількості раніше лікованих хворих на туберкульоз з резистентними МБТ до всіх обстежених раніше лікованих бацилярних хворих за певний період (як правило, квартал, календарний рік).

5.8.2 Механізми розвитку стійкості мікобактерій до медикаментозних препаратів

Проблема стійкості до медикаментозних препаратів є актуальною не тільки для фтизіатрії, але і для антибактеріальної хіміотерапії в цілому. Стійкість до несприятливих зовнішніх дій є проявом значної здатності мікроорганізмів до адаптації. У її основі лежить спонтанний мутагенез, що відбувається в кожній бактеріальній клітині. В результаті цього процесу випадковим чином виникають пошкодження молекули ДНК – мутації. Вірогідність пошкодження в результаті мутації того або іншого гена в значній мірі залежить від його лінійної протяжності (розміру). Частина виникаючих мутацій ушкоджують гени, відповідальні за реалізацію антибактеріальної дії ПТП, що може призводити до зниження чутливості клітини з мутаціями до дії певного препарату.

Як вже згадувалося вище, частота виникнення мутацій, що призводять до стійкості клітини до ПТП, багато в чому залежить від лінійних розмірів ділянок ДНК, в якій локалізуються гени, відповідальні за антибактеріальну дію цієї речовини: чим більше довжина таких ділянок ДНК, тим вище частота виникнення мутацій, що призводять до стійкості.

Наприклад, частота виникнення мутацій, що призводять до стійкості до стрептоміцину, механізм антибактеріальної дії якого полягає у зв'язуванні його молекули з порівняно значною ділянкою 30S субодиниці бактерійної рибосоми, складає для *E. coli* 10^{-6} , тобто одна мутанта клітина виникає на 1 млн. нормальних клітин. У МБТ, на відміну від інших патогенів, є тільки одна копія

16S РНК, тому одна мутація у відповідному гені вже призводить до резистентності, тобто всі рибосоми в полісомі будуть стійкі до інгібіторів білкового синтезу (стрептоміцин і інші аміноглікозиди). У інших мікроорганізмів множинність копій рибосомальних генів вимагає для утворення клітин, стійких до стрептоміцину, мутаційних змін в кожній копії.

Частота виникнення стійкості до рифампіцину або офлоксацину значно менше і складає 10^{-9} і 10^{-12} відповідно.

Різні гени мають різне значення для прояву антибактеріального ефекту препаратів, тому їх мутаційні пошкодження можуть призводити до різного рівня стійкості бактеріальної клітини. Рівень стійкості культури мікобактерій, виділеної від пацієнта, залежить від частки стійких бактерій в цій культурі.

На відміну від інших патогенних мікроорганізмів мікобактерії туберкульозу мають природну стійкість до багатьох класів антибактеріальних препаратів широкого спектру дії (наприклад, антибіотики бета-лактамного і тетрациклінового ряду), обумовлену особливостями метаболізму: наявністю бета-лактамази і/або непроникністю клітинної стінки.

Стійкі до ПТП бактерійні клітини виникають в популяції інфекційних бактерій в організмі господаря. При дії на неї протитуберкульозного препарату чутливі до нього клітини гинуть, а стійкі бактерії одержують селективні переваги для виживання і розповсюдження в організмі.

При застосуванні монотерапії, зменшених доз або укорочених курсів лікування, виникає ситуація, що сприяє виживанню і розповсюдженню форм стійких до ПТП. Частота виникнення одночасно двох мутацій, що призводять до стійкості до двох препаратів, значно нижче, ніж для однієї, що приводить до моностійкості. Проте при застосуванні другого препарату для лікування інфекції, вже стійкої до одного з препаратів, і при недостатній ефективності терапії в організмі хворого виникне популяція бактерій, стійких вже до двох антибактеріальних препаратів. Таким чином, розповсюдження стійкості до ПТП є наслідком неадекватної хіміотерапії і вважається явищем, створеним людиною. Для подолання можливого множення стійкості до медикаментозних препаратів у фтизіатрії застосовується хіміотерапія не менше, ніж 4 протитуберкульозними препаратами.

Проблема розвитку і розповсюдження медикаментозної стійкості у фтизіатрії загострюється у зв'язку з обмеженістю спектру ПТП, ефективних при цьому захворюванні, і тривалістю курсу лікування. Переривання лікування, відмова від прийому препаратів, самолікування є основними причинами наростання стійкості збудників туберкульозу до ПТП.

5.8.3 Організація досліджень визначення чутливості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів

Для дослідження чутливості мікобактерій до ПТП потрібно дотримуватись певних *стандартів досліджень*.

■ Дослідження чутливості мікобактерій необхідно проводити в шафах біологічної безпеки 2-го класу, які забезпечують не тільки захист оператора, але і збереження від контамінації біологічного об'єкту.

■ При отриманні від хворого культур МБТ з різного патологічного матеріалу (мокротиння, лаважна рідина, сеча, гній, біопсія, післяопераційний матеріал та інше) необхідно досліджувати кожний виділений штам.

■ При одночасному отриманні від хворого двох і більше культур МБТ з однорідного діагностичного матеріалу достатньо досліджувати один штам, який отриманий з одного зразка патологічного матеріалу.

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

■ Визначення стійкості до ПТП необхідно проводити тільки з використанням чистих субстанцій протитуберкульозних препаратів.

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

Істотно впливають на стабільність протитуберкульозних препаратів умови їх стерилізації і зберігання.

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

У всьому світі як стандартне середовище для визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів застосовується середовище Левенштейна-Єнсена. Це середовище рекомендується до використання всіма мікробіологічними лабораторіями протитуберкульозної служби України для отримання порівняних результатів. Дотримання стандартної технології приготування живильного середовища з препаратами має найважливіше значення для отримання достовірних результатів тестування. Як вже згадувалося раніше, для приготування живильних середовищ з метою визначення чутливості МБТ до ПТП повинні використовуватися тільки хімічно чисті субстанції препаратів. При приготуванні робочих розчинів з необхідними концентраціями активної субстанції розрахунки розміру наважки слід проводити з урахуванням відсотка активності препарату, яка може варіювати від серії до серії.

Слід зазначити, що особливістю такого протитуберкульозного препарату, як піразинамід, є його висока протитуберкульозна активність при знижених значеннях кислотності середовища (рН 5,5). В той же час для культивування МБТ на щільних яєчних середовищах оптимальним є значення рН, близьке до нейтрального. Ці обставини не дозволяють використовувати стандартні методики для визначення чутливості МБТ до піразинаміду на щільних яєчних живильних середовищах.

Велике значення при постановці ТМЧ МБТ 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 медикаментозних препаратів.

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

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

5.8.4 Методи визначення медикаментозної чутливості мікобактерій

Для визначення стійкості мікобактерій повинні використовуватися тільки стандартизовані методи дослідження, що дозволяють:

- правильно вести лікування пацієнтів;
- інтерпретувати і порівнювати дані, одержані з різних джерел;
- проводити оцінку рівнів стійкості до медикаментозних препаратів, а також тенденцій, які спостерігаються в різних регіонах або країнах.

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

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

Всі наявні методи визначення чутливості МБТ можна умовно розділити на 2 категорії:

- методи прямого визначення чутливості МБТ;
- методи непрямого визначення чутливості МБТ.

При використанні методів *прямого визначення чутливості МБТ*, мокрота або інші клінічні матеріали, що заздалегідь знезаражені і гомогенізовані, висіваються безпосередньо на середовища, що містять відповідний препарат. Кількість інокулята визначається в залежності від кількості КСБ, визначеної при мікроскопії мазка.

Методи прямого визначення чутливості мають низку недоліків:

- для дослідження не можна використовувати зразки діагностичного матеріалу, що мають негативний результат мікроскопії;
- при проведенні даного дослідження підвищується ризик контамінації;
- може спостерігатися недостатній ріст культури, що не дозволяє зробити достовірні висновки;
- основним недоліком є неможливість стандартизувати методику.

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

Відомо три основних класичних мікробіологічних методи непрямого визначення чутливості МБТ:

- *Метод пропорцій*, запропонований в 1963 р. Canetti, Rist and Grosset і деталізований в 1985 р. Middlebrook and Cohn.
- *Метод абсолютних концентрацій* на щільних і рідких середовищах, модифікований в 1970 р. Meissener.
- *Метод коефіцієнта стійкості*, розроблений в 1961 р. Mitchison і ін.

З класичних культуральних методів визначення чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів найбільш відомий метод пропорцій, в теперішній час загальноприйнятий в Україні, який дозволяє встановити, яка частина мікобактеріальної популяції у відсотковому відношенні є стійкою до даного препарату.

5.8.4.1 Визначення чутливості мікобактерій до ПТП методом пропорцій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена (модифікований метод Канетті)

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

Принцип методу полягає у визначенні співвідношення (пропорції) між чутливими і стійкими особинами в популяції штаму *M. tuberculosis*, який виділено від хворого на туберкульоз, до протитуберкульозних препаратів в “критичних” концентраціях. “Критична” концентрація – один з критеріїв резистентності. Це строго визначена кількість кожного медикаментозного препарату, яку повинно містити середовище для постановки ТМС. “Критична” пропорція – також один із критеріїв стійкості – це відсоток стійких особин в бактеріальній популяції, при якому або вище якого штам вважається стійким до даного медикаментозного препарату. Якщо кількість стійких особин до якогось

антибактеріального препарату в популяції буде менше 1,0 %, такий штам вважається чутливим до даного препарату. Якщо стійкість особин в популяції більше 1,0 % – штам вважається стійким до даного препарату.

Класичний метод Канетті з трьома контрольними розведеннями викладено в “Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції” до Наказу № 45 МОЗ України від 06.02.02 р. В даний час в світі застосовується модифікований метод пропорцій з двома контролями.

Переваги методу пропорцій:

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

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

Приготування живильних середовищ з препаратами

Середовища для дослідження чутливості до медикаментозних препаратів повинні містити точні "критичні" концентрації антибактеріальних препаратів, які відповідають їх активності. Тому при приготуванні розчинів препаратів необхідно враховувати їх антибактеріальну активність. Показники антибактеріальної активності повинні бути вказані в паспорті до препарату.

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

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

Для дослідження чутливості до медикаментозних препаратів методом пропорцій застосовується щільне яєчне середовище Левенштейна-Єнсена. Після додавання препарату до середовища необхідно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни, щоб забезпечити рівномірний розподіл препарату в середовищі. Згортання середовища з препаратом повинне проводитися в тих же умовах, що і середовища без препарату. Коагуляцію проводять при 85°C протягом 30 хв. відповідно до Наказу МОЗ України № 45.

У табл. 5 вказані "критичні" концентрації протитуберкульозних препаратів до яких проводиться дослідження медикаментозної стійкості мікобактерій методом пропорцій. Відбір препаратів до яких визначається чутливість

виділених штамів МБТ залежить від категорії захворювання, випадку та профілю медикаментозної стійкості, отриманого при попередніх дослідженнях, якщо такі проводилися.

Приготування розведень протитуберкульозних препаратів

Для приготування розведень використовуються хімічно чисті субстанції препаратів. Схема процедур:

Ізоніазид (Н) – 0,2 мкг/мл

– 50,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату* + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 5000 мкг/мл;

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

Таблиця 5

"Критичні" концентрації ПТП для визначення МС мікобактерій методом пропорцій на середовищі Левенштейна-Єнсена

Назва препарату	Концентрація, мкг/мл
<i>Препарати I ряду</i>	
Ізоніазид	0,2
Ріфампіцин	40,0
Етамбутол	2,0
Стрептоміцин	4,0
<i>Препарати II ряду</i>	
Канаміцин	30,0
Капреоміцин	40,0
Протіонамід (етионамід)	40,0
Офлоксацин	2,0
ПАСК	0,5

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 500 мкг/мл;

– 1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 50,0 мкг/мл;

– 2,0 мл (3-го розведення) + 8,0 мл стерильної дистильованої води = 10,0 мкг/мл;

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

Ріфампіцин (R) – 40,0 мкг/мл

– 50,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 2,0 мл етилового спирту + 8,0 мл стерильної дистильованої води = 5000 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

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

Етамбутол (Е) – 2,0 мкг/мл

– 20,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 2000 мкг/мл;

– 5,0 мл (1-го розведення) + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл;

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

Стрептоміцин (S) – 4,0 мкг/мл

– 20,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 2000 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 200 мкг/мл;

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

Канаміцин (R) – 30,0 мкг/мл

– 15,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 1500 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 150 мкг/мл;

– внести 1,0 мл (2-го розведення) в 49,0 мл рідкого середовища Левенштейна-Єнсена (до згортання), кінцева концентрація в середовищі – 30,0 мкг/мл.

Капреоміцин (Cm) – 40,0 мкг/мл

– 50,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 5000 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 4,0 мл стерильної дистильованої води = 1000 мкг/мл;

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

Етионамід (Et) – 40,0 мкг/мл

– 50,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл димексиду (DMSO) = 5000 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 4,0 мл дистильованої води = 1000 мкг/мл;

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

Офлоксацин (Ofx) – 2,0 мкг/мл

– 20,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл 0,1 N NaOH^{**} = 2000 мкг/мл;

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

– 5,0 мл (1-го розведення) + 5,0 мл стерильної дистильованої води = 100 мкг/мл;

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

ПАСК (Pas) – 0,5 мкг/мл

– 50,0 мг активної речовини чистої субстанції препарату + 10,0 мл стерильної дистильованої води = 5000 мкг/мл;

– 1,0 мл (1-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 500 мкг/мл;

– 1,0 мл (2-го розведення) + 9,0 мл стерильної дистильованої води = 50,0 мкг/мл;

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

Приготування суспензії культури МБТ

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

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

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

З цієї суспензії готують наступні розведення:

1)	1:10 (10^{-1})		(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл суспензії 1 McF);
2)	1:100 (10^{-2})	контроль 1 (K_1)	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 1);
3)	1:1000 (10^{-3})		(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 2);
4)	1:10000 (10^{-4})	контроль 2 (K_2)	(4,5 мл 0,9 % р-ну NaCl+ 0,5 мл розведення 3).

Пробірки маркують.

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

Із розведення 10^{-4} вносимо по 0,1 мл бактеріальної суміші в другий контроль (K_2). В пробірках з середовищем кінцева концентрація бактеріальної суспензії дорівнює 10^{-5} .

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

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

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

Оцінка результатів

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

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

- культура МБТ є "чутливою", якщо в пробірці з "критичною" концентрацією препарату нема росту, або кількість колоній менше ніж в контролі K_2 з 1,0 % бактеріальної популяції;
- культура МБТ є "стійкою", якщо в пробірці з "критичною" концентрацією препарату вирости більше колоній ніж в контролі K_2 з 1,0 % бактеріальної популяції.

