

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГУН

Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии



И.А. Дятлов

2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза
(«ТБ тест-набора»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

«ТБ тест-набор» предназначен для ускоренного определения чувствительности к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу и первичной идентификации микобактерий туберкулеза, а также для нетуберкулезных микобактерий, обладающих способностью восстанавливать нитраты в нитриты.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Тест-набор состоит из 9 флаконов вместимостью 20 мл (2 флаконов, содержащих по 6 мл стерильной готовой к применению питательной среды без лекарственных препаратов; 6 флаконов, содержащих по 6 мл стерильной готовой к применению питательной среды с одним из соответствующих лекарственных препаратов; 1 флакона с 0,375 г реактива Грисса) и 2 стерильных шприцев (см. таблицу).

В восьми флаконах с питательными средами №№ 1-7 - скошенный непрозрачный гель зеленовато-голубого цвета, светочувствителен, в девятом флаконе № 8 - кристаллический порошок серо-розового цвета.

2.1. СОСТАВ НАБОРА

Состав «ТБ тест-набора»:

№ флакона	Содержимое	Количество флаконов
1	Питательная среда - (контроль)	2
2	Питательная среда с салицилатом натрия	1
3	Питательная среда с тиофенкарбоксигидразидом (ТКГ)	1
4	Питательная среда с изониазидом	1
5	Питательная среда с рифампицином	1
6	Питательная среда со стрептомицином	1
7	Питательная среда с этамбутолом	1
8	Реактив Грисса	1
	Шприц стерильный объемом 1 мл	1
	Шприц стерильный объемом 2 мл или 5 мл	1

Состав питательной среды, г/л:

Калий фосфорнокислый однозамещенный	1,5
Магний сернокислый 7 водный	0,15
Магний лимоннокислый	0,375
Натрий азотнокислый	1,0
L-аспарагин моногидрат	2,25
Крахмал растворимый, индикатор	18,75
Малахитовый зеленый	0,25
Глицерин дистиллированный ПК-94	7,5 мл
Яйцо куриное в виде яичной массы	625,0 мл

2.2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Определение лекарственной чувствительности и первичная дифференциация микобактерий туберкулеза с помощью ТБ тест-набора основаны на выявлении нитратредуктазной активности посредством регистрации цветной реакции после внесения реактива Грисса в засеянные и инкубированные в течение 8-12 суток флаконы ТБ тест-набора.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

«ТБ тест-набор» обеспечивает определение чувствительности к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу культур микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий, обладающих нитратредуктазной активностью, через 8-12 суток инкубирования по появлению красной или темно-розовой, или темно-фиолетовой окраски во флаконах, содержащих те лекарственные препараты, к которым анализируемая культура устойчива, и отсутствию

окраски во флаконах, содержащих те препараты, к которым анализируемая культура чувствительна.

«ТБ тест-набор» также обеспечивает первичную идентификацию культур микобактерий туберкулеза через 8-12 дней инкубирования по появлению красной или темно-розовой, или темно-фиолетовой окраски во флаконе №3 с ТКГ и отсутствию окраски во флаконе №2 с салицилатом натрия.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работу с культурами *M. tuberculosis* проводят в соответствии с СП 1.2731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру 37 ± 1 °C
- Пробирки стеклянные
- Пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 1 и 2 мл
- Вода дистиллированная
- Колбы

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Культуры возбудителя туберкулеза в клинической микробиологии и при проведении научных исследований.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Исследования образцов проводятся в соответствии с приложением №11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза» к Приказу МЗ РФ № 109

7.1. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Определение лекарственной чувствительности культур микобактерий.

Использование тест-набора подразумевает 2 способа посева

- 1) посев пипеткой путем вскрытия флаконов.
- 2) посев шприцем путем прокалывания резиновой пробки.

Подготовка ТБ тест-набора. При посеве пипеткой предварительно стерилизуют автоклавированием резиновые конические пробки с внутренним диаметром 14,5 мм. Непосредственно перед проведением исследования в асептических условиях вскрывают флаконы с № 1 по

№ 7 «ТБ тест-наборов», освобождая их от металлических колпачков и резиновых пробок, и перекрывают стерильными резиновыми пробками.

При посеве стерильным шприцем с постоянно прикрепленной иглой объемом 1 мл флаконы не вскрывают, а снимают центральную часть алюминиевого колпачка

Посев. Посев предварительно выделенных на яичных средах культур *M.tuberculosis* проводят в соответствии с приложением №11 «Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза» к Приказу МЗ РФ № 109, высевая по 0,2 мл микробной взвеси в каждый из 8 флаконов (№№ 1-7) с питательными средами при помощи стерильной пипетки или с помощью шприца. После процедуры посева с помощью шприца резиновую крышку каждого флакона обрабатывают в течение 5 минут ватным тампоном, смоченным в 5 % растворе хлорамина Б или в 4 %-ном растворе перекиси водорода.

