Общероссийская общественная организация
«РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

# Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций

Москва, 2022

**УТВЕРЖДАЮ**
Президент Общероссийской общественной организации «РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ»/Ассоциации фтизиатров

профессор, д.м.н.

_____ И.А. Васильева
«____» _____ 2022

Методические рекомендации

# Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций

Год утверждения 2022

Разработчики методических рекомендаций

Общероссийская общественная организация «Российское общество фтизиатров»

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящие рекомендации относятся к методу фенотипического тестирования чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* к антибактериальным препаратам методом пропорций

Рецензенты:

профессор, д.м.н., член-корр. РАН, главный внештатный специалист Минздрава РФ по клинической микробиологии и антимикробной резистентности Козлов Р.С.;

профессор, д.м.н., член- корр. РАН Марьяндышев А.О.;

доцент, к.м.н. Елиссев П.И. кафедра фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО СГМУ г. Архангельск

# ОГЛАВЛЕНИЕ


| | № страницы. |
|---|---|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 7 |
| ВВЕДЕНИЕ | 8 |
| 1. Устойчивость микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам | 8 |
| 1.1. Распространенность устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам | 8 |
| 1.2. Изменения в классификации групп /типов устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам | 9 |
| 1.3. Фенотипические методы тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам | 10 |
| 2. Организация тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 13 |
| 2.1. Общие положения | 13 |
| 2.2. Требования к помещениям и оборудованию, используемым для проведения тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 15 |
| 2.3. Требования к персоналу лаборатории, участвующему в тестировании чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 15 |
| 2.4. Средства индивидуальной защиты при проведении тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 16 |
| 2.5. Обработка помещений и обеззараживание материалов | 17 |
| 3. Обеспечение качества исследований при тестировании чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 18 |
| 4. Тестирование лекарственной микобактерий туберкулеза методом пропорций | 22 |
| 4.1. Общие положения | 22 |
| 4.2. Питательные среды, применяемые для тестов на лекарственную чувствительность | 23 |
| 4.3. Постановка теста лекарственной чувствительности методом пропорций | 26 |
| 4.4. Учет и интерпретация результатов ТЛЧ на плотных питательных средах. Регистрация результатов | 26 |
| 4.4. Модифицированный метод пропорций на жидкой среде | 28 |
| 5. Список нормативных документов | 29 |
| 6. Рекомендуемая литература | 31 |
| Приложение 1. Оснащение бактериологической лаборатории для проведения тестирований чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами | 33 |
| Приложение 2. Хранение культур клинических изолятов и контрольных штаммов микобактерий туберкулеза | 40 |
| Приложение 3. Общие правила приготовления сред и растворов | 43 |

| | |
|---|---|
| Приложение 4. Приготовление, разведение и хранение растворов антибактериальных препаратов | 45 |
| 1. Общие положения | 45 |
| 2. Расчет корректирующих коэффициентов с учетом содержания в субстанции активного вещества и ее химической чистоты | 45 |
| 3. Приготовление рабочих растворов антибактериальных препаратов и их разведений | 49 |
| 4. Хранение растворов антибактериальных препаратов | 50 |
| Приложение 5 Приготовление суспензии клинических изолятов микобактерий туберкулеза и посев на плотные среды | 50 |
| Приложение 6. Постановка теста на лекарственную чувствительность на среде Левенштейна-Йенсена | 53 |
| 1. Приготовление среды Левенштейна-Йенсена | 53 |
| 2. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для среды Левенштейна-Йенсена | 55 |
| 3. Хранение среды Левенштейна-Йенсена с препаратами | 60 |
| 4. Контроль качества среды Левенштейна-Йенсена | 61 |
| 5. Проведение посева | 62 |
| 6. Инкубация | 63 |
| 7. Учет и интерпретация результатов | 63 |
| 8. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Левенштейна-Йенсена | 64 |
| Приложение 7. Постановка теста на лекарственную чувствительность на агаровых средах Миддлбрука 7H10 и 7H11 | 66 |
| 1. Приготовление агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11 | 66 |
| 2. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для среды Миддлбрука 7H10 | 67 |
| 3. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для среды Миддлбрука 7H11 | 73 |
| 4. Хранение агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11 с препаратами | 77 |
| 5. Контроль качества агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11 | 77 |
| 6. Проведение посева | 78 |
| 7. Инкубация | 79 |
| 8. Учет и интерпретация результатов | 80 |
| 9. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Миддлбрука 7H10 | 81 |
| 10. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Миддлбрука 7H11 | 82 |
| 11. Пример СОП «Приготовление растворов антибактериальных препаратов для ТЛЧ на средах Миддлбрука 7H10 и 7H11» | 84 |