Дослідження потрібно повторити, якщо:

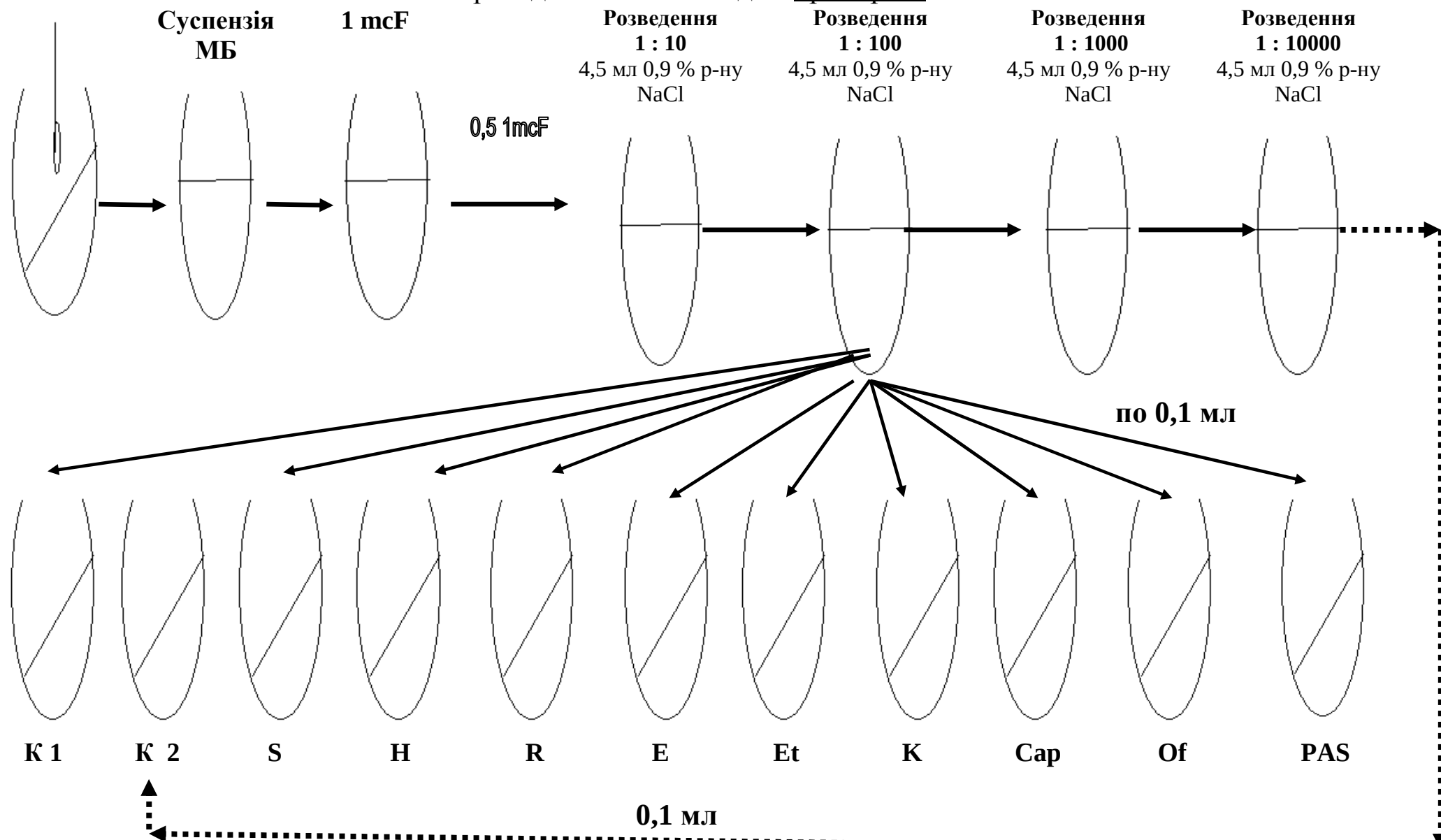
- немає пропорційності росту між K_1 і K_2 ;
- відсутній ріст в K_1 і K_2 , або в одній з контрольних пробірок;
- K_1 , K_2 або один з них забруднено;
- забруднені пробірки з препаратами.

5.8.4.2 Визначення чутливості мікобактерій до ПТП непрямим методом абсолютних концентрацій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена

Суть методу полягає в тому, що здійснюють дозований посів ретельно підготовленої мікобактеріальної суспензії з культури МБТ в пробірки з живильним середовищем Левенштейна-Єнсена, що містить певні концентрації ПТП і контрольні пробірки без препаратів. Зазвичай використовується

Проведення ТЛЧ методом пропорцій

Схема 1



"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 МБТ як чутливу або стійку до даного протитуберкульозного препарату.

Приготування живильних середовищ з препаратами

Для дослідження чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів застосовується щільне яєчне середовище Левенштейна-Єнсена. Після додавання препарату до середовища необхідно ретельно його перемішати, не допускаючи утворення бульбашок і піни та забезпечуючи рівномірний розподіл препарату в середовищі. Згортання середовища з препаратом повинне проводитися в тих же умовах, що і середовища без препарату. Згортання проводять при 85 °С протягом 30 хв. відповідно до Наказу МОЗ України № 45.

У табл. 7 вказані критичні концентрації протитуберкульозних препаратів до яких проводяться дослідження МС мікобактерій методом абсолютних концентрацій.

Таблиця 7

Критичні концентрації ПТП для визначення МС мікобактерій непрямим методом абсолютних концентрацій на середовищі Левенштейна-Єнсена

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

Примітка. Виділені жирним шрифтом препарати складають обов'язковий набір протитуберкульозних препаратів I ряду, до яких визначається чутливість МБТ. Тестування чутливості до решти препаратів рекомендується проводити за наявності резистентності до основних протитуберкульозних препаратів.

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

Приготування і засів мікобактеріальної суспензії

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

Приготування живильних середовищ з препаратами та схема розведень проводиться таким же чином як при визначенні МС 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 повинен торкатися усієї поверхні середовища. Потім тампон занурюють в пробірку, що містить 2,0 мл стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду, культуру змивають в рідину, попередньо розтираючи по внутрішнім стінкам пробірки. Пробірку залишають на 30 хв. при кімнатній температурі для осадження великих часточок культури.

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

З цієї суспензії готують розведення:

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

Із суспензії з мутністю 1 McF вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші в один з двох контролів (K_1). Із розведення 10^{-1} вносимо по 0,2 мл бактеріологічної суміші в другий контроль (K_2) і в усі пробірки з препаратами. Постановка ТМЧ методом абсолютних концентрацій наведена на схемі 2.

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

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

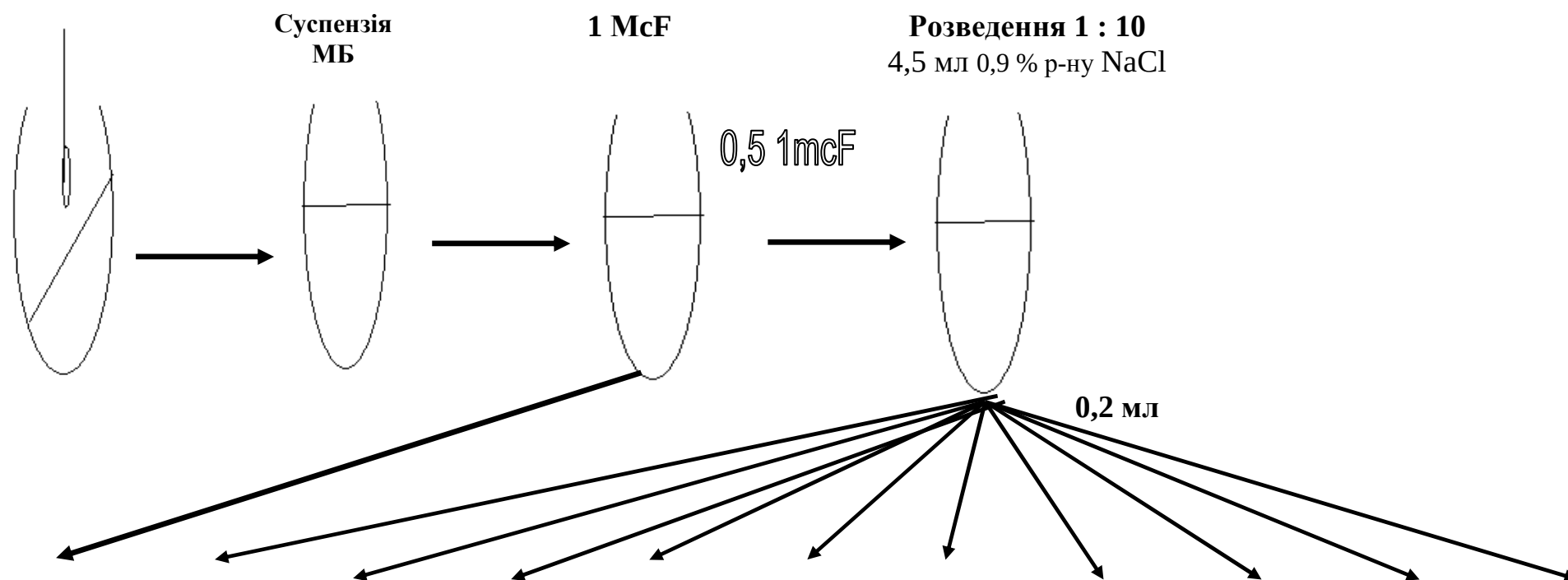
Через 2 доби можна перевести пробірки у вертикальні штативи, проте ця процедура не носить обов'язкового характеру.

Оцінка результатів визначення стійкості до протитуберкульозних препаратів

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

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

Проведення ТЛЧ методом абсолютних концентрацій



5.8.4.3 Визначення чутливості мікобактерій до ПТП 1-го і 2-го ряду з застосуванням рідкого живильного середовища Middlebrook 7H9 в автоматизованій системі BASTEC 960

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 обстежень 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.

Як показано вище (див. розділ 5.6.3), система MGIT призначена для прискореної бактеріологічної діагностики туберкульозу і визначення МС мікобактерій до препаратів 1-го ряду, але й не виключає можливість визначення чутливості мікобактерій і до медикаментозних препаратів 2-го ряду.

Система BASTEC MGIT 960 AST дозволяє визначати чутливість мікобактерій до низьких і високих концентрацій препаратів, аналогічно методикам дослідження на щільних середовищах. Набір з індикаторних пробірок контролю росту (без препарату) і що містять протитуберкульозний препарат розміщується на спеціальному носії з штрих-кодом, завдяки якому прилад здійснює безперервний моніторинг внесеної до пробірки культури.

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

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

Для визначення чутливості мікобактерій до піразинаміду як контроль використовують спеціальні пробірки MGIT з рН = 5,9. У набір BASTEC MGIT 960 PZA входять 2 флакони з ліофілізованим піразинамідом і 6 флаконів

живильної добавки. Перед використанням у флакон BASTEC MGIT 960 PZA, що містить ліофілізований препарат, слід додати 2,5 мл дистильованої/деіонізованої води, щоб одержати розчин, що містить 8000 мкг/мл PZA. Потім 100 мкл одержаного розчину переносять в пробірку MGIT (pH=5,9) для досягнення критичної концентрації PZA в бульйоні. Тривалість тестування становить 4–20 діб.

Нижче приводяться фінальні концентрації протитуберкульозних препаратів 1-го ряду, чутливість до яких може визначатися за допомогою приладу BASTEC 960 (табл. 8).

Таблиця 8

Кінцеві концентрації протитуберкульозних препаратів (мкг/мл) в наборах BASTEC MGIT 960 AST

Препарат	Критична (низька)	Висока
Стрептоміцин	1,0	4,0
Ізоніазид	0,1	0,4
Рифампіцин	1,0	–
Етамбутол	5,0	7,5
Піразинамід	100	–

Дослідження медикаментозної стійкості мікобактерій в 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 фторхінонам (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 → ТМС MGIT

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

Культура MGIT → ТМС MGIT

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

Культура Левенштейна-Єнсена → ТМС MGIT

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

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:

1.1) 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;

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

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

1.3) 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);

1.4) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (S, H, R, E і Z – у відповідні марковані пробірки MGIT (рис. 3);

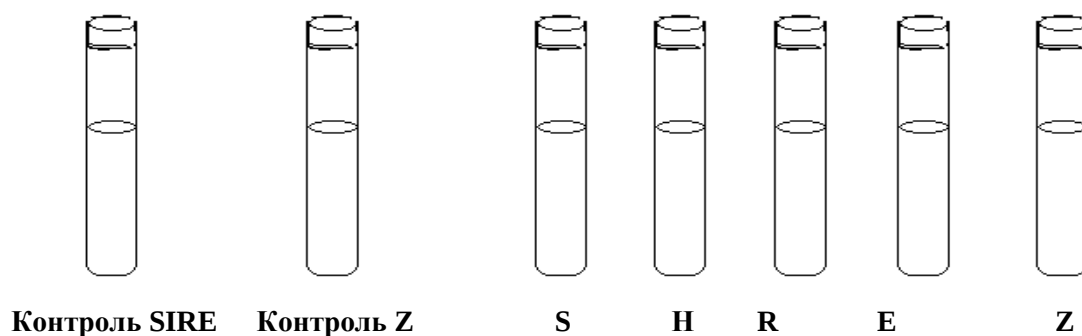


Рис. 1. Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 1-го ряду.

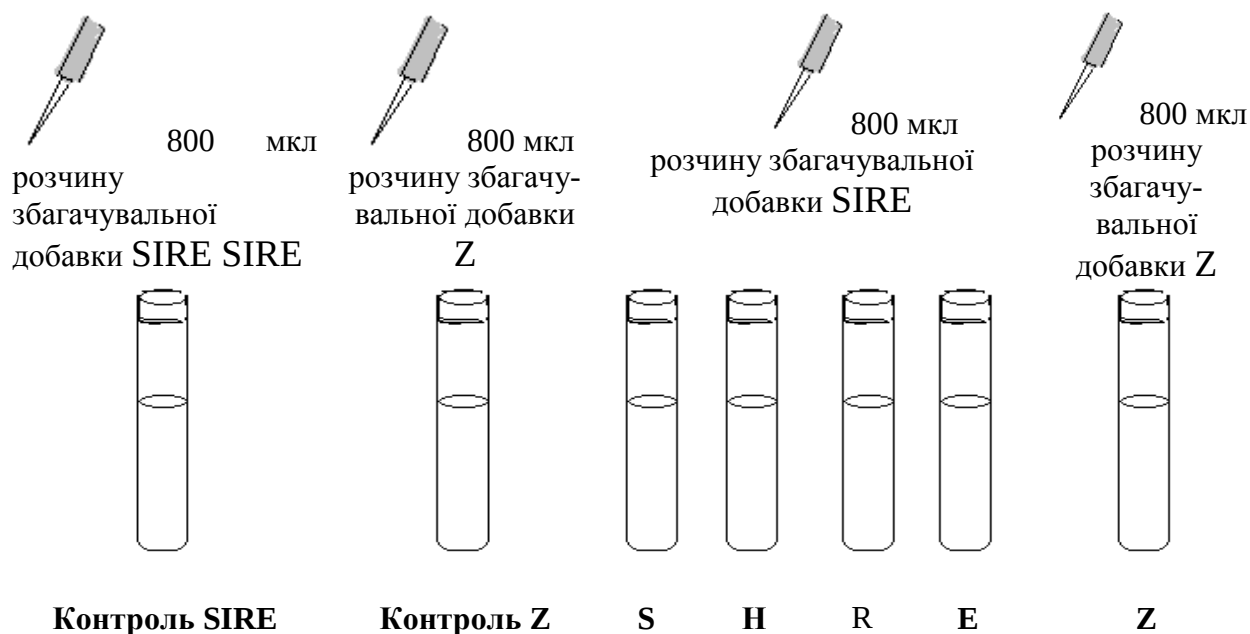


Рис. 2. Додавання добавок, що збагачують середовище, у пробірки.