Затем засеянные флаконы инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 8-12 суток в наклонном положении таким образом, чтобы инокулят равномерно распределился по всей поверхности скоса среды. Для этого их помещают в упаковочную коробку с предварительно выдвинутой перфорированной стенкой.

Приготовление 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.

8. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Через 8 суток инкубирования посевов добавляют 0,5 мл раствора реактива Грисса с помощью шприца на 5 мл (или 2 мл) или пипетки в один из двух контрольных флаконов. В случае появления в нем красной или интенсивной розовой, или фиолетовой окраски продолжают внесение раствора реактива Грисса во все оставшиеся флаконы и проводят визуальный учет наличия изменения окраски во флаконах.

Если в контрольном флаконе не будет изменения окраски или интенсивность окраски будет слабо-розовой или слабо-фиолетовой, этот флакон уничтожают, а второй контрольный флакон и все остальные флаконы тест-набора продолжают инкубировать до 10-12 суток. Затем вносят раствор реактива Грисса во все флаконы и проводят учет результатов.

Культура считается **чувствительной**, если во флаконе с лекарственным препаратом не произошло изменения окраски (при появлении в контрольном флаконе красной или интенсивной розовой, или фиолетовой окраски).

Культура считается **устойчивой**, если во флаконе с лекарственным препаратом появилось красное или темно-розовое, или фиолетовое окрашивание.

Появление окраски во флаконе с ТКГ и отсутствие изменения окраски во флаконе с салицилатом натрия свидетельствует о том, что исследуемый изолят относится к виду *M. tuberculosis*.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

«ТБ тест-набор» необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре 2-8 °С.

Срок годности – 3 месяца.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества «ТБ тест-набора» в течение срока годности следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», тел. (4967) 36-00-20, факс 36-01-16.

Зам. директора
по научно-производственной работе

А.П. Шепелин

Зав.лабораторией разработки питательных сред

Л.В.Домотенко

«СОГЛАСОВАНО»

Директор
ГУ Московского научно-практического Центра
борьбы с туберкулезом Департамента
здравоохранения г. Москвы
акад. РАМН, проф. Литвинов В.И.



200 г.

СПРАВКА ОБ ИЗДЕЛИИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Набор питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза (ТБ ТЕСТ-НАБОР)

Набор питательных сред для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации микобактерий туберкулеза (ТБ ТЕСТ-НАБОР), далее по тексту (ТБ ТЕСТ-НАБОР) – разработан и подготовлен к промышленному выпуску коллективом авторов ФГУН ГНЦ ПМБ за период с 2005 по 2007 год.

«ТБ ТЕСТ-НАБОР» состоит из 9 флаконов вместимостью 20 мл (2 флаконов, содержащих по 6 мл стерильной готовой к применению питательной среды без лекарственных препаратов; 6 флаконов, содержащих по 6 мл стерильной готовой к применению питательной среды с одним из соответствующих лекарственных препаратов; 1 флакона с реактивом Грисса) и 2 стерильных шприцев.

Все флаконы герметично закрыты резиновыми пробками и завальцованы алюминиевыми колпачками. Флаконы и шприцы упакованы в коробку.

«ТБ ТЕСТ-НАБОР» предназначен для ускоренного определения чувствительности к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу и первичной идентификации микобактерий туберкулеза, а также для нетуберкулезных микобактерий, обладающих способностью восстанавливать нитраты в нитриты.

«ТБ ТЕСТ-НАБОР» обеспечивает определение чувствительности к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу культур микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий, обладающих нитратредуктазной активностью, через 8-12 суток инкубирования по появлению красной или темно-розовой, или темно-фиолетовой окраски во флаконах, содержащих те лекарственные препараты, к которым анализируемая культура устойчива, и отсутствию окраски во флаконах, содержащих те препараты, к которым анализируемая культура чувствительна.

«ТБ ТЕСТ-НАБОР» также обеспечивает первичную идентификацию культур микобактерий туберкулеза через 8-12 дней инкубирования по появлению красной или темно-розовой, или темно-фиолетовой окраски во флаконе № 3 с ТКГ и отсутствию окраски во флаконе № 2 с салицилатом натрия.

Определение лекарственной чувствительности и первичная дифференциация микобактерий туберкулеза с помощью «ТБ ТЕСТ-НАБОРА» основаны на выявлении нитратредуктазной активности посредством регистрации цветной реакции после внесения реак-

729

Потребность бактериологов Российской Федерации в «ТБ ТЕСТ-НАБОРЕ» составляет от 600 тыс. до 1 млн. наборов в год.

И.А. ДЯТЛОВ