

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН

Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии

И.А. Дятлов

« 24 » 22 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза
(XDR-ТЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза (XDR - тест) предназначен для ускоренного определения устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к изониазиду, рифампицину, канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину. Устойчивость к четырем основным препаратам: изониазиду, рифампицину, офлоксацину и, по крайней мере, одному из инъекционных препаратов: канамицину, амикацину или капреомицину, — определяет XDR-туберкулез.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

XDR - тест представляет собой набор готовых к использованию питательных сред, содержащих противотуберкулезные препараты: изониазид, рифампицин, канамицин, амикацин, капреомицин и офлоксацин и сред без препаратов - контроль. Основой питательных сред является модифицированная среда Левенштейна-Йенсена, которая содержит нитрат натрия в концентрации 1 г/л и поддерживает рост микобактерий туберкулеза. Питательные среды разлиты по 6 мл в стеклянные флаконы объемом 20 мл.

2.1 Состав XDR-теста

XDR - тест выпускается комплектом, состоящим из девяти флаконов, двух стерильных шприцев и цветовой шкалы для регистрации интенсивности окраски. Два флакона (№1) со-

держат готовую к употреблению контрольную питательную среду без препарата. Каждый из флаконов №№2-7 содержит готовую к употреблению питательную среду и один из препаратов в соответствии с таблицей, приведенной ниже. Флакон № 8 содержит сухой реактив Грисса.

№ флакона	Содержимое	Кол-во
1.	Питательная среда - без препарата (контроль)	2
2.	Питательная среда с 1 мкг/л изониазида	1
3.	Питательная среда с 40 мкг/мл рифампицина	1
4.	Питательная среда с 30 мкг/мл канамицина	1
5.	Питательная среда с 30 мкг/мл амикацина	1
6.	Питательная среда с 30 мкг/мл капреомицина	1
7.	Питательная среда с 3 мкг/мл офлоксацина	1
8.	Реактив Грисса, сухой; 0,375 г	1

Питательные среды во флаконах №№1-7 представляют собой скошенный гель от желто-зеленого до голубого цвета, а реактив Грисса - кристаллический порошок серовато-розового цвета. Все флаконы завальцованы алюминиевыми колпачками и маркированы соответствующими этикетками.

2.3 Принцип действия

Определение устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам основано на выявлении нитратредуктазной активности. Растущие на питательной среде культуры микобактерий туберкулеза восстанавливают нитрат натрия в нитрит натрия, который регистрируется по цветной реакции с раствором реактива Грисса. При анализе устойчивых культур появляется красное или розовое окрашивание во флаконе после внесения реактива Грисса. При анализе чувствительных культур красного или розового окрашивания не наблюдается.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

XDR - тест обеспечивает определение устойчивости культур микобактерий туберкулеза к изониазиду, рифампицину, канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину по по-

явлению красной или розовой окраски во флаконах, содержащих соответствующие противотуберкулезные препараты, после внесения по 0,5 мл 7,5 % водного раствора реактива Грисса во все флаконы (с №1 по №7), засеянные по 0,2 мл микробной взвеси из разведения 10^{-1} , приготовленной по оптическому стандарту мутности 5 ед., через 8-14 суток инкубирования при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру $37 \pm 1 ^\circ\text{C}$;
- Пробирки стеклянные или колбы для приготовления микробных суспензий;
- Бусы стеклянные диаметром 2-3 мм или 3-5 мм;
- Пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 1 мл;
- Пинцет, скальпель или ножницы;
- Вода дистиллированная или 0,02% раствор твина 80.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Культуры микобактерий туберкулеза.

6. БЕЗОПАСНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу с культурами микобактерий туберкулеза необходимо проводить в шкафах биологической безопасности 2 класса защиты с соблюдением требований СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Использованные шприцы и иглы подвергают дезинфекции в растворах разрешенных дезсредств с последующими автоклавированием и утилизацией. Использованные флаконы утилизируют после автоклавирования.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка XDR-теста.

Перед использованием необходимо осмотреть все флаконы на наличие признаков повреждения или загрязнения. Если во флаконах наблюдаются трещины или признаки возмож-

ного загрязнения, такие как изменение цвета или консистенции, то эти флаконы использовать не следует.

Дальнейшая подготовка XDR - теста зависит от способа посева культур. Возможны два способа посева: при помощи шприца и при помощи пипетки.