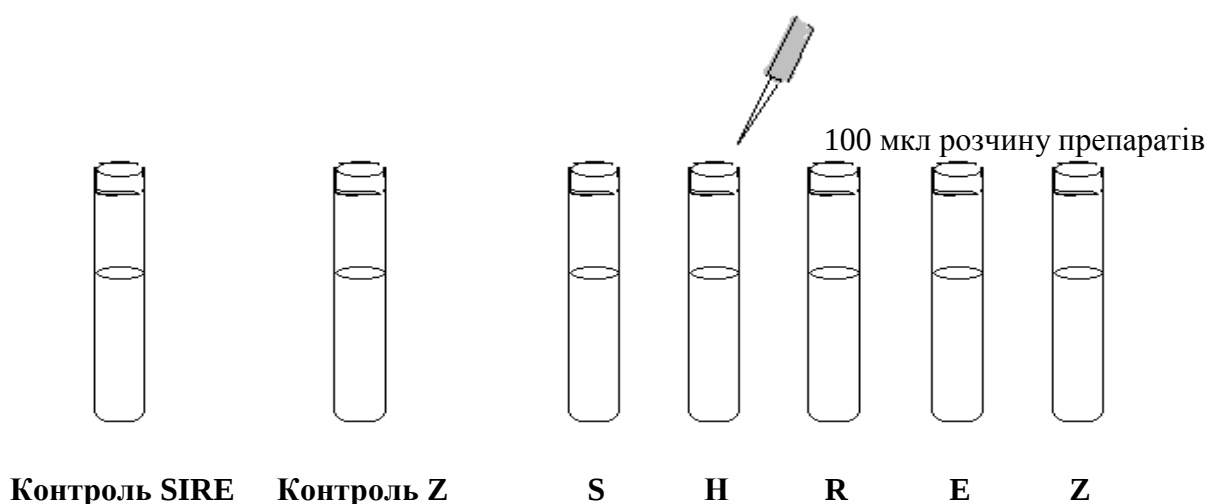


Рис. 3. Додавання препаратів 1-го ряду у пробірки MGIT для ТМС.

1.5) НЕ ДОДАВАТИ препарати в пробірки, які будуть використані для контролю росту мікобактерій.

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

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:

2.1) розведення антимікобактеріальних препаратів.

Розведення препаратів готують з чистих субстанцій препаратів 2-го ряду з використанням стерильної дистильованої води.

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.

2.2) промарнувати 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. 4): 1 контроль і 4 пробірки з препаратами 2-го ряду.

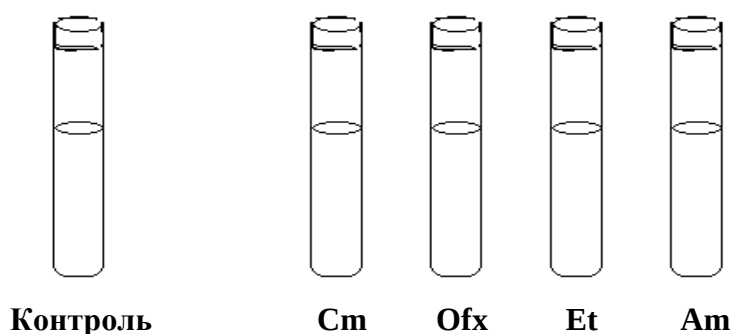


Рис. 4. Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 2-го ряду.

2.3) 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. 5);

2.4) за допомогою піпетки зі стерильним наконечником додати 100 мкл розчину препаратів (Cm, Ofx, Et, Am) у відповідні марковані пробірки MGIT (рис. 6);

2.5) НЕ ДОДАВАТИ препарати в пробірки, які будуть використані для контролю росту мікобактерій.

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. 7).

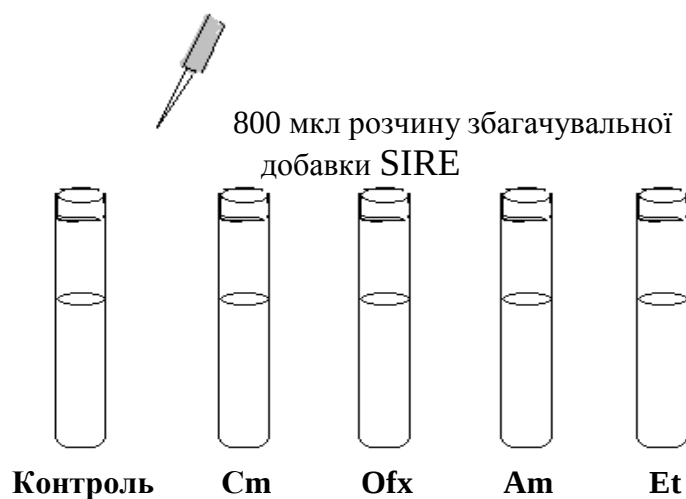


Рис. 5. Додавання добавок, що збагачують середовище у пробірки із препаратами.



Рис. 6. Додавання препаратів 2-го ряду у пробірки MGIT для ТМС.

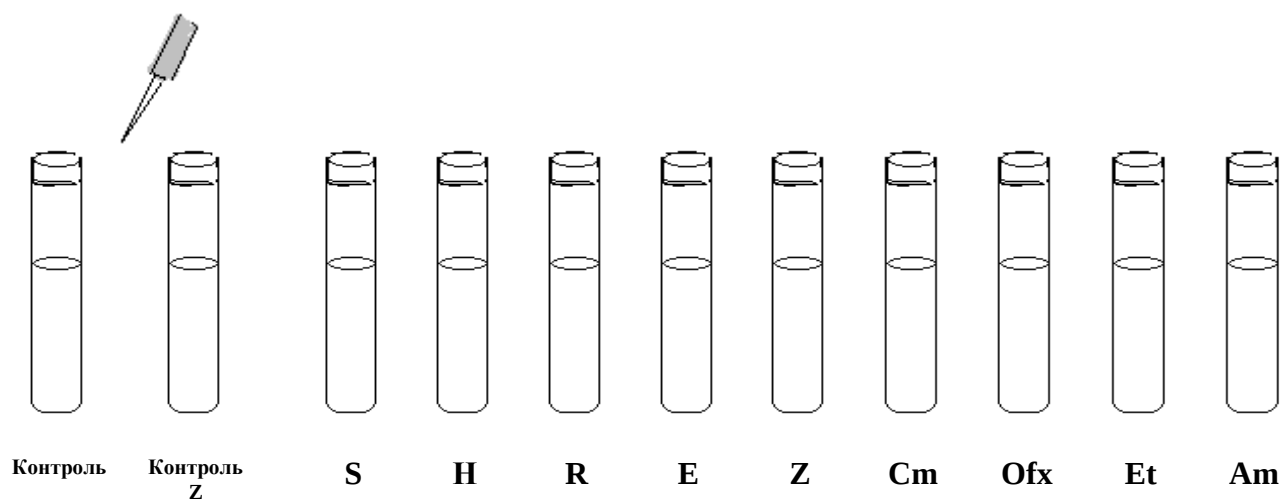


Рис. 7. Маркування пробірок для постановки ТМС мікобактерій до препаратів 1-го та 2-го ряду.

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 необхідно посіяти у нову пробірку MGIT і культивувати в апараті до отримання позитивного результату.

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

Поява росту - «0» день.

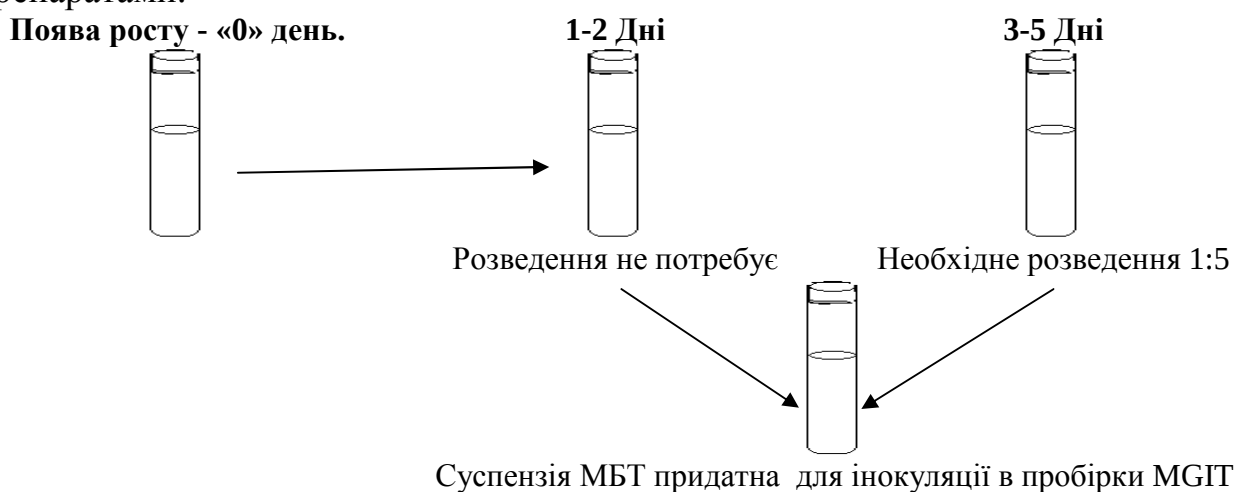


Рис. 8. Приготування суспензії МБТ для проведення ТМС.

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 (без препаратів).

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

Приготування суспензії мікобактерій з позитивних проб (після культивування на щільних середовищах) для постановки ТМС в рідкому середовищі в системі MGIT

Для приготування суспензії мікобактерій для посіву на ТМС необхідно:

а) використовувати для постановки ТМС культуру з щільного живильного середовища Левенштейна-Єнсена НЕ ПІЗНІШЕ 15 діб з моменту появи росту мікобактерій (рис. 9);

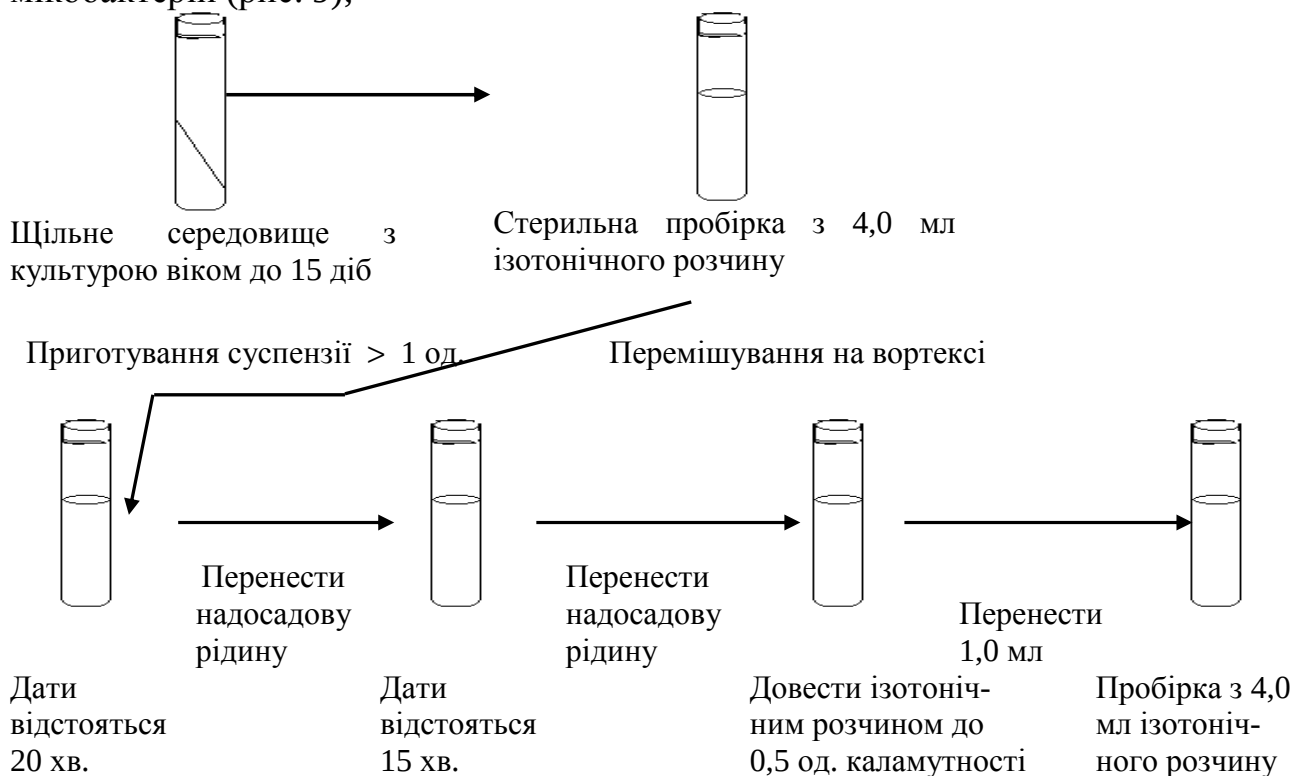


Рис. 9. Приготування суспензії мікобактерій з щільного живильного середовища для посіву на ТМС в системі MGIT.

- 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;
- е) акуратно перенести надосадову рідину піпеткою в іншу стерильну пробірку, не торкаючись осаду на дні пробірки. Залишити пробірку з надосадовою рідиною на 15 хв. для осадження всіх часток, що залишилися;
- ж) акуратно перенести надосадову рідину в наступну стерильну пробірку **НЕ ТОРКАЮЧИСЬ ОСАДУ**;
- з) проконтролювати мутність отриманої суспензії за стандартом мутності (повинна бути більше 0,5 од). Довести мутність суспензії точно до 0,5 од шляхом додавання в пробірку стерильного ізотонічного розчину. **СТЕЖИТИ, ЩОБ МУТНІСТЬ НЕ БУЛА МЕНШ 0,5 од.**;
- і) розвести отриману суспензію в співвідношенні 1:5 стерильним ізотонічним розчином NaCl. Для цього перенести 1,0 мл отриманої суспензії в пробірку з 4,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати отримане розведення (1:5) для інокуляції в пробірки MGIT з препаратами;
- к) приготувати розведення отриманої суспензії (1:100) для посіву в контрольні пробірки. Для цього додати 0,1 мл отриманої суспензії в пробірку з 10,0 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl і перемішати. Використовувати дане розведення для посіву в контрольні пробірки;
- л) **ВАЖЛИВО!** При тестуванні на стійкість до Z для посіву в контрольну пробірку готують розведення 1:10 (не 1:100). Для одержання такого розведення додати 0,5 мл суспензії (розведення 1:5) у пробірку з 4,5 мл ізотонічного розчину NaCl. Використовувати це розведення для інокуляції контрольних пробірок при тестуванні стійкості до Z.
- Інокуляція й інкубація.** Інокуляцію необхідно проводити згідно з наступними схемами (рис. 10, 11, 12, 13):
- а) промаркувати пробірки в залежності від кількості препаратів, до яких потрібно визначити МС:
- 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;
 - 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 мікобактерій або розведення 1 : 5 для 3 – 5-денної культури мікобактерій, вирощених у системі MGIT у кожному з п'яти пробірок із препаратами 1-го ряду (S, H, R, E і Z) та/або в 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. Переконаватися в тому, що кришки пробірок щільно закриті. Не перемішувати 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.

Внутрішньолaborаторний контроль якості

Контроль якості при роботі на автоматизованій системі BACTEC 960 здійснюється з кожною новою партією наборів для визначення чутливості до антимікобактеріальних препаратів. З цією метою проводиться постановка тесту з використанням чутливого (H₃₇Rv) і стійкого до ізоніазиду штамів мікобактерій туберкульозу із колекції ATCC, а також завідомо чутливого і резистентного до ізоніазиду ізолятів МБТ, виділених від хворих туберкульозом.