| | |
|---|---|
| 12. Пример СОП «Постановка теста лекарственной чувствительности на плотной питательной среде Миддлбрука 7H10 и 7H11 методом пропорций» | 94 |
| Приложение 8. Постановка теста на лекарственную чувствительность на жидкой среде (модифицированный метод пропорций) | 102 |
| 1. Приготовление и хранение жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9 | 102 |
| 2. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для жидкой среды Миддлбрука 7H9 | 103 |
| 3. Приготовление инокулята | 112 |
| 4. Подготовка к засеву суспензии и посев суспензии в пробирки MGIT | 113 |
| 5. Интерпретация результатов | 114 |
| Приложение 9. Пример журнала регистрации приготовления сред | 115 |
| Приложение 10. Пример журнала регистрации поступивших в лабораторию сред/наборов реагентов | 116 |
| Приложение 11. Пример журнала поступивших в лабораторию субстанций антибактериальных препаратов | 117 |
| Приложение 12. Пример журнала приготовления растворов антибактериальных препаратов | 118 |
| Приложение 13. Пример формы лабораторного заключения по результатам тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам | 119 |
| Приложение 14. Приготовление стандартов МакФарланда 1,0 и 0,5. | 120 |
| Состав рабочей группы | 121 |

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**АБП –** антибактериальные препараты
**АМР –** антимикробная резистентность
**БМБ –** бокс микробиологической безопасности
**ВОЗ-** Всемирная организация здравоохранения
**$К_А$ -** корректирующий коэффициент с учетом доли активного вещества
**$К_с$ -** корректирующий коэффициент с учетом чистоты субстанции
**КК –** критическая концентрация
**КОЕ** – колонии образующие единицы
**КП –** пограничная концентрация
**КУБ** – кислотоустойчивые бактерии
**ЛЙ** – среда ЛЙ
**МБТ –** микобактерии туберкулеза, Mycobacterium tuberculosis
**М.М.** молекулярная масса вещества
**МГМ –** молекулярно-генетические методы
**МИК -**минимальная ингибирующая концентрация
**МЛУ –** множественная лекарственная устойчивость
**МЛУ/РР** - резистентность МБТ к изониазиду и рифампицину (или хотя бы к рифампицину при определении молекулярно-генетическими методами)
**МЛУ ТБ -** туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью
**ПАСК –** пара-аминосалициловая кислота/аминосалициловая кислота
**ПБА** – патогенные биологические агенты
**ПТП** – противотуберкулезный препарат
**СИЗ** - средства индивидуальной защиты
**СИЗОД** - средства индивидуальной защиты органов дыхания
**ТБ** - туберкулез
**ТЛЧ -** тестирование/тест на лекарственную чувствительность
**ШЛУ –** широкая лекарственная устойчивость
**ШЛУ ТБ -** туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью
**OADC** - добавка к среде Миддлбрука, содержащая олеиновую кислоту, альбумин, декстрозу и каталазу
**ADC** - добавка к среде Миддлбрука, содержащая альбумин, декстрозу и каталазу
**ECDC -**European Center for Diseases Control – Европейский центр контроля за заболеваемостью

# ВВЕДЕНИЕ

## 1. Устойчивость микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам

### 1.1. Распространенность устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам

Распространение устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам - антимикробной резистентности (АМР) в 21 веке во всем мире рассматривается как глобальный кризис, угрожающий Целям устойчивого развития, определенным Генеральной ассамблей ООН, в том числе развитию здравоохранения во всем мире. Туберкулез с множественной (МЛУ ТБ) и широкой (ШЛУ ТБ) лекарственной устойчивостью является одним из ключевых аспектов глобальной проблемы АМР.