1. При посеве шприцем – снимают центральную часть алюминиевого колпачка флаконов №№ 1-7 с помощью скальпеля или пинцета, затем стерильной иглой от шприца объемом 5 мл в асептических условиях прокалывают резиновую пробку флакона для дополнительной аэрации, затем иглу вынимают и оставляют для дальнейшего использования при учете результатов (внесение раствора реактива Грисса).

2. При посеве пипеткой – в асептических условиях флаконы №№ 1-7 освобождают от металлических колпачков и резиновых пробок и заменяют стерильными резиновыми коническими пробками.

7.2. Посев

Для проведения одного анализа следует использовать один XDR – тест. Посев культур *M. tuberculosis*, выделенных на янчных или жидких питательных средах, проводят в соответствии с приложением к Приказу МЗ РФ № 109 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении туберкулеза по стандартному образцу мутности (ОСО 42-28-29-86) 5 единиц соответствующего года выпуска, разводят в 10 раз, и полученную взвесь высевают по 0,2 мл во флаконы №№ 1-7. После посева шприцем резиновую крышку каждого флакона обрабатывают в течение 5 минут ватным тампоном, смоченным в растворе дезинфеканта.

Затем засеянные флаконы инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в наклонном положении таким образом, чтобы инокулят равномерно распределялся по всей поверхности скоса среды. Для этого их помещают в упаковочную коробку с предварительно выдавленной перфорированной стенкой.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Приготовление раствора реактива Грисса

Непосредственно перед проведением учета результатов готовят 7,5 %-ный раствор реактива Грисса путем добавления 5 мл дистиллированной воды, подогретой до температуры

50 °C, к содержимому флакона № 8. Приготовленный раствор можно использовать в течение 14 суток при условии хранения его при температуре 2-8 °C в темном месте.

8.2. Регистрация результатов

Через 8-10 суток инкубирования посевов в один из двух контрольных флаконов №1 добавляют 0,5 мл раствора реактива Грисса с помощью шприца объемом 5 мл при посеве шприцем и с помощью пипетки при посеве пипеткой. Учет результатов проводят визуально по появлению розового или красного окраски в засеянных флаконах. Интенсивность окраски, которая может варьировать от «-» до «5+», регистрируют по цветовой шкале. В зависимости от интенсивности окраски в контрольном флаконе возможны 2 варианта учета результатов:

а) Если в контрольном флаконе №1 интенсивность розовой или красной окраски соответствует 3+ и более, то продолжают внесение раствора реактива Грисса во все оставшиеся флаконы (№ 2-7), регистрируют интенсивность окраски и интерпретируют результаты.

б) Если в контрольном флаконе интенсивность цветной реакции будет менее, чем 3+, этот флакон уничтожают, а все остальные флаконы XDR - теста продолжают инкубировать до 10-14 суток. По истечении срока инкубации (10-14 суток) вносят реактив Грисса во все флаконы и регистрируют результат.

Если в течение всего срока инкубации (14 суток) не произошло появления розовой или фиолетовой окраски ни в одном из контрольных флаконов, то данная культура подлежит повторному анализу.

Возможные причины отсутствия окраски в контрольных флаконах:

1. Низкая концентрация микробной взвеси в посевной дозе.
2. Исследуемые культуры не обладают нитратредуктазной активностью.

Не инкубируйте флаконы XDR-теста более 14 суток, т.к. возможно получение ложноположительных результатов!

8.3. Интерпретация результатов

Культура МБТ считается чувствительной к противотуберкулезным препаратам, если во флаконах № 2-7 не появилась розовая или красная окраска (при интенсивности окраски в контрольном флаконе № 1 не менее 3+).

Культура МБТ считается устойчивой к конкретному противотуберкулезному препарату, если во флаконе, содержащем данный препарат, интенсивность розовой или красной окраски будет не менее 1+ (при интенсивности окраски 3+ и более в контрольном флаконе №1).

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранить в защищенном от света месте при температуре 2-8 °С.

Срок годности – 3 месяца.

Препарат с истекшим сроком годности использованию не подлежит!

По вопросам, касающимся качества «Набора питательных сред для диагностики XDR-туберкулеза (XDR-тест)» в течение срока годности, следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, тел./факс: (4967) 36-01-16.

Зам. директора ФБУН ГНЦ ПМБ
по научно-производственной работе, к.х.н.

А.П. Шепелин

Главный врач
ГБУЗ МО «Серпуховский
противотуберкулезный диспансер»



И.В. Михайлова

Пронумеровано, прошнуровано
скреплено подписью и печати

6 (шесть)

листов. Подпись

"24" июля 2019