Проведення ТМС з культури віком 1 – 2 дні

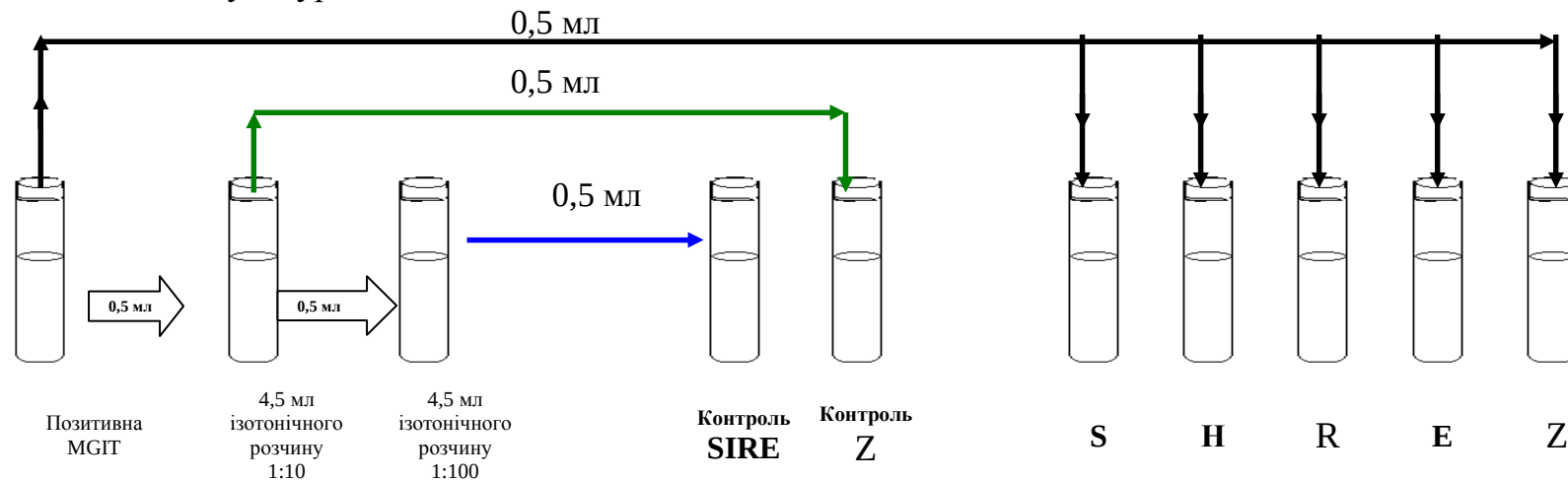


Рис. 10. Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 1 – 2 дні до препаратів 1-го ряду.

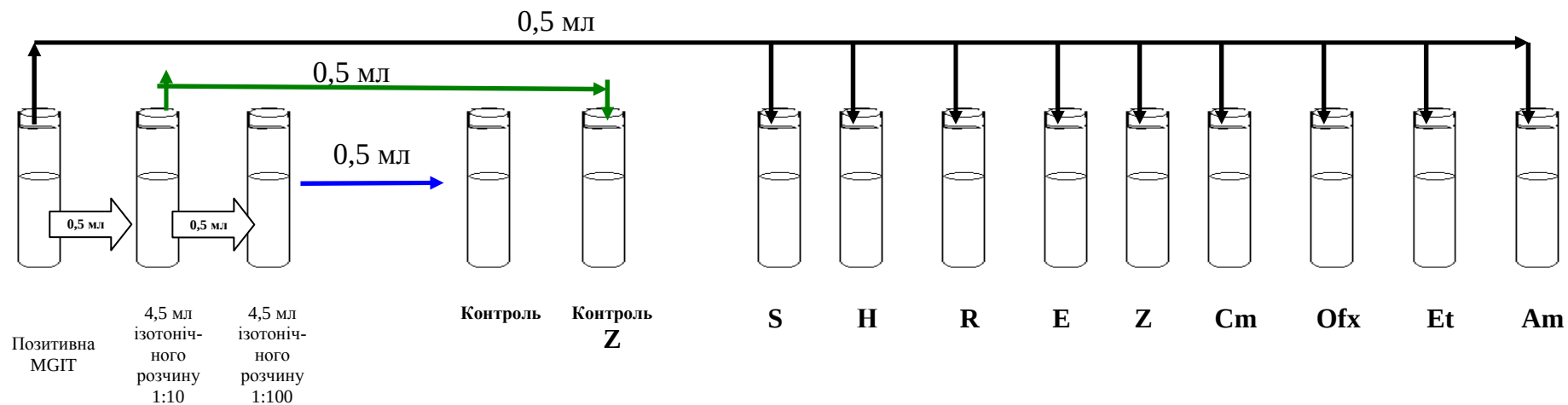


Рис. 11. Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 1 – 2 дні до препаратів 1-го та 2-го ряду.

Проведення ТМС з культури віком 3 – 5 днів

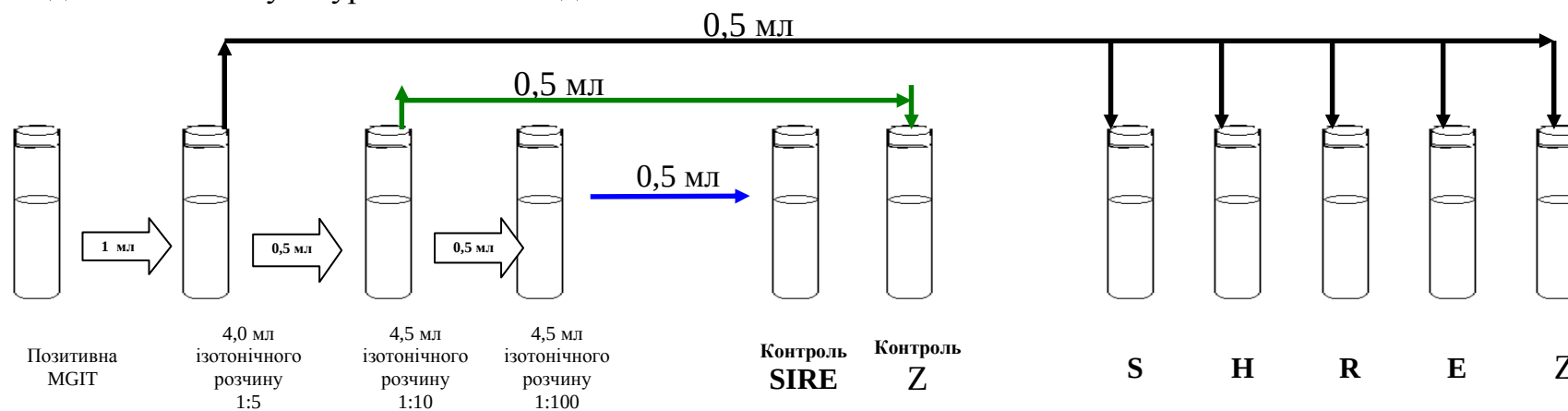


Рис. 12. Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 3 – 5 днів до препаратів 1-го ряду.

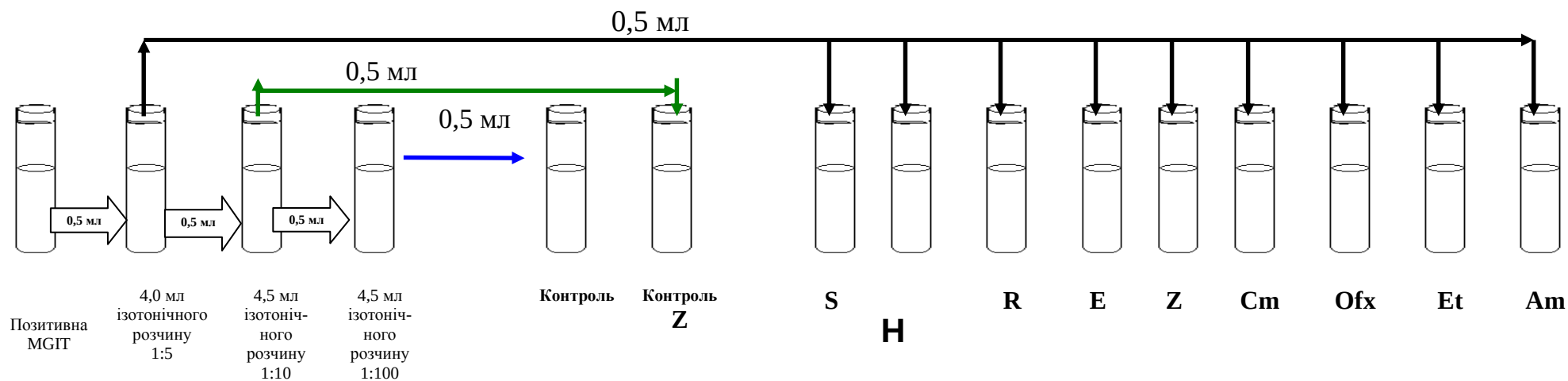


Рис. 13. Проведення ТМС з культури (MGIT «+») віком 3 – 5 днів до препаратів 1-го та 2-го ряду.

5.8.4.4 Альтернативні методи дослідження медикаментозної чутливості мікобактерій

Окрім методу пропорцій на щільному та рідкому живильному середовищі і непрямого методу абсолютних концентрацій для визначення МС МБТ можуть бути використані *альтернативні методи*:

- метод коефіцієнта стійкості;
- прямий метод абсолютних концентрацій.

Дослідження чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів методом коефіцієнта резистентності

Суть методу полягає у визначенні мінімальної інгібуючої концентрації протитуберкульозних препаратів для клінічних штамів мікобактерій і співвідношення МІК тих же препаратів для завідомо чутливого лабораторного штаму мікобактерій (як правило, $H_{37}Rv$). Це самий трудомісткий і дорогий метод, оскільки вимагає використання великої кількості пробірок з живильним середовищем, тому він застосовується в основному для наукових досліджень.

Дослідження чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів прямим методом абсолютних концентрацій

Основним недоліком традиційних культуральних методів визначення МС МБТ є їх надзвичайна тривалість. Результати ТМЧ враховуються через 3–4 тижні інкубації в термостаті, тому необхідна корекція хіміотерапії може бути проведена в кращому разі лише через 2–2,5 місяця від моменту надходження в лабораторію діагностичного матеріалу.

Для прискорення досліджень може бути використаний *прямий метод абсолютних концентрацій*. При постановці даного методу проводиться прямий посів осаду обробленого детергентами діагностичного матеріалу одночасно на контрольне живильне середовище і середовища з відповідними протитуберкульозними препаратами. Паралельно проводиться посів матеріалу на стандартні живильні середовища (з метою отримання культури).

Культура мікобактерій вважається стійкою, як і при непрямому методі абсолютних концентрацій, якщо на середовищі з ПТП виростає 20 і більше колоній.

Проте прямий метод абсолютних концентрацій може бути використаний тільки для дослідження бактеріоскопічно позитивного матеріалу з масивністю бактеріовиділення не менше 2+. В цьому випадку підвищується ризик контамінації. Крім того, слід враховувати, що при цьому методі проводиться не дозований посів, що може утруднити інтерпретацію результатів. Тому у ряді випадків отримані результати можуть виявитися недостовірними.

Метод носить попередній характер і збільшує вартість дослідження МС МБТ в цілому.

5.8.5 Контроль якості досліджень по визначенню медикаментозної чутливості мікобактерій

Для забезпечення достовірності одержаних результатів необхідно проводити контроль якості виконуваних лабораторією тестів щодо дослідження чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів.

Внутрішньолaboratorний контроль якості середовищ для визначення чутливості

Необхідно перевіряти якість кожної партії середовищ для визначення чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів. З цією метою кожна партія приготованого живильного середовища повинна бути перевірена на стерильність (інкубація у термостаті).

Також для кожної партії середовища при тестуванні на чутливість клінічних зразків необхідно одночасно провести тест на чутливість контрольного штаму *M. tuberculosis H37Rv*, або контрольного штаму МБТ з відомою стійкістю, до усіх досліджуваних протитуберкульозних препаратів. Якщо середовище з препаратами приготоване правильно, то стійкість контрольної культури буде незмінною. Поява росту контрольного штаму в пробірках з ПТП, до яких він є чутливим, або відсутність його росту в пробірках з препаратами, до яких контрольний штам є стійким, указує на те, що при приготуванні середовища з препаратом було допущено помилку, або на те, що неправильно приготована бактерійна суспензія.

За відсутності у лабораторії контрольних (музейних) штамів, лабораторія може використовувати виділені від пацієнтів штами, які у багатократних дослідженнях підтверджують свою чутливість і/або стійкість.

Реєстрація результатів внутрішньолaboratorного контролю якості кожної партії середовищ повинна фіксуватися в журналі приготування середовищ.

Внутрішньолaboratorний контроль якості включає також регулярну перевірку використовуваного лабораторного обладнання – згортувачів, термостатів, рН-метра, автоматичних дозаторів, стандартів мутності тощо.

Зовнішня оцінка якості

Зовнішню оцінку якості досліджень по визначенню чутливості до протитуберкульозних препаратів для лабораторій III рівня організовує і здійснює Центральна референс-лабораторія.

5.8.6 Реєстрація бактеріологічних досліджень та їх результатів

При реєстрації бактеріологічних досліджень кожному дослідженню діагностичного матеріалу присвоюється індивідуальний номер.

Усі зразки, що надійшли в лабораторію (за винятком вибракуваних) повинні бути зареєстровані в формі № 252-2/о "Лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2" (далі – форма ТБ 04/2)

Форму ТБ 04/2 заповнюють відповідальні лікарі бактеріологічних відділів клініко-діагностичних лабораторій (КДЛ) або бактеріологічних лабораторій і

ведуть у лабораторіях 2 та 3 рівнів протитуберкульозних закладів. 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 чутливість до АМБП.

Графи 1–19 заповнюються на основі форми первинної облікової документації № 200 – 2/о "Направлення на бактеріологічне дослідження ТБ 06".

У графі 1 зазначають лабораторний реєстраційний номер пацієнта.

У графу 2 заносяться номер проби.

У графу 3 записують цифрами число, місяць та рік збору біоматеріалу.

У графу 4 записують цифрами число, місяць та рік доставки біоматеріалу на дослідження.

У графу 5 вписують районний реєстраційний номер випадку туберкульозу (якщо він є), код району, дві останні цифри року, порядковий номер.

У графі 6 зазначають прізвище, ім'я та по батькові пацієнта.

У графі 7 скорочено вказують стать особи, якій проводиться дослідження. Ч – чоловіча; Ж – жіноча.

У графі 8 зазначають рік народження пацієнта.

У графі 9 вказують місце проживання та район адміністративної території, в якому проживає пацієнт.

Необхідно найбільш повно внести ці дані, оскільки лабораторний журнал може стати єдиним джерелом даних про хворого на бацилярний туберкульоз.

У лабораторіях додатково ведеться журнал виділених культур, в який вносять усі дані про проби, з яких були виділені культури мікобактерій.

У графі 10 вказують: у верхній клітинці граfi назву закладу чи відділення, звідки було направлено біоматеріал; у нижній клітинці граfi 10 – прізвище, ініціали та телефон лікаря, який направив на дослідження біоматеріал пацієнта.

Ці дані необхідні для того, щоб:

- 1) передати результати дослідження лікарю, який направив матеріал;
- 2) у разі вибравки результатів (проріст, незадовільна деконтамінація, тощо) повідомити про те, що трапилося лікаря і спільно прийняти рішення про доцільність повторного дослідження.

У графах 11 та 12 відмічають, який саме біоматеріал направляється на дослідження – мокротиння або інше. Якщо направляється інший біоматеріал, необхідно зазначити, який саме (промивні води бронхів, плевральна рідина тощо).

У графах 13–18 відмічають мету проведення дослідження – діагностика, контроль хіміотерапії чи інша.

Дані про вид діагностичного матеріалу та мети дослідження необхідні для проведення ретроспективного аналізу ефективності роботи лабораторії (див. розділ «Забезпечення якості досліджень»).

Якщо мета проведення дослідження – діагностика нового випадку, то відмітити знаком «V» у пункті 13; якщо діагностика рецидиву, то відмітити знаком «V» у пункті 14, інший випадок повторного лікування (невдале лікування, після перерви) відмітити знаком «V» у пункті 15.

Якщо мета проведення дослідження - контроль хіміотерапії, то у пункті 16 необхідно це відмітити знаком «V». У пункті 17 зазначити цифрою, на якому місяці лікування проводиться дослідження.

Якщо мета проведення дослідження інша, то у пункті 18 необхідно зазначити, яка саме, наприклад: диспансеризація, обстеження особи, яка контактувала з хворим на туберкульоз із бактеріовиділенням, тощо.

У графі 19 цифрою вписують категорію захворювання на туберкульоз – 1–4.

У графі 20 записують цифрами число, місяць та рік проведення дослідження.