Как отмечено в Политической декларации 1-го совещания высокого уровня Генеральной Ассамблеи ООН по борьбе с туберкулезом, увеличивающиеся масштабы распространения МЛУ ТБ и ШЛУ ТБ и смертности от него усиливают нагрузку на системы здравоохранения и общество. Во всем мире регистрируется высокая частота случаев туберкулеза с МЛУ/РР возбудителя – МЛУ ТБ – с устойчивостью возбудителя хотя бы к изониазиду и рифампицину или только к рифампицину (при определении устойчивости молекулярно-генетическими методами - МГМ) и ШЛУ ТБ (с МЛУ возбудителя в сочетании с устойчивостью хотя бы к одному из фторхинолонов а также, дополнительно, к бедаквилину и/или линезолиду). В среднем, распространенность случаев МЛУ ТБ среди впервые выявленных больных в мире составляет 3–4%, и 18–27% - у больных, ранее получавших лечение. Однако эти показатели выше в постсоветских странах: в некоторых из них доля случав МЛУ ТБ среди ранее леченных больных превышает 50%. Россия внесена ВОЗ в список стран с высоким бременем МЛУ ТБ. В 2021 году в России доля случаев МЛУ ТБ среди впервые выявленных больных с бактериовыделением составляла 30,8%, а среди случаев рецидивов с бактериовыделением – 50,5%. Быстрое и точное определение спектра чувствительности возбудителей заболевания к антибактериальным препаратам позволяют своевременно назначить адекватные режимы химиотерапии и повысить ее эффективность, снизить смертность от туберкулеза. В последнее десятилетие молекулярно-генетические методы выявления резистентности микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) к АБП получили широкое распространение. Однако в настоящее время спектр АБП, резистентность к которым выявляют современные молекулярно-генетические тест-системы с высокой чувствительностью, ограничен. Поэтому применение бактериологических/фенотипических методов тестирования чувствительности МБТ к АБП сохраняет свое значение.

## 1.2. Изменения в классификации групп /типов устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам

В последние годы внесены изменения в классификацию типов устойчивости МБТ к АБП, исключающие из определений препараты с инъекционным введением, а также добавляющие в нее новые препараты. Соответствующие изменения внесены и в российские клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», в версию 2022 года по сравнению с версией 2020 г. (таблица 1)

Таблица 1. Сравнение определения типов устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам в клинических рекомендациях «Туберкулез у взрослых» 2020 и 2022 гг.

| Федеральные клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», версия 2020 г. | Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», версия 2022 г. |
|---|---|
| МЛУ/MDR (множественная лекарственная устойчивость) | |
| Устойчивость МБТ к изониазиду и рифампицину, независимо от устойчивости к другим АБП | Устойчивость МБТ одновременно к изониазиду и рифампицину независимо от устойчивости к другим АБП |
| пре-ШЛУ/pre-XDR (пред-широкая лекарственная устойчивость) | |
| Устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину и аминогликозидам/полипептидам или фторхинолонам | Устойчивость МБТ к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону |
| ШЛУ/XDR (широкая лекарственная устойчивость) | |
| Устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину, аминогликозидам/полипептидам, фторхинолонам | Устойчивость МБТ к рифампицину с устойчивостью к изониазиду или без нее, в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону и, по крайней мере, к линезолиду или бедаквилину |

Причины пересмотра определения типов устойчивости микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам:

- инъекционные препараты 2-го ряда были заменены другими, более эффективными пероральными препаратами;
- резистентность к фторхинолонам остается важной характеристикой возбудителя, поскольку она ассоциирована со снижением числа благоприятных исходов лечения и приводит к необходимости выбора более длительных режимов химиотерапии, в том числе с применением нестандартных, индивидуализированных схем лечения;
- необходимость учитывать появление устойчивых к новым препаратам (бедаквилину и линезолиду) клинических изолятов МБТ.

### 1.3. Фенотипические методы тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам.

**Резистентность микобактерий** к антибактериальному препарату– это значительное снижение их чувствительности к этим препаратам, позволяющее с большой вероятностью предполагать их отличия от микобактерий дикого типа и отсутствие клинического эффекта при применении этого препарата в стандартной дозировке.

**Чувствительность микобактерий** к антимикробному препарату – уровень чувствительности, не отличающийся значительно от чувствительности стандартных штаммов микобактерий дикого типа, и позволяющий предполагать с большой вероятностью клиническую эффективность применения этого препарата в стандартной дозировке.