У графах 21–23 вказують результат бактеріоскопічного дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо у пробі біологічного матеріалу знайдені кислотостійкі бактерії (далі – КСБ), то поряд з відповідним номером зразка мокротиння (1, 2 або 3) у графі 21 необхідно записати ступінь позитивного результату, якщо КСБ не знайдені, зазначити, що результат негативний.

Якщо в полі зору більше 10 КСБ, то необхідно відмітити «3+».

Якщо в полі зору від 1 до 10 КСБ, то необхідно відмітити «2+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 10 до 99 КСБ, то необхідно відмітити «1+».

Якщо на 100 полів зору знайдено від 1 до 9 КСБ, то необхідно записати точну цифру знайдених КСБ.

Якщо на 100 полів зору не знайдено КСБ, то зазначити, що результат негативний.

У графі 22 записують цифрами число, місяць та рік видачі результатів бактеріоскопії.

У графі 23 ставиться підпис спеціаліста, який проводив бактеріоскопію.

У графах 24 та 25 вказують результат культурального дослідження першої, другої та третьої проб.

Якщо на живильному середовищі:

- немає росту МБТ, то зазначається термін: "негативний";
- виросли 1–19 колоній МБТ, то вказують точне число колоній МБТ.
- виросло від 20 до 100 колоній МБТ, то ставиться «1+».
- виросло 100–200 колоній МБТ, то ставиться «2+».
- виросло 200–500 колоній МБТ, то ставиться «3+».
- виросло більше 500 колоній МБТ, то ставиться «4+».

Якщо на живильному середовищі проросла банальна мікрофлора, то ставиться «проріст».

У графі 25 записують цифровим способом число, місяць та рік видачі попереднього результату посівів.

У графах 26–34 вказують результати тестів ідентифікації виділеної культури.

У графі 26 відмічають морфологію колоній: R або S.

У графі 27 знаками «—» або «+» відмічають пігментоутворення: «—», якщо кремовий колір, характерний для мікобактерій туберкульозного комплексу, «+», якщо колонії мають інший колір.

У графі 28 відмічають швидкість росту: «П» – повільний, «Ш» – швидкий.

У графі 29 позначають наявність чи відсутність корд-фактора знаками «+» або «—».

У графі 30 знаками «+» або «—» відмічають ріст культури або його відсутність на середовищі із саліциловокислим натрієм або з PNB.

У графі 31 відмічають знаками «+» або «—» результати ніацинового тесту.

У графі 32 відмічають знаками «+» або «—» результати нітратредуктазного тесту.

У графі 33 відмічають знаками «+» або «—» наявність або відсутність термостабільної каталази.

У графі 34 відмічають знаками «+» або «—» результати ТСН–тесту.

У графі 35 вказують висновок, а саме: виділена культура ідентифікована як: *M. tuberculosis* (МБТ), інші мікобактерії (необхідно вписати).

У графах 36–40 вказують результати тесту медикаментозної чутливості виділених мікобактерій до АМБП першого ряду. Якщо культура є чутливою до певного препарату, вписується літера «Ч», а якщо стійка, – літера «С».

У графі 41 зазначають результати тесту чутливості мікобактерій до АМБП другого ряду та вказуються через кому скорочені назви АМБП другого ряду, до яких мікобактерії є стійкими.

У графі 42 вказують цифрами число, місяць та рік видачі остаточних результатів дослідження.

У графі 43 ставиться підпис спеціаліста, який проводив культуральне дослідження.

У графі 44 зазначаються спеціальні примітки (за потреби).

Нумерація досліджень повинна починатися в перший робочий день року і триватиме безперервно протягом усього року. Реєстраційний номер, присвоєний зразку, повинен бути нанесений на контейнер зі зразком і супроводжувати його на всіх етапах бактеріологічного дослідження: на центрифужній пробірці, в якій зразок центрифугують після деконтамінації, на пробірках з ростовим середовищем, на предметних скельцях, на які наноситься матеріал для мікроскопії перед посівом і для підтвердження належності культури, що виросла, до кислотостійких бактерій (фарбування за Цілем-Нільсеном).

Журнали реєстрації: форма 252-1/о, лабораторний реєстраційний журнал (бактеріоскопічні дослідження) ТБ 04/1 та форма 252-2/о, лабораторний реєстраційний журнал (бактеріологічні дослідження) ТБ 04/2 наведені в додатку 7.

Лабораторії додатково ведуть Журнал виділених культур. У журнал виділених культур вносять тільки ті номери досліджень, які дали позитивні результати. Форми журналів «виділених культур» та утримання музейних штамів наведені у «Положенні о порядке учета, хранения, обращения, отпуска

и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения» МОЗ СРСР 18.05.79.

Якщо лабораторія сама не проводить видову ідентифікацію та дослідження чутливості до медикаментозних препаратів виділених культур, а пересилає їх до лабораторії вищого рівня, результати дослідження цієї лабораторії повинні бути внесені у відповідну графу із зазначенням лабораторії, що видала результати досліджень.

Якщо лабораторія отримує культури, виділені в інших лабораторіях, в журнал вноситься реєстраційний номер культури, присвоєний їй лабораторією, що виділила її, в індексі, що дозволяє точно ідентифікувати лабораторію, яка направила культуру на дослідження.

У лабораторіях третього рівня доцільно додатково вести окремо Журнал виділених не туберкульозних мікобактерій.

В найбільш короткі терміни після отримання діагностичного матеріалу можна отримати результати мікроскопічного дослідження. Форма результату мікроскопічного дослідження розташована з нижнього краю форми направлення на бактеріоскопічне дослідження ТБ-05 (форма 200-1/о), що дозволяє вирізати її після заповнення і передати в клініку. При цьому направлення з іншими формами звіту про результати залишається у лабораторії, що дає можливість додаткового контролю за своєчасністю видачі результатів подальших видів бактеріологічних досліджень. Потім слід виконати посів матеріалу. Його результати, які включають попередню ідентифікацію (що дозволяє стверджувати, що виділена культура належить до КСБ і схожа з мікобактерією туберкульозного комплексу), вносяться у форму 200-2/о (Результат культурального дослідження (посіву) ТБ 06а) при виявленні росту в пробах, засіяних діагностичним матеріалом, і розглядаються як попередній результат. Оцінка видається відповідно до напівкількісної шкали інтенсивності росту. Заповнений талон вирізається з форми направлення і передається в клініку. Аналогічним чином заповнюється і подається до відповідного клінічного підрозділу і форма звіту про результати подальших досліджень (таких, як видова ідентифікація і визначення чутливості до антимікобактеріальних препаратів).

Результати досліджень повинні бути представлені згідно з наказом МОЗ України від 02.09.2009 № 657 і відповідати зареєстрованим у лабораторному журналі досліджень.

Результати дослідження не видаються на руки пацієнтові, а передаються до медичної установи або лікарю, які направили матеріал на дослідження. Терміни видачі результатів: мікроскопія (з осаду) – 2 доби, посів – 2–10 тижнів, чутливість до медикаментозних препаратів – згідно з методом, який використовувався для дослідження. Терміни видачі результатів повинні бути затверджені і вказані в Настанові з якості кожної лабораторії.

На закінчення відзначимо, що в сучасній спеціалізованій бактеріологічній лабораторії протитуберкульозного закладу необхідна наявність комп'ютерної бази даних.

В даний час в більшості лабораторій країни використовуються паперові носії. Проте великий обсяг реєстрації зразків (включаючи інформацію про пацієнта) і результатів дослідження, а також необхідність складати статистичні звіти, являють собою рутинну роботу, що вимагає багато часу, в ході якої можливі помилки. Тому разом з паперовими носіями в лабораторії повинна бути комп'ютерна система та база даних. Переваги комп'ютерної системи очевидні: спрощення роботи і виключення помилок; сортування даних; облік результатів дослідження; можливість отримання інформації про попередні результати дослідження для кожного пацієнта; легке, швидке і акуратне складання річних звітів; контроль за рівнем доступу до інформації та її зміною.

Питання:

1. *Перелічіть реєстраційні форми, які повинні бути в лабораторіях різного рівня.*
2. *Внесіть дані на пацієнта Ляшко Петро Миколайович, 52 років, який проживає за адресою: Садова вул., буд.7 кв. 25. Зразок мокротиння надійшов 30 січня 2007 р. Результат люмінесцентної мікроскопії – 5 КУМ 100 п.з. Результат посіву: 5 лютого, 3+. Яких даних не вистачає в завданні для правильної реєстрації зразка для дослідження? Які коментарі ви можете зробити з наведеними даними? Які додаткові дослідження ви можете рекомендувати?*
3. *Заповніть направлення на культуральні дослідження на пацієнта Недригайло Оксану Петрівну, 35 років, що проживає за адресою: Васильківська, буд.6, кв.17; зразок мокротиння, початок лікування – грудень 2007 року. Дата збору матеріалу – березень 2008 р. Які дані додатково вам потрібні для заповнення направлення?*
4. *З діагностичного матеріалу на середовищі Левенштейна-Єнсена 26 листопада 2006 р. виросло 25 колоній, на середовищі Фіна-П – 95 колоній. Внесіть ці дані в журнал реєстрації досліджень і у форму видачі відповіді. Чи можете ви дати відповідь про виявлення МБТ? Яких даних для цього вам не вистачає?*

5.8.7 План роботи бактеріологічної лабораторії. Розрахунки потреб у витратних матеріалах і реагентах

Планування роботи лабораторії

Планування роботи лабораторії повинно забезпечити її безперервну роботу. Це стосується як витратних матеріалів і реактивів, так і навантаження на персонал, планового обслуговування та перевірки приладів і обладнання, їх списання.

Керівник лабораторії на початку року повинен скласти розклад можливих перерв у проведенні досліджень, відповідно плануючи надходження матеріалів для дослідження і відпусток співробітників.

Обсяг і номенклатура досліджень, що проводяться повинні відповідати кількості і спеціальній підготовці персоналу. Оснащення лабораторії також має відповідати спектру і кількості досліджень, що в ній проводяться

Закупки обладнання. При плануванні закупок обладнання лабораторія повинна виходити з номенклатури та обсягу проведених нею досліджень у попередньому році. Необхідно пам'ятати, що обладнання зношується і підлягає списанню відповідно до вказівок виробника. Зношування і старіння обладнання відбувається і в тих випадках, коли воно не використовується, а зберігається на складі.

Витратні матеріали і реактиви. При плануванні використання витратних матеріалів необхідно пам'ятати, що у першу чергу підлягають використанню реактиви з термінами придатності, що скоро закінчуються. При плануванні закупівель необхідно уникати закупки надмірної кількості реактивів і витратних матеріалів: закупівля повинна здійснюватися у відповідності до розрахунку прогнозованої потреби.

Розрахунок необхідного запасу реактивів. При розрахунку замовлення сухих реактивів на один рік виходять з кількості проведених досліджень у минулому півріччі і необхідності додаткового піврічного запасу, зменшеного на залишок реактивів на складі. Такі розрахунки проводяться для реактивів і витратних матеріалів, що підлягають тривалому зберіганню. Якщо матеріали швидко псуються (наприклад, курячі яйця) необхідно налагодити їх регулярне постачання протягом року.

Питання:

Завдання 1. *Складіть графік постачання в лабораторію яєць на I квартал, якщо вона проводить посів 150 зразків діагностичних матеріалів на 2 пробірки яєчного середовища щотижня.*

Завдання 2. *У минулому році лабораторія провела 15 000 посівів діагностичних матеріалів у пробірки з середовищами Левенштейна-Єнсена і Фіна-П. Яку кількість гліцерину повинна закупити лабораторія на наступний рік, якщо на складі у неї зберігається 1500 мл цього реактиву?*

Завдання 3. *На 1 лютого 2010 року на складі лабораторії зберігається 5 г стрептоміцину з активністю 75,0 % і терміном придатності до червня 2011 р.; рифампіцину – 10,0 г з активністю 99,0 % і терміном придатності до червня 2011 р.; етамбутола – 500 мг з активністю 80,0 % і терміном придатності до 1 січня 2011 р. Зробіть висновок про раціональності проведених закупівель реактивів в цій лабораторії, якщо вона проводить 1000 досліджень чутливості до медикаментозних препаратів на рік.*

6 Забезпечення якості досліджень у бактеріологічній лабораторії протитуберкульозної служби

Забезпечення якості лабораторних досліджень є одним з основних напрямків діяльності будь-якої медичної лабораторії. Для реалізації цієї функції

лабораторія повинна розробити і впровадити систему забезпечення якості проведених досліджень.

Система забезпечення якості включає три основні складові (рис. 14):

- критерії, яким повинні відповідати якість досліджень в лабораторії;
- контроль якості досліджень (внутрішньолaborаторний контроль – ВЛК і зовнішня оцінка якості – ЗОЯ) – визначення відповідності якості досліджень встановленим у лабораторії критеріями;
- поліпшення якості досліджень – комплекс заходів, що вживаються для виправлення виявлених при контролі якості недоліків і поліпшення якості проведення досліджень.

Поняття якості лабораторних досліджень включає не тільки такі кількісні характеристики якості, як точність, правильність, специфічність або чутливість, відтворюваність, але і такі характеристики, як безпека проведення досліджень, ефективність роботи лабораторії в цілому, включаючи ефективність адміністративних заходів. У зв'язку з тим заходи по забезпеченню якості лабораторних досліджень повинні охоплювати всі сторони роботи лабораторії.

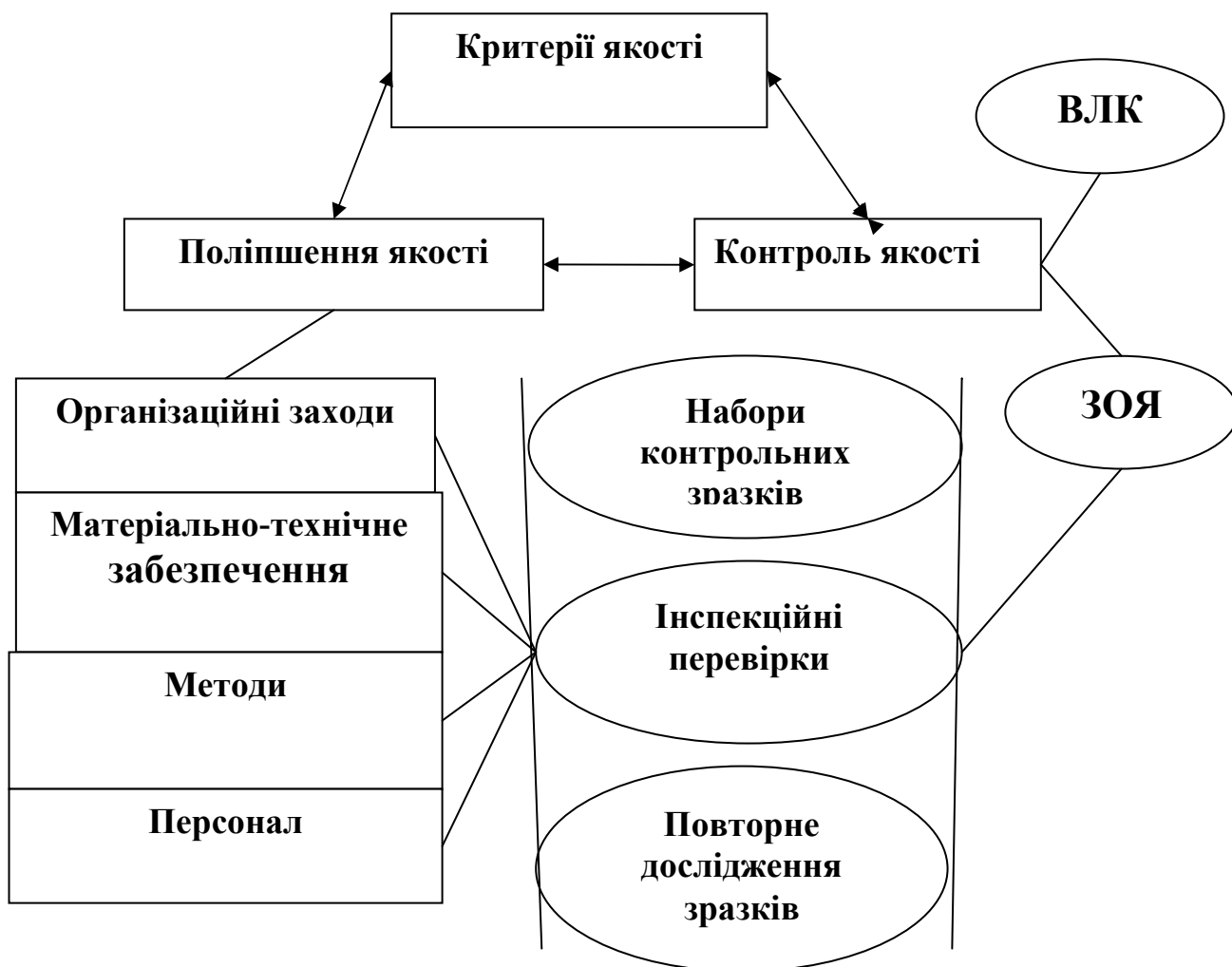


Рис. 14. Складові системи забезпечення якості клінічного лабораторного дослідження (ВЛК – внутрішньолaborаторний контроль якості, ЗОЯ – зовнішня оцінка якості).

Послідовно проведені заходи щодо забезпечення якості досліджень утворюють цикл, який дозволяє підняти якість досліджень на новий рівень. Моніторинг якості в процесі ВЛК і ЗОЯ дозволяє виявляти виникаючі проблеми та їх причини. Заходи по поліпшенню якості дозволяють ліквідувати виявлені недоліки і вимагають регулярного перегляду критеріїв якості.

Критерії якості залежать:

- від рівня науково-технічного розвитку лабораторної діагностики в цілому;
- потреб лікувального закладу;
- матеріально-технічного забезпечення і фінансування лабораторії.

По мірі розвитку наукових знань щодо природи захворювань і вдосконалення бази приладів та обладнання, ростуть потреби лікувального закладу в більш детальному описі патологічних процесів у конкретного пацієнта, відомості про які дозволяють отримати лабораторні дослідження.

Матеріально-технічне забезпечення лабораторії, визначається її фінансуванням, має відповідати запитам лікувального закладу, що нею обслуговується або, у випадку лабораторій протитуберкульозної служби, функціям лабораторії у протитуберкульозній програмі. При цьому необхідно враховувати, що кожне дослідження вимагає певного набору засобів забезпечення безпеки його проведення, обладнання, яке забезпечує його адекватну якість, реактивів, витратних матеріалів та в достатній кількості персоналу і відповідної їх кваліфікації.

НЕПРИПУСТИМО зниження собівартості досліджень за рахунок зниження безпеки їх проведення, виключення заходів з контролю якості (ВЛК та ЗОЯ), використання обладнання, реактивів і витратних матеріалів, які не відповідають встановленим стандартам, а також невідповідність фактичного навантаження кількості та кваліфікації персоналу

Критерії якості повинні охоплювати всі етапи досліджень, включаючи безпеку персоналу і навколишнього середовища. Критерії якості та інструкції по забезпеченню відповідності цим критеріям (у тому числі опису проведення досліджень, стандартних операційних процедур, інструкцій з біобезпеки та інші) повинні бути внесені до Настанови з якості.

6.1 Внутрішньолaborаторний контроль якості мікробіологічних досліджень

Інформація, яка отримана при мікробіологічних дослідженнях зразків з діагностики туберкульозу, повинна бути точною, надійною і відтворюваною. Метою ВЛК є гарантія отримання достовірних результатів досліджень, своєчасне виявлення проблем, які впливають на їх якість.

ВЛК повинен здійснюватися на регулярній основі в усіх лабораторіях. Кожен співробітник лабораторії відповідальний за якість проведених ним робіт і повинен проводити моніторинг відповідності виконуваних маніпуляцій встановленим у лабораторії критеріям або правилами.

Внутрішньолабораторний контроль якості являє собою оперативний контроль якості результатів досліджень до їх передачі до лікувального закладу. Іншими словами, жоден результат лабораторного дослідження не може бути переданий в клініку, якщо його достовірність не підтверджена задокументованими результатами ВЛК відповідних серій досліджень.

Зазвичай до ВЛК відносять контроль із застосуванням стандартних контрольних зразків. Проте, щоденний моніторинг відповідності проведених досліджень прийнятим в лабораторії інструкціям, методикам, правилам також відноситься до заходів внутрішньолабораторного контролю якості, виконання яких є обов'язком кожного співробітника лабораторії в обсязі, що відповідає його функціональним обов'язкам і компетенції. Внутрішній аудит, проведений керівництвом лабораторії, також можна віднести до ВЛК.

У ході внутрішніх аудитів, які регулярно проводяться, необхідно контролювати:

- планування та оптимізацію розташування функціональних зон лабораторії та обладнання;
- дотримання техніки безпеки у відповідності зі спеціалізацією лабораторії;
- якість доставленого матеріалу;
- техніку обробки матеріалу;
- дотримання затверджених стандартизованих методик;
- використання якісних реагентів;
- терміни придатності використовуваних реактивів і розчинів, правильність їх зберігання і відповідність їх зовнішнього вигляду стандарту;
- правильність і своєчасність видачі результатів;
- реєстрацію досліджень (контроль повинен бути спрямований, як на забезпечення правильного ведення журналів і оформлення результатів досліджень, так і на виявлення відхилень показників роботи від звичайного для цієї лабораторії рівня).

Планування та оптимізація розташування функціональних зон лабораторії та обладнання

Приміщення, в якому повинна розташовуватися мікробіологічна лабораторія, що здійснює дослідження з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу, має відповідати вимогам, які пред'являються до роботи з мікроорганізмами III групи патогенності. Приміщення повинне бути облаштовано автономною припливно-витяжною вентиляцією, водопроводом і каналізацією. Лабораторія повинна мати такі приміщення:

- офісну частину,
- для приготування живильних середовищ,
- прийму матеріалу на дослідження,
- бокс або біологічну шафу безпеки,
- термостатну,
- мікроскопну,

- автоклавну,
- мийну,
- матеріальну (докладний опис див. розділ 3.1).

Стіни приміщення і підлога повинні бути покриті матеріалом, який легко миється, стійкий до дії дезінфектантів. При організації досліджень повинна бути дотримана потоковість надходження досліджуваного матеріалу і роботи з ними – за напрямком від "чистої" зони до "брудної". Мікробіологічна лабораторія, що працює із збудниками 3-ї групи патогенності, повинна бути оснащена необхідним устаткуванням, що забезпечує безпечну роботу, посудом, витратними матеріалами.

Правильність використання приміщень лабораторії, робочий стан вентиляції та інших інженерних систем, робота обладнання у відповідності з встановленими у паспортах параметрами, достатність запасу витратних матеріалів, посуду і реактивів повинні регулярно контролюватися не тільки інженерними службами, але і керівником лабораторії або уповноваженою ним особою.

Контроль за дотриманням правил безпеки праці та біологічної безпеки

Дотримання правил техніки безпеки вважається задовільним, якщо приміщення, де проводяться дослідження, відповідає вимогам ДСП 9.9.5.-080-2002 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю».

Співробітники лабораторії повинні мати і правильно використовувати захисні засоби та одяг, що включає халат, шапочку, фартух, рукавички і респіратори, які забезпечують затримку понад 95,0 % часток діаметром більше 1 мкм. Співробітники лабораторії повинні дотримуватися правил техніки безпеки і застосовувати безпечні маніпуляції при проведенні досліджень.

Щоденний контроль за дотриманням правил техніки безпеки є обов'язком як керівника лабораторії, так і всіх її співробітників.

Контроль якості доставленого матеріалу

Організація прийому діагностичного матеріалу вважається задовільною, якщо дотримуються наступних вимог.

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

■ Направлення та інші супровідні документи доставляються окремо від контейнерів з мокротою. Направлення, забруднені матеріалом, автоклавуються або піддаються термічній обробці у сухожаровій шафі при 85 °С протягом 45 хвилин.

■ У направленні надається повна інформація про хворого: ім'я, прізвище, адреса, вік, стать, мета дослідження, реєстраційний номер хворого (за умови аналізу для контролю хіміотерапії), прізвище лікаря і назва медучастини, що направили матеріал, категорія хворого (раніше лікований або новий випадок до початку лікування), дата збору матеріалу. На контейнері також повинна бути

інформація для однозначної ідентифікації проби. Контейнери, на яких неможливо розібрати напис, не приймаються на дослідження.

- При прийомі матеріалу проводиться його вибракування відповідно до встановлених правил. Вибраковані матеріали і причини їх вибракування повинні реєструватися в журналі.

- Необхідно зазначати характер діагностичного матеріалу в лабораторному журналі і в бланку результатів дослідження.

- Розбиті або протікаючи контейнери з діагностичним матеріалом негайно стерилізуються, реєструються у журналі вибраковування, і надсилають запит на повторний забір матеріалу.

Моніторинг якості матеріалу, що доставляється на дослідження, повинен проводитися щодня. При виявленні недоліків співробітники лабораторії повинні вжити заходів щодо їх усунення: провести навчання медперсоналу, який здійснює взяття матеріалу, інформувати керівництво медустанови про виявлені недоліки та їх наслідки для підвищення ефективності лабораторної діагностики.

Дотримання стандартних методик

Для проведення лабораторних досліджень з метою діагностики і контролю хіміотерапії туберкульозу лабораторія повинна застосовувати тільки затверджені наказом Міністерства охорони здоров'я України методи.

Лабораторія повинна мати опис застосовуваних методів і прописи реактивів. Опис виконання кожної методики, використовуваної в лабораторії, повинен бути доступним для співробітників. Керівник лабораторії повинен регулярно перевіряти відповідність проведених в лабораторії маніпуляцій затвердженим методикам.

Контроль правильності реєстрації досліджень

Реєстрація досліджень повинна проводитися при надходженні матеріалу в лабораторному журналі. Дані про пацієнта і мета дослідження вносяться до журналу на підставі направлень. Результати досліджень також вносяться в лабораторний журнал.

Негативну відповідь лікарю, який направив матеріал на дослідження, заповнюється згідно з формою не пізніше, ніж через 10 тижнів після посіву. При отриманні позитивного результату негайно видається попередня відповідь. Така ж форма заповнюється у разі проросту матеріалу: необхідно направити вимогу на ще одну пробу і повторити аналіз. Остаточна відповідь про результати посіву видається після проведення визначення виду мікобактерій і визначення чутливості їх до медикаментозних препаратів. Результати визначення виду мікобактерій і чутливості до медикаментозних препаратів вносяться у спеціальні журнали. Усі результати дослідження для кожного хворого заносяться в комп'ютерну базу даних і/або бактеріотеку. *Усі лабораторні документи повинні зберігатися не менше 2 років!*

Правильність ведення реєстраційних журналів, картотеки, своєчасність видачі результатів повинна регулярно контролюватися керівником лабораторії.

При перевірці реєстраційних журналів керівник лабораторії щомісяця повинен моніторити такі індикатори, як:

- кількість проведених досліджень;
- частка проростів;
- частка позитивних результатів;
- частка зразків, дослідження яких методом мікроскопії дало позитивний результат, а методом посіву – негативний.

Відхилення цих показників від звичайних для даної лабораторії повинні своєчасно виявлятися, їх причини аналізуватися, і, при виявленні недоліків у проведенні дослідження, вони повинні усуватися. Ефективність заходів щодо виправлення недоліків повинна контролюватися.

6.2 Зовнішня оцінка якості досліджень

Зовнішня оцінка якості є ретроспективною оцінкою якості результатів після *передачі їх до лікарні*: вона дозволяє підтвердити відповідність якості проведених в лабораторії досліджень встановленим критеріям або виявити неадекватність проведеного в лабораторії ВЛК.

Існують різні методи ЗОЯ:

- перевірка якості досліджень при відвідуванні лабораторій;
- дослідження набору контрольних зразків;
- повторне дослідження рутинних зразків;
- ретроспективний аналіз показників роботи лабораторії.

Перевірка якості досліджень при відвідуванні лабораторій – найбільш ефективний метод оцінки і поліпшення якості, оскільки дозволяє не тільки виявити недоліки на усіх етапах лабораторного дослідження, але і дати рекомендації щодо їх виправлення і провести навчання персоналу на місці. Однак цей метод є найбільш дорогим, оскільки передбачає відволікання від роботи висококваліфікованого фахівця, витрати на відрядження до лабораторії.

ЗОЯ із застосуванням набору контрольних зразків є найбільш доступним заходом оцінки якості досліджень у великій кількості лабораторій. Однак цей метод має певні обмеження: зазвичай, він дозволяє оцінити тільки аналітичний етап дослідження. При мікробіологічних дослідженнях зразки, які вивчаються в даний час, не дозволяють оцінити якість деконтамінації і концентрації проб. Цей метод не дозволяє оцінити правильність реєстрації зразків, правильність інтерпретації та оформлення результатів, дотримання вимог безпеки при проведенні досліджень. Крім того, як правило, не вдається забезпечити дослідження контрольних зразків у тих же умовах, що і проб від пацієнтів. Тому цей метод дозволяє виявити грубі помилки при проведенні досліджень.

При усіх недоліках оцінки якості із застосуванням контрольних зразків цей метод широко застосовується у світі для оцінки якості мікроскопічних досліджень і досліджень чутливості до медикаментозних препаратів.

ЗОЯ із застосуванням контрольних зразків має широко застосовуватись у нашій країні за наступними розділами лабораторної діагностики туберкульозу:

- мікроскопічне виявлення кислотостійких мікобактерій методами світлової і люмінесцентної мікроскопії;

- культуральні виявлення мікобактерій туберкульозу;
- дослідження чутливості мікобактерій туберкульозу до медикаментозних препаратів;
- ПЛР–виявлення мікобактерій туберкульозу.

Повторне дослідження рутинних зразків може бути застосовне не для усіх видів досліджень, а тільки для тих, які дозволяють зберегти проби після завершення їх дослідження (наприклад, пофарбовані мазки для мікроскопії, культури для визначення виду або чутливості до медикаментозних препаратів). Необхідно врахувати, що кількість зразків, підданих повторному дослідженню, а також метод їх вибору повинні забезпечувати статистичну достовірність результатів зовнішньої оцінки якості. Цей метод вимагає значних витрат на залучення висококваліфікованих фахівців та інших ресурсів експертних лабораторій, витрат на транспортування зразків.

Підтвердження діагнозу окремого пацієнта не є метою повторного тестування зразків. Мета повторного тестування – найбільш повне виявлення недоліків у проведенні досліджень у лабораторії.

При діагностичному дослідженні на туберкульоз метод повторного тестування зразків широко застосовується для оцінки якості мікроскопічних досліджень за методом Ціля-Нільсена і досліджень чутливості до медикаментозних препаратів. У разі мікроскопічних досліджень розроблена і опублікована методика розрахунку та проведення статистично достовірної вибірки мазків, оцінки якості зразків експертом. Прийнята у світі методика передбачає проведення випадкової вибірки зразків для тестування і проведення "сліпого" повторного тестування (експерти не знають результатів оцінки мазків у лабораторії). Рекомендовано проводити вибірку з усіх мазків, а не окремо негативних і позитивних.

У нашій країні повторне дослідження мазків для оцінки якості мікроскопії за методом Ціля-Нільсена і чутливості виділених культур мікобактерій до медикаментозних препаратів проводиться у регіонах установами протитуберкульозної служби.