Бактериологические (фенотипические) методы тестирования чувствительности (ТЛЧ) МБТ к антибактериальным препаратам основываются на оценке интенсивности роста бактерий на плотной или жидкой питательной среде в присутствии АБП в определенной концентрации, с использованием, в том числе, автоматизированной системы детекции и регистрации роста. Регистрация роста проводится либо при непосредственном просмотре пробирок/чашек Петри с культурой (путем подсчета колоний на плотных средах или оценки массивности роста в жидкой среде), или с применением непрямых методов оценки (по развитию флуоресценции по мере потребления кислорода, образованию углекислого газа, или ферментативной модификации среды). Тестирование чувствительности МБТ проводится к препаратам первого ряда (рифампицину, изониазиду, этамбутолу, пиразинамиду и стрептомицину), применяемым для лечения больных туберкулезом с чувствительностью к изониазиду и рифампицину, и препаратам 2-го ряда, применяемым для лечения случаев МЛУ/ШЛУ туберкулеза (Таблица 2).

В соответствии с Клиническими рекомендациями «Туберкулез у взрослых» приоритетными методами для выявления резистентности МБТ к изониазиду и рифампицину (или хотя бы к рифампицину) – МЛУ/РР, и, дополнительно, к фторхинолонам – пре-ШЛУ, являются молекулярно-генетические методы. Однако эти методы не позволяют определить весь спектр АБП, к которым чувствителен/устойчив клинический изолят МБТ. Кроме того, чувствительность МГМ определения резистентности к некоторым АБП остается ниже, чем при тестировании фенотипическими методами. Поэтому применение фенотипических (бактериологических) методов ТЛЧ во всем мире сохраняет свое значение. В российских Клинических рекомендациях «Туберкулез у взрослых» предписано проведение фенотипического тестирования чувствительности изолятов МБТ, выделенных

из биологического материала пациентов (непрямой метод тестирования), к АБП 1-го и 2-го ряда с применением:

- модифицированного метода пропорций на жидкой среде в системе с автоматизированной детекцией роста к АБП 1-го и 2-го ряда;
- метода пропорций на плотной среде Левенштейна-Йенсена (ЛЙ) и Миддлбрука 7H10/7H11 к АБП 1-го ряда (кроме пиразинамида) и некоторым препаратам 2-го ряда (см. таблицу1);
- метода абсолютных концентраций к препаратам 1-го ряда (кроме пиразинамида).

В версию Клинических рекомендаций «Туберкулез у взрослых» (КР) 2022 года включены дополнительные положения, устанавливающие приоритет метода пропорций перед методом абсолютных концентраций в фенотипическом тестировании чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ) к противотуберкулезным препаратам, по крайней мере, для АБП 2-го ряда (применяемых для лечения больных МЛУ/ШЛУ ТБ): в клинических рекомендациях подчеркивается отсутствие достоверно установленных критических концентраций для АБП второго ряда для метода абсолютных концентраций. Пиразинамид применяется для лечения больных туберкулезом, однако для него определена КК только для модифицированного метода пропорций в системе с автоматизированной детекцией роста.

В последние годы в рекомендации ВОЗ, а также в версию ФКР, вступающую в действие с 1 января 2023 года, внесены существенные изменения в части тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ) МБТ бактериологическими методами:

- из перечня АБП, к которым рекомендовано проведение ТЛЧ, исключены офлоксацин, циклосерин, ПАСК;
- в качестве приоритетных при проведении ТЛЧ названы такие препараты, как бедаквилин и линезолид;
- изменены критические концентрации при тестировании с использованием технологии BACTEC MGIT для рифампицина (0,5 мг/л вместо 1 мг/л), левофлоксацина (1,0 мг/л вместо 1,5 мг/л), моксифлоксацина (0,25 и 1 мг/л вместо 0,5 и 2,0 мг/л).

Также были внесены изменения в определения понятий и введены новые понятия, принятые в описании ТЛЧ:

- *минимальная ингибирующая концентрация* (МИК) препарата – это минимальная концентрация препарата, которая вызывает подавление роста 99% клеток микроорганизма в культуре на плотной или жидкой питательной среде;

– *критическая концентрация* (КК) препарата – это минимальная концентрация препарата в питательной среде, которая in vitro ингибирует рост 99% клинических изолятов дикого типа. КК позволяют характеризовать изоляты как чувствительные или устойчивые, отличаются для метода пропорций на разных средах (см. таблицу 1) и между методами пропорций и абсолютных концентраций. Критические концентрации АБП для метода пропорций и его модификаций определяются Группой экспертов ВОЗ на основании многоцентровых тестирований Супранациональных ТБ лабораторий ВОЗ, или мета-анализа тестирований, опубликованных в реферируемых журналах;

– *концентрация клинического предела (КП)* – концентрация препарата более высокая, чем КК. Определяется с учетом клинических данных о результатах лечения пациентов, от которых были выделены тестированные изоляты, фармакокинетических/ фармакодинамических характеристик и максимальных переносимых доз препарата. В случае выявления устойчивости возбудителя к препарату в КК при назначении химиотерапии доза препарата может быть увеличена, если обнаружена чувствительность возбудителя к КП [5].

В настоящее время значение КП определено только для моксифлоксацина.

В таблице 2 приведены значения КК и КП для непрямого метода пропорций для различных питательных сред.

Таблица 2. Значения критических концентраций АБП (мг/л) для непрямого метода пропорций для различных питательных сред

| | Препараты | ЛЙ | 7H10 | 7H11 | BACTEC MGIT |
|---|---|---|---|---|---|
| Препараты для лечения ТБ с возбудителем, чувствительным к антибактериальным препаратам | изониазид | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| | рифампицин | 40,0 | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| | этамбутол | 2,0 | 5,0 | 7,5 | 5,0 |
| | пиразинамид | – | – | – | 100,0 |
| | стрептомицин | 4,0 | 2,0 | 2,0 | 1,0 |
| Приоритетные препараты для лечения МЛУ ТБ | левофлоксацин | 2,0 | 1,0 | – | 1,0 |
| | моксифлоксацин (КК) | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| | моксифлоксацин (КП) | – | 2,0 | – | 1,0 |
| | бедаквилин | – | – | 0,25 | 1,0 |
| | линезолид | – | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| | циклосерин | – | – | – | – |
| | деламанид | – | – | 0,016 | 0,06 |
| | амикацин | 30,0 | 2,0 | – | 1,0 |
| | канамицин | 30,0 | 4,0 | – | 2,5 |
| | капреомицин | 40,0 | 4,0 | – | 2,5 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | этионамид | 40,0 | 5,0 | 10,0 | 5,0 |
| | протионамид | 40,0 | – | – | 2,5 |
| | аминосалициловая кислота | – | – | – | – |

ЛЙ – среда Левенштейна-Йенсена
7H10 – агаровая среда Миддлбрука 7H10
7H11 - агаровая среда Миддлбрука 7H11
BACTEC MGIT - модифицированный метод пропорций на жидкой среде в системе с автоматизированной детекцией роста

Значения КК определены не для всех методов (сред), и не для всех АБП. Так, КК для пара-аминосалициловой кислоты (ПАСК) и циклосерина не удалось определить ни для одного метода (среды). Данные о КК для наибольшего числа АБП представлены для метода BACTEC MGIT. Для наименьшего числа препаратов известны КК для метода пропорций на среде ЛЙ. Для пиразинамида КК известны только для ТЛЧ с применением BACTEC MGIT, для деламанида - для среды Миддлбрука 7H11 и BACTEC MGIT. Значения КК для протионамида известны только для ТЛЧ с применением среды ЛЙ и BACTEC MGIT. Для линезолида не известны значения КК для среды Левенштейна -Йенсена и т.д.

*ВНИМАНИЕ: Результаты ТЛЧ к препаратам, применяемым для лечения больных МЛУ ТБ, для которых неизвестны значения КК для применяемых в лаборатории методов (сред), могут не отражать клиническую резистентность/чувствительность к этим препаратам. Постановка ТЛЧ к таким препаратам такими методами нецелесообразна, а клиническая интерпретация результатов недопустима.*

## 2. Организация тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами

### 2.1. Общие положения

Тестирование чувствительности МБТ к АБП является третьим тестом, входящим в комплекс этиологических исследований для диагностики туберкулеза с применением бактериологических методов, который включает в себя культуральные исследования для выделения возбудителя заболевания, определение его принадлежности к микобактериям туберкулезного комплекса и собственно ТЛЧ. В лаборатории могут проводиться все три этапа комплексного исследования. Однако при отсутствии в лаборатории материальных и кадровых возможностей, достаточных для качественного проведения всех этапов этиологической диагностики, тестирование чувствительности изолятов МБТ к АБП может быть передано в лабораторию, располагающую соответствующими ресурсами (аутсорсинг). В такую лабораторию могут быть переданы клинические изоляты для тестирования их чувствительности к препаратам 1-го и 2-го ряда или только второго ряда.

***Внимание! Не рекомендуется проведение ТЛЧ к препаратам 2-го ряда в лабораториях с рабочей нагрузкой таких тестирований менее 20 в неделю. Рекомендуется централизация ТЛЧ к препаратам второго ряда.***

МБТ относятся к III группе эпидемической опасности (патогенности), и все работы как с самими микроорганизмами, так и биологическими материалами, их содержащими, могут проводиться только в лабораториях (подразделениях), соответствующих базовому уровню безопасности (УББ) 2 (осуществление всех видов работ с ПБА III - IV групп, требования к которым изложены в действующих санитарных правилах и нормах СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней").

Медицинская организация, в состав которой входит лаборатория, проводящая исследования МБТ, должна иметь лицензию, предусматривающую выполнение работ (услуг) по бактериологии, и санитарно-эпидемиологическое заключение, допускающее проведение работ с ПБА III-IV групп патогенности. Передача клинических изолятов в другую лабораторию может проводиться только в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами, вместе с сопроводительными документами.

ТЛЧ к препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и стрептомицину) может проводиться как с применением метода пропорций на плотных питательных средах и модифицированного метода пропорций BACTEC MGIT, так и с применением метода абсолютных концентраций. ТЛЧ к препаратам второго ряда, применяемым для лечения больных МЛУ/ШЛУ ТБ, может проводиться только с применением метода пропорций на плотных средах и модифицированного метода пропорций в BACTEC MGIT.

Для определения перечня препаратов, к которым лаборатория проводит ТЛЧ для культур, выделенных от впервые выявленных больных, больных с рецидивом туберкулеза или других случаях повторного лечения (например, после прерывания или неэффективного лечения), необходимо следовать следующим правилам:

- включать в исследование только те препараты, которые могут быть применены в данном ЛПУ для лечения этого больного;
- при отсутствии устойчивости к рифампицину, выявленной МГМ, или отсутствии результатов теста МГМ ограничиться постановкой тестов только к ПТП первого ряда;
- при выявлении устойчивости к изониазиду и/или к рифампицину МГМ, ТЛЧ проводят одновременно к препаратам первого и второго ряда;

- в случае чувствительности изолята к ПТП первого ряда, ТЛЧ к ПТП второго ряда не выполняют;
- при выявлении устойчивости к ПТП первого ряда выполняют ТЛЧ к ПТП второго ряда;
- при выделении изолята МБТ, от больного на фоне химиотерапии (при условии, что спектр чувствительности изолятов от этого больного был установлен ранее), ТЛЧ проводится только к тем ПТП, к которым ранее была сохранена чувствительность, или чувствительность к которым не тестировалась ранее.

**2.2. Требования к помещениям и оборудованию, используемым для проведения тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами**

Помещения и оборудование, используемые для ТЛЧ микобактерий, также, как и все помещения и оборудование лаборатории, в которой проводятся исследования для этиологической диагностики туберкулеза, должны соответствовать требованиям действующих санитарных правил, применяемых к работе ПБА III-IV групп патогенности (УББ2). ТЛЧ должно проводиться в отдельных рабочих («заразных») зонах (в отдельных помещениях в боксах микробиологической безопасности (БМБ) II класса или в отдельных БМБ II класса в составе общих функциональных помещений). Перечень оборудования, необходимого для проведения ТЛЧ, представлен в Приложении 1.

*ВНИМАНИЕ! Необходимо учитывать, что при ТЛЧ специалист лаборатории проводит манипуляции с концентрированной суспензией патогенных бактерий. Все манипуляции с концентрированной суспензией (приготовление суспензии, ее разведение, посев на среды) имеют повышенный риск образования инфекционного аэрозоля.*

***Техника манипуляций с ПБА должна минимизировать образование аэрозолей и возможности перекрестной контаминации образцов!***

**2.3. Требования к персоналу лаборатории, участвующему в тестировании чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами.**

В соответствии с Правилами проведения микробиологических исследований к проведению ТЛЧ микобактерий туберкулеза допускаются специалисты с высшим образованием, допущенные к работе в бактериологической лаборатории: врачи бактериологи или врачи медицинские микробиологи, а также биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальности «Бактериология».

Специалисты со средним медицинским образованием, допущенные к проведению ТЛЧ, должны иметь сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология».

Все специалисты лаборатории с высшим и средним специальным образованием, допущенные к проведению ТЛЧ микобактерий туберкулеза, должны пройти повышение квалификации по применяемым методам тестирования. Если в лаборатории применяется метод пропорций на плотных средах, все специалисты должны пройти повышение квалификации для овладения этим методом.

Все сотрудники лаборатории, допущенные к проведению ТЛЧ, должны пройти инструктаж по проведению ТЛЧ в конкретной лаборатории.

Персонал лаборатории, участвующий в проведении ТЛЧ, обязан соблюдать общие правила работы с материалами, потенциально зараженными ПБА, в том числе использовать безопасные техники манипуляций с объектами потенциальной опасности для здоровья людей. Инструктаж на рабочем месте по соблюдению требований биологической безопасности должен проводиться не реже 1 раза в 6 месяцев.

Персонал лаборатории должен выполнять правила химической, электрической и пожарной безопасности при проведении работ в лаборатории.

Персонал должен быть обучен правилам использования средств индивидуальной защиты (СИЗ), и применять их при проведении ТЛЧ в соответствии с правилами, установленными в лаборатории, соблюдать правила личной гигиены.

### 2.4. Средства индивидуальной защиты при проведении тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами

СИЗ при проведении ТЛЧ микобактерий туберкулеза включают защитную одежду и средства защиты органов дыхания (СИЗОД). СИЗ при работе с возбудителем туберкулеза включают: противочумные костюмы IV типа (или его аналоги), дополненные респираторами и медицинскими перчатками.

Лаборатория должна иметь СИЗ в достаточных количествах, включающих необходимое количество комплектов для каждой рабочей зоны, возможность смены СИЗ в течение дня, запас СИЗ, обеспечивающий бесперебойное обеспечение персонала.

Надевание и снятие защитной одежды производится в санпропускниках, в которых должны быть отдельные комплекты защитной одежды и обуви.

**2.5. Обработка помещений и обеззараживание материалов.**

Обработку помещений лаборатории, проводящей исследования по диагностике туберкулеза, проводят в соответствии с требованиями действующих санитарных правил и норм.

Дезинфекцию поверхностей в помещениях, оборудования, лабораторной мебели, приборов и прочего, а также воздуха "заразной" зоны с использования УФ, проводят после окончания работ с ПБА, а при необходимости, и перед проведением работ с ПБА. Поверхности в помещениях "заразной" зоны дезинфицируют растворами дезинфицирующих средств (ДС), имеющих в Инструкциях по применению туберкулоцидные режимы, обработку проводят методами протирания поверхностей тканью, смоченной ДС, или орошением. Обработка помещений и поверхностей УФ (бактерицидными лампами) проводится после окончания влажной уборки, после полного высыхания поверхностей (повышенная влажность снижает эффективность УФ обработки). Еженедельно в помещениях "заразной" зоны проводят генеральную уборку с применением дезинфицирующих средств (протирание поверхности мебели, приборов, оборудования, а также стен на высоту не менее 2 м). Допускается применение аэрозольного метода дезинфекции. График и результаты проведения генеральных уборок фиксируют в специальном журнале.

Эксплуатацию бактерицидных облучателей осуществляют в соответствии с нормативными документами по их применению для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях. Стеклянные поверхности выключенных бактерицидных ламп протирают салфеткой, смоченной 70% раствором этилового спирта не реже 1 раза в неделю.

***Повышенный уровень влажности обрабатываемых ультрафиолетом поверхностей существенно снижает эффективность действия ультрафиолета!***

Дезинфекция рабочих зон и обеззараживание возможных разливов инфицированных жидкостей организма или культур микобактерий должны проводиться с использованием дезинфицирующих средств, зарегистрированных в установленном порядке. При обработке должны использоваться режимы для обеззараживания объектов при туберкулезе, указанные в инструкциях по применению этих средств.

Для дезинфекции могут быть использованы средства из различных химических групп (с учетом спектра их действия на ПБА, указанного в инструкциях их производителей, а также инструкций производителей к оборудованию, тест-системам/наборам реагентов):

- хлорсодержащие;
- кислород-активные;
- полимерные производные гуанидина.

***Дезинфицирующие средства на основе поверхностно-активных соединений (ЧАС) в качестве единственного действующего вещества не эффективны против возбудителей туберкулеза!***

При проведении ТЛЧ образуются медицинские отходы, относящиеся к классам Б и В. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Отходы, содержащие (потенциально содержащие) ПБА (материалы и инструменты, предметы, загрязненные нативным биологическим материалом), относят к медицинским отходам класса В, которые подлежат обязательному обеззараживанию. ***Не разрешается вынос необеззараженных медицинских отходов из рабочих зон лаборатории.*** Медицинские отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры) красного или иного цвета, но имеющие красную маркировку. Выбор упаковки зависит от состава отходов.

Обеззараживание медицинских отходов должно проводиться с применением физических методов дезинфекции.

3. **Обеспечение качества тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами**.

Тестирование чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам является частью комплекса исследований по этиологической диагностике туберкулеза, и мероприятия по обеспечению их качества являются частью системы обеспечения качества исследований, проводимых в лаборатории противотуберкулезной службы.

Обеспечение качества проводимых исследований является важной составляющей главной задачи бактериологических лабораторий – проведения бактериологических исследований поступающих образцов для диагностики пациентов в соответствии с установленными стандартами и правилами. Система обеспечения качества исследований в медицинской лаборатории рассматривается как три взаимосвязанных элемента:

- критерии или стандарты качества,
- контроль качества исследований/контроль соответствия проводимых процессов принятым в лаборатории стандартам качества,
- мероприятия по улучшению качества исследований.

**Критерии или стандарты качества** определяются для конкретной лаборатории теми правилами, которые эта лаборатория для себя принимает. Критерии качества медицинских микробиологических исследований в каждой лаборатории основываются на правилах, регламентированных действующими санитарными правилами, приказами

Минздрава России, национальными стандартами (ГОСТ ИСО 15189), правилами медицинской организации, к которой относится лаборатория, а также включают правила проведения исследований в самой лаборатории. В число внутренних правил лабораторий входят, в том числе, стандартные операционные процедуры (СОПы), определяющие специфичные для конкретной лаборатории особенности проведения исследований с применением тех или иных методов. При этом правила проведения исследований не должны противоречить инструкциям производителей наборов реагентов/тест-систем, оборудования по их применению. Должностные обязанности сотрудников также относятся к правилам работы лаборатории, обеспечивающим качество проводимых в ней исследований. Критерии и стандарты качества лаборатории должны быть утверждены руководителем медицинской организации, в состав которой входит лаборатория, быть доступными сотрудникам лаборатории в электронном виде и на бумажном носителе. Сотрудники лаборатории должны знать содержание правил и критериев качества, принятых в лаборатории, их знания должны обновляться не реже одного раза в 6 месяцев (инструктаж). Новые положения, вносимые в критерии и стандарты качества лаборатории, должны своевременно доводиться до сведения сотрудников.

В рамках обеспечения качества исследований необходимо уделять внимание стандартизации и документированию процессов, в том числе – разработке и внедрению на рабочих местах стандартных операционных процедур (СОП).

**Контроль качества.** Соответствие проводимых в лаборатории процессов принятым стандартам или критериям качества должно регулярно контролироваться. Контроль качества можно разделить на внутрилабораторный контроль качества – контроль с помощью контрольных образцов и с применением внутренних аудитов, а также внешний контроль качества, осуществляемый с помощью контрольных образцов, а также при инспекционных кураторских визитах.

Внутрилабораторный контроль является оперативным контролем качества результатов исследования. Несоответствия процессов проведения исследований принятым стандартам, потенциально влияющие на их результаты, выявляемые при внутрилабораторном контроле качества, обычно выявляются **до передачи результатов** исследования в клинику, что может предотвратить ошибку в оценке состояния здоровья пациента. Внешняя оценка качества – ретроспективная оценка качества результатов, выявляет несоответствие уже проведенных исследований, обычно уже **после их клинического использования**. Внешняя оценка качества обычно не влияет на результаты исследования образцов от конкретного пациента, но позволяет оценить эффективность применяемых в лаборатории мер по обеспечению качества исследований.

Качество исследования невозможно определить только по результатам контроля готового продукта. Каждый этап работы лаборатории следует контролировать для максимальной гарантии того, что результат исследования в медицинской микробиологической лаборатории соответствует установленным критериям.

***Исследования контрольных образцов и другие мероприятия в рамках контроля качества должны быть встроены в технологический процесс