Метод ретроспективного аналізу показників роботи лабораторії дозволяє оцінити відповідність зареєстрованих показників якості проведених досліджень встановленим стандартам (наприклад, частка позитивних результатів серед усіх культуральних досліджень, частка проростів, частка виділення не туберкульозних мікобактерій, тощо). Цей метод ЗОЯ не потребує значних витрат, проте надає обмежену інформацію для оцінки якості досліджень, проведених в лабораторії. Він може застосовуватися як складова частина перевірок якості при відвідуванні лабораторій, а також при внутрішніх аудитах лабораторії.

6.3 Заходи щодо поліпшення якості досліджень

Заходи щодо поліпшення якості досліджень є обов'язковими в рамках програми по забезпеченню якості в лабораторії. Проведення ВЛК і ЗОЯ позбавлено глужду, якщо лабораторія не має можливості усунути виявлені недоліки або не вживає заходів щодо їх усунення.

Заходи щодо поліпшення якості можна розділити на адміністративні, спрямовані на вдосконалення методичної бази, поліпшення якості реактивів, витратних матеріалів, обладнання та його обслуговування, на підтримання та підвищення кваліфікації персоналу.

Адміністративні заходи по поліпшенню якості спрямовані на більш раціональний розподіл обов'язків та організацію виконання досліджень. Керівництво лабораторії має проводити регулярний перегляд методик, що застосовуються, з урахуванням підвищення їх ефективності, відповідності чинним нормативним документам та вимогам лікувального закладу і рівнем фінансування лабораторії.

Якість і достатня кількість обладнання лабораторій, а також якість і кількість необхідних реактивів і витратних матеріалів є обов'язковою умовою отримання достовірних результатів дослідження. При проведенні досліджень з діагностики туберкульозу повинні використовуватися відповідні кожній процедурі реактиви, прилади та лабораторне обладнання, зазначені в наказах МОЗ України від 06.02.2002 № 45 та від 16.07.2008 № 388.

У рамках поліпшення якості досліджень, необхідно аналізувати якість обладнання, що надійшло у лабораторію, реактивів і витратних матеріалів, умови їх поставки. Керівництво лабораторії спільно з адміністрацією медучастини, до якої вона належить, повинна формувати вимоги до обладнання, витратних матеріалів і реактивів, необхідних для проведення досліджень, до умов їх поставки, а також вимоги до організацій, що проводять установку і технічне обслуговування обладнання.

Для підвищення кваліфікації персоналу необхідно проведення навчання стандартизованими методами дослідження, планування та організації роботи лабораторії, техніки безпеки та режиму біологічної безпеки при роботі з інфекційним матеріалом. Крім того, необхідно проводити повторні курси, що дозволяє поновити знання персоналу, обмінятися досвідом і обговорити проблеми, що виникають у рутинній роботі.

Ефективність заходів щодо поліпшення якості роботи повинна відслідковуватися з допомогою внутрішньолaboratorного і зовнішнього контролю якості.

Затверджені правила проведення ВЛК (включаючи методи проведення ВЛК з використанням стандартних зразків, внутрішні аудити, форми реєстрації їх результатів) і ЗОЯ, реєстрація заходів з поліпшення якості, їх ефективності, правила закупівлі, зберігання, використання та списання обладнання, реактивів і витратних матеріалів повинні бути представлені у Настанові з якості. Рішення про перегляд критеріїв якості на підставі вищезгаданих заходів повинні документуватися і фіксуватися в Настанові з якості. В цьому випадку повинна бути оформлена нова версія цього документа.

Питання:

1. *Складіть список питань, які повинні перевірятися при внутрішньому аудиті процесів деконтамінації і посіву матеріалу.*

2. Як проводиться внутрішньолaboratorний контроль якості процесів деконтамінації і посіву у вашій лабораторії?
3. Перелічіть методи зовнішньої оцінки якості, застосовувані для laboratorних досліджень при діагностиці туберкульозу. Які методи застосовуються для оцінки якості роботи вашої лабораторії?
4. Зовнішня оцінка якості виявила систематичну помилку у вашій лабораторії при визначенні чутливості до стрептоміцину. Які Ваші дії для виправлення ситуації?

Перелік обладнання та витратних матеріалів для бактеріологічної лабораторії протитуберкульозної служби

Нормативи оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів затверджені наказом МОЗ України від 16.07.2008 р. за № 388 «Про затвердження Нормативів оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів», зареєстрованому в Мінюсті 04.08.2008 р. за № 719/15410, і наведені у таблицях А і В.

Таблиця А

Нормативи оснащення лабораторій з мікробіологічної діагностики туберкульозу 1–4 рівнів» (включаючи мікроскопічні дослідження в лабораторіях 1 рівня і дослідження на нетуберкульозну інфекцію)

№ з/п	Найменування обладнання	Лабораторія			
		1 рівня ¹ , кількість од.	2 рівня ² , кількість од.	3 рівня ³ , кількість од.	4 рівня ⁴ , кількість од.
1	Ламінарний бокс 2 класу	—	2	3	4
2	Ламінарний бокс 1 класу	1	1	—	1
3	Витяжна шафа	1	—	—	—
4	Мікроскоп бінокулярний з імерсійними об'єктивами 100 х, окулярами та електричними джерелами світла	1	2	3	4
5	Мікроскоп люмінесцентний	—	—	1	1
6	Мікроскоп для демонстрації з відео та монітором	—	—	—	1
7	Центрифуга лабораторна з кришкою потужністю не <3000 g, з кутовим ротором та стаканами з кришкою, що загвинчуються	—	2	2	2
8	Сухожарова шафа з t	—	1	2	2

	до 250 °С				
9	Термостат 400–500 л	–	2	4	5
10	Автоклав: – для дезінфекції – для стерилізації	–	2	2	2
11	Апарат для згортання яєчних середовищ	–	1	2	2
12	Холодильник побутовий	1	4	6	6
13	Морозильна камера (– 45 – 60) °С	–	–	1	1
14	Ваги аналітичні (0,1 мг)	1	1	2	2
15	Ваги аналітичні (0,01 мг)	–	–	1	2
16	Прилад для визначення каламутності бактеріальної суспензії	–	1	2	2
17	Дистилятор	1	1	1	1
18	рН-метр	–	1	1	1
19	Водяна баня	–	1	1	1
20	Міксер Vortex	–	1	2	2
21	Магнітна мішалка з підігрівом	–	1	1	2
22	Прилад для прожарювання бактеріологічних петель в ламінарному боксі	–	3	4	5
23	Інкубатор-пічка для висушування та фіксації мазків	2	2	2	2
24	Набір дозаторних піпеток	–	4	8	8
25	Набір диспенсерів для розливу рідин (у т.ч. живильних середовищ) об`ємом 1,0 – 20,0 мл	–	2	3	3
26	Бактеріологічні петлі	–	4	6	6
27	Штатив для фарбування мазків	1	2	3	3

28	Комплект обладнання та витратні матеріали для ПЛР діагностики	—	—	—	1
29	Автоматичний інкубатор для культуральної діагностики туберкульозу з витратними матеріалами	—	—	1	1
30	Комп'ютер з комплектуючими і програмами (робоче місце бактеріолога, ідентифікаційні програми, епідмоніторинг та інше)	—	1	1	2
31	Опромінювач бактерицидний	у кожне робоче приміщення	у кожне робоче приміщення	у кожне робоче приміщення	у кожне робоче приміщення
32	Контейнер для збирання біоматеріалу (одноразовий або з прозорого скла з кришкою, що герметично загвинчується)	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
33	Контейнер для транспортування (пересилання) контейнерів із біологічним матеріалом (культурою)	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
34	Реактиви для передпосівної обробки біоматеріалу	—	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
35	Набори барвників для фарбування за Цілем-Нільсеном та за Грамом	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи

36	Набори реактивів для люмінесцентної мікроскопії	—	—	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
37	Живильні середовища для культуральних досліджень на мікобактерії туберкульозу та неспецифічну мікрофлору	—	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
38	Набори тестів для видової ідентифікації мікобактерій та неспецифічної мікрофлори	—	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
39	Набори для визначення стійкості до протитуберкульозних препаратів 1 і 2 рядів (або чисті субстанції)	—	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
40	Лабораторний посуд одноразовий та скляний (мірний, предметні скельця, пробірки, чашки Петрі та інш.)	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
41	Набір лабораторних меблів для бактеріологічної лабораторії	залежно від кількості приміщень та їх площі	залежно від кількості приміщень та їх площі	залежно від кількості приміщень та їх площі	залежно від кількості приміщень та їх площі
42	Диски з антибактеріальними препаратами широкого спектра дії	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи
43	Електричні стаціонарні плити для приготування живильних середовищ	—	2	2	2
44	Ємності для автоклавування	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи	залежно від обсягів роботи

Примітки:

- 1 – лабораторії 1-го рівня (пункти мікроскопії) – лабораторії лікувально-профілактичних закладів, які виконують тільки мікроскопічні дослідження на туберкульоз;
- 2 – лабораторії 2-го рівня – міські, районні лабораторії протитуберкульозних закладів, які виконують мікроскопічні та мікробіологічні дослідження на туберкульоз;
- 3 – лабораторії 3-го рівня – обласні, місця Київ та Севастополь, лабораторії протитуберкульозних закладів, які виконують мікроскопічні мікробіологічні дослідження на туберкульоз, уключаючи ідентифікацію та визначення медикаментозної стійкості *M. tuberculosis*;
- 4 – лабораторія 4-го рівня – Центральна референс-лабораторія з мікробіологічної діагностики туберкульозу МОЗ України.

Таблиця В

Орієнтовний перелік лабораторного посуду, інструментів і витратних матеріалів, необхідних для дослідження 10 000 зразків на рік

№	Найменування	Кіль-ть
	Лабораторний посуд і інструменти	
1	Пробірка біологічна ПБ-16, діаметром 16мм (16x150 мм) з нерозгорнутим краєм, товстостінна	12000
2	Пробка силіконова двоконусна ПС 14,5 (для пробірок див. п. 1)	6000
3	Колби скляні (бажано з боросилікатного скла), конічні, градуйовані, термостійкі, з вузьким горлом:	
	на 250 мл	30
	на 500 мл	20
	на 1000 мл	10
4	Колби круглі плоскодонні:	
	на 250 мл	2
	на 500 мл	2
5	Стакани скляні мірні, градуйовані, термостійкі (бажано з боросилікатного скла):	
	на 100 мл	5
	на 250–300 мл	5
	на 500–600 мл	5
	на 1000мл	5
6	Циліндри мірні, скло або пластик, який підлягає автоклавуванню:	
	на 25,0 мл	2
	на 100 мл	2
	на 250 мл	2
	на 500 мл	2
	на 1000 мл	2
7	Воронки хімічні (лабораторні), конічні, скляні, з вузьким носиком	2

	діаметром 75–110 мм діаметром 100–150 мм	4
8	Бутель, коричневе скло, з кришкою, що загвинчується: на 200 мл на 500 мл на 1000 мл	3 5 5
9	Флакони для реагентів: на 50 мл на 100 мл на 250 мл на 500 мл на 1000 мл	10 10 5 5 2
10	Піпетки скляні, вимірювальні, градуйовані, на повний злив: на 1,0 мл на 2,0 мл на 5,0 мл на 10,0 мл	300 200 100 100
11	Промивна бутель Nalgene, з пластику, який підлягає автоклавуванню, на 500 мл (можлива заміна аналогом)	5
12	Промивна бутель LDPE, пластикова, на 250 мл (можлива заміна аналогом)	10
13	Дозувальна бутель, пластикова, на 100 мл	5
14	Крапельниця пластикова, 10 мл	5
15	Кружки пластикові: на 500 мл, на 1000 мл, на 2000 мл	по 2
16	Штативи пластикові, які можна автоклаувати, на 24 гнізда, для центрифужних пробірок об'ємом 50 мл, діаметром 30 мм	8
17	Штативи пластикові на 72 гнізда, які можна автоклаувати, для пробірок діаметром 16 мм	10
18	Груша силіконова для піпеток	5
19	Жерстяні пенали для стерилізації піпеток	4
20	Термометр	2
21	Скляні палички, 250 мм	100
22	Лопаточка бактеріологічна з ніхрому з тримачем	50
23	Петля мікробіологічна з ніхрому з тримачем (діаметром 3 мм)	10
24	Пінцет, 15–20 см (анатомічний, без лапок)	2
25	Ножиці, неіржавіюча сталь, 25 см	4
26	Штатив («санчата») для фарбування мазків	2
27	Штатив для сушіння мазків на 12–25 мазків	6
28	Коробка для зберігання мазків на 25100 мазків	20
29	Емальований піддон	2
30	Контейнер для рідких відходів, термостійкий	2
31	Піддон для твердих відходів з неіржавіючої сталі або пластиковий	2
32	Шпателі для зважування наважок із неіржавіючої сталі: з лопаткою на 15 см, з двома мікролопаточками	2

33	Контейнер скляний широкогорлий для збору діагностичного матеріалу з прозорого (бажано) або темного скла об'ємом 100 – 125 мл	3000
34	Бікси для транспортування і знезараження інфекційного матеріалу (коробки стерилізаційні без фільтрів – КСК): об'ємом 6 л обсягом 9 л об'ємом 12 л	10 10 5
35	Пластикова каністра для дистильованої води, 50 л	1
36	Збільшувальне скло ×10	1
37	Маркери водостійкі	10
38	Пробірки боросилікатні на 30 мл з кришкою – гвинт (для постановки тестів на чутливість МБТ)	500
39	Намисто - скляні кульки, боросилікатні, діаметром 3мм (для постановки тестів на чутливість МБТ)	1кг (2уп.)
Витратні матеріали		
1	Центрифужна пробірка пластикова, об'ємом 50мл, конічна, стерильна, з кришкою, що загвинчується, розмір пробірок 114x28 мм (за розмірами повинні бути сумісні з наявною центрифугою). Пробірки упаковані з 25–50 штук в поліетиленові пакети (без штативів)	12000
2	Контейнери для мокротиння пластикові одноразові	12000
3	Пастерівські піпетки для посівів, пластикові одноразові, стерильні на 3–3,5 мл, градуйовані, 0,25 мл (уп./10 шт.)	12000
4	Скельця предметні для мікроскопа (25x75x1,2 мм)	15000
5	Фільтрувальний папір або фільтри діаметром 15 см № 1	15 кор.
6	Серветка для протирання лінз мікроскопа	8 кор.
7	Папір для зважування, пергаментний: розмір 150x150 мм, 500 аркушів в упаковці розмір 75x75 мм, 500 аркушів в упаковці	по1уп.
8	Стрічка індикаторна для автоклава	2 уп. (12 шт.)
9	РН-папір або стрічка	2 рул.
10	Парафільм	1
11	Воскові олівці	10
12	Кулькова ручка, чорна або синя	24
13	Кулькова ручка, червона	12
14	Бавовняна вата	4 кг
15	Марля	10 м
16	Рукавички латекс, одноразові, medium, розмір № 7	2000
17	Одноразові халати	250/люд
18	Шапочки одноразові	250/люд
19	Бахіли одноразові	250/люд
20	Маски захисні (протиаерозольні респіратори) одноразові марки 3М (ступінь захисту FFP2 або FFP3)	300

Видова ідентифікація нетуберкульозних мікобактерій

До нетуберкульозних мікобактерій належать всі культури, що дали ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм або на середовищі з ПНБК, і підлягають ідентифікації до виду.

Видова ідентифікація НТМБ за ступенем складності методик, що використовуються, поділяється на первинну і остаточну.

Первинна ідентифікація заснована на морфологічних і фенотипічних властивостях мікобактерій і проводиться у лабораторіях II рівня. Знання видової належності мікобактерій визначає подальшу тактику лікаря. Так, однократне виділення з діагностичного матеріалу потенційно-патогенних мікобактерій вимагає повторного бактеріологічного обстеження хворого. Часті знахідки сапрофітних мікобактерій, широко поширених у природі, у матеріалі від хворих, особливо *M. gordonae*, можуть вказувати на контамінацію матеріалу при заборі, на забруднення водопровідної або дистильованої води.

Остаточна ідентифікація заснована на поглибленому вивченні біохімічних властивостей і культуральних потреб мікобактерій і здійснюється у лабораторіях III рівня.

Первинна ідентифікація НТМБ

Первинна ідентифікація заснована на таких ознаках, як:

- швидкість росту;
- здатність до утворення пігменту;
- здатність до росту при різних температурах.

Для виявлення цих ознак не потрібно спеціального обладнання і реактивів, тому їх можна вивчати в бактеріологічних лабораторіях ПТД. Рекомендується мати додатковий термостат з температурою 45 °С.

Швидкість росту

Швидкість росту мікобактерій – це час, необхідний для формування видимих зрілих колоній на щільному середовищі.

Мікобактерії, які формують такі колонії протягом 7 днів, називаються **швидкоростучими**. До групи швидкоростучих мікобактерій належать *M. fortuitum* і *M. chelonae*, для повного росту яких потрібно не більше 5 діб. Однак, при виділенні з патологічного матеріалу швидкоростучі мікобактерії можуть мати більш тривалий період росту.

Мікобактерії, яким для формування колоній необхідний більш тривалий період часу, називаються **повільноростучими**. До них належать *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi* та ін. В той же час, надлишок посівного матеріалу може бути причиною швидкої появи росту повільноростучих мікобактерій. Крім того, облік швидкості росту необхідно проводити з часу утворення сформованих колоній, а не за появою ініціального росту. Швидкість росту мікобактерій оцінюють за швидкістю росту субкультури.

Методика виконання:

0,1 мл суспензії досліджуваної культури у стандартному розведенні засівають на середовище Левенштейна-Єнсена, інкубують при температурі

37 °C. Спостереження за культурою перші 5–7 діб щоденне, далі – щотижня, до моменту появи сформованих колоній.

За швидкістю росту культури можна спостерігати при визначенні чутливості мікобактерій до медикаментозних препаратів. Враховувати результати чутливості швидкозростаючих мікобактерій до медикаментозних препаратів можна через 5–7 діб, повільно ростучих – через 21 добу.

Визначення здатності до росту при різних температурах

Методика виконання

1. Приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5.

2. Розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду).

3. Засіяти по 0,2 мл суспензії у 4 пробірки з середовищем Левенштейна-Єнсена.

4. Інкубувати засіяні пробірки при 22, 28, 37 і 45 °C.

Майже усі види НТМБ добре ростуть при 22 °C. При температурі 45 °C ростуть 86,0 % культур *M. avium* і всі культури *M. xenopi*.

Здатність продукувати пігмент

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

1. Фотохромогенні мікобактерії. Продукують жовтий пігмент тільки під дією світла, у темряві вони мають кремовий колір. Типовим представником цієї групи є *M. kansasii*.

2. Скотохромогенні мікобактерії. Продукують пігмент від інтенсивно жовтого до помаранчевого кольору при рості як при світлі, так і в темряві. До них належать *M. gordonae* і *M. xenopi*.

3. Нехромогенні мікобактерії. Не утворюють пігмент, їх колонії мають тільки білуваті або кремові відтінки. У цю групу входять *M. avium*, *M. malmoens*, *M. terrae complex* та ін. Серед них зустрічаються культури, які змінюють забарвлення у процесі старіння або при несприятливих умовах росту (22 °C).

Визначення фотохромогенних властивостей мікобактерій

Методика виконання

1. Приготувати суспензію досліджуваної культури в ізотонічному розчині натрію хлориду за стандартом мутності № 5.

2. Розвести у десять разів (0,5 мл суспензії додати до 4,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду).

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

4. Інкубувати при температурі 37 °C.

5. Через 8–10 діб з'являється ініціальний ріст культури. Взяти одну з пробірок, звільнити від фольги і помістити на 2 год. під яскраве сонячне або електричне світло. Після закінчення дії світла пробірку маркують написом "світло" і продовжити інкубацію в термостаті при температурі 37 °С.

6. Через 1–2 доби перевіряють забарвлення культури. Якщо під впливом світла культура в пробірці "світло" набула жовтого забарвлення, а в контрольній пробірці залишилася кремовою, то це фотохромогенна культура.

На підставі застосування найпростіших бактеріологічних методів, що дозволяють виявити специфічні ознаки НТМБ, а також використовуючи вже описані вище саліцилатний тест і визначення нітратредуктази, можна провести первинну ідентифікацію мікобактерій (таблиця С).

Таблиця С

Характеристика видів нетуберкульозних мікобактерій, що найчастіше зустрічаються у клінічному матеріалі

Види мікобактерій	Швидкість росту	Пігментація колоній	Ріст при температурі		Відновлення нітратів	Деградація саліцилату натрію
			22 °С	45 °С		
<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	П	Н	+	+	–	–
<i>M. xenopi</i>	П	С	–	+	–	–
<i>M. kansasii</i>	П	Ф	+	–	+	–
<i>M. malmoense</i>	П	Н	+	–	–	–
<i>M. scrofulaceum</i>	П	С	+	–	+	–
<i>M. gordonae</i>	П	С	+	–	–	–
<i>M. terrae complex</i>	П	Н	+	–	+	–
<i>M. fortuitum</i>	Ш	Н	+	–	+	+
<i>M. chelonae</i>	Ш	Н	+	–	–	+
<i>M. flavescens</i>	Ш	С	+	–	+	–

Примітка: П – повільно ростучі, Ш – швидкоростучі, С – скотохромогенні, Ф – фотохромогенні, Н – нехромогенні.

Так, якщо швидкозростаюча мікобактерія має позитивний результат щодо деградації саліцилового натрію, то це може бути *M. fortuitum* або *M. chelonae*.

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

За здатністю росту при 45 °С можна розрізнити *M. avium* (росте) і не ростуть представники *M. terrae complex*.

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

Остаточна ідентифікація

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

Результати первинних досліджень мікобактерій дозволяють вибрати біохімічні тести, необхідні для остаточної ідентифікації НТМБ (схеми А, В, С, Е).

Схема А

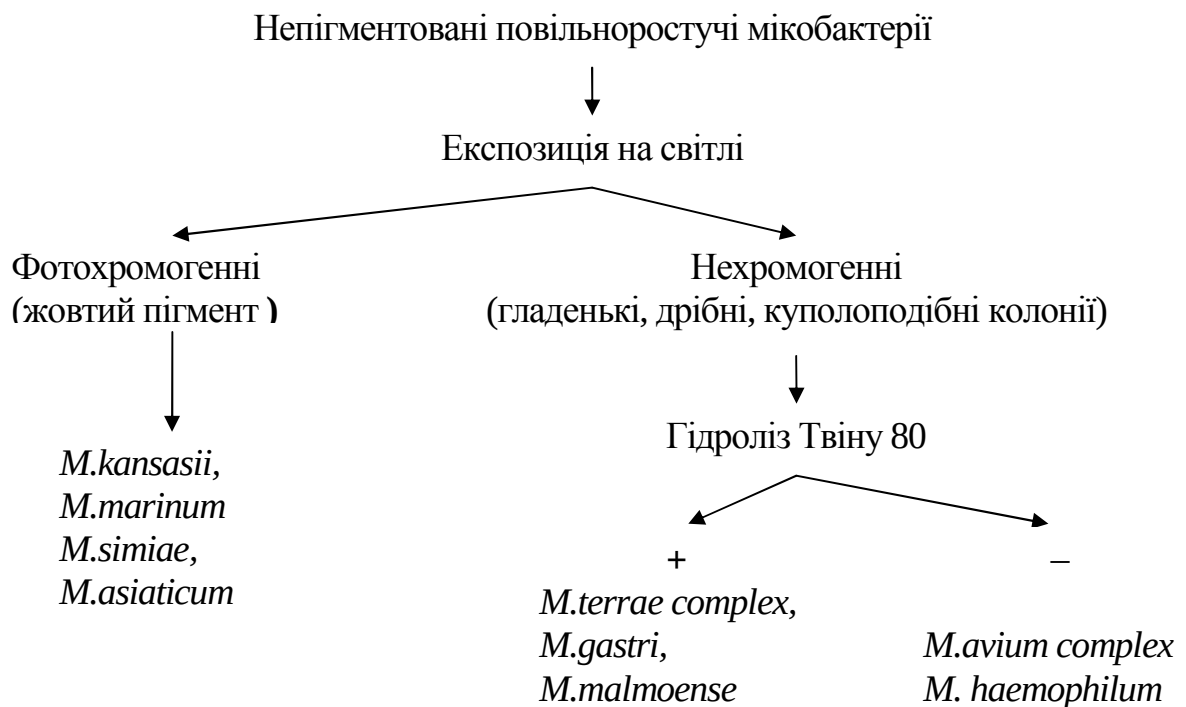
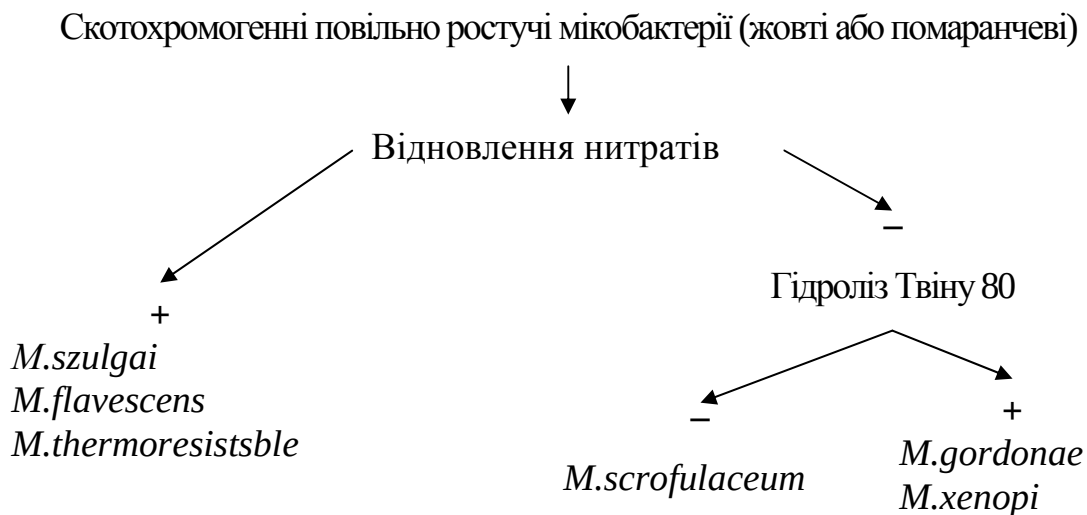
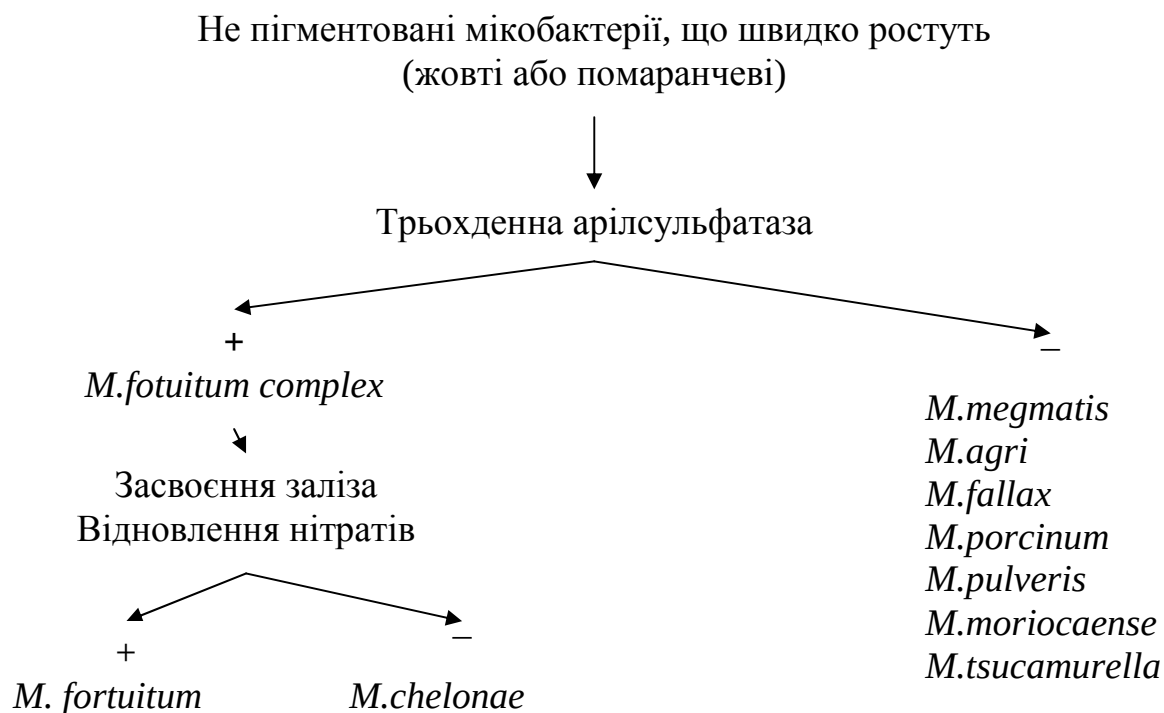


Схема В





Біохімічний профіль і морфологічні властивості досліджуваного штаму слід порівняти з даними таблиці Е, щоб визначити вид мікобактерії.

Таблиця Е

Характеристика видів нетуберкульозних мікобактерій, що найчастіше зустрічаються у клінічному матеріалі

Властивості культури	<i>M. avium</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. terrae</i> <i>complex</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. vaccae</i>
Швидкість росту	П	П	П	П	П	П	П	Ш	Ш	П	Ш	Ш
Пігментація колоній	Н	С	Ф	Н	С	Н	С	Н	Н	Ф	Н	С
Ріст при температурі 22 °С 45 °С	± ±	± +	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ +	+ -
Відновлення нітратів	-	-	+	-	-	±	-	+	-	-	+	+
Деградація саліцилового натрію	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-
Каталаза 68 °С	+	±	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+
Гідроліз Твіну 80	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl	-	-	-	-	-	±	-	+	В	-	+	В

Примітка: П – такі, що повільно ростуть, Ш – такі, що швидко ростуть, Н – не хромогенні, С – скотохромогенні, Ф – фотохромогенні, В – варіює.

Визначення мутності бактеріальної суспензії

Приготування стандарту мутності за МакФарландом в умовах лабораторії

У якості стандарту мутності МакФарланда застосовується суспензія слаботорозчинної у воді солі сульфату барію. Для її приготування використовують наступні розчини: $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 % розчин, H_2SO_4 – 1,0 % розчин.

Для отримання суспензії необхідної мутності змішують розчини хлориду барію і сірчаної кислоти в певних пропорціях (табл. Д).

Стабільність стандарту МакФарланда – 6 місяців при зберіганні у темряві.

Таблиця Д

Одиниці мутності за стандартом МакФарланда	Число мікробних тіл/мл	Кількість 1,0 % розчину $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (мл)	Кількість 1,0 % розчину H_2SO_4 (мл)
0,5	$1,5 \times 10^8$	0,05	9,95
1,0	$3,0 \times 10^8$	0,1	9,9
2,0	$6,0 \times 10^8$	0,2	9,8
3,0	$9,0 \times 10^8$	0,3	9,7
4,0	$12,0 \times 10^8$	0,4	9,6
5,0	$15,0 \times 10^8$	0,5	9,5
6,0	$18,0 \times 10^8$	0,6	9,4
7,0	$21,0 \times 10^8$	0,7	9,3
8,0	$24,0 \times 10^8$	0,8	9,2
9,0	$27,0 \times 10^8$	0,9	9,1
10,0	$30,0 \times 10^8$	1,0	9,0

Визначення мутності бактеріальної суспензії за допомогою приладів



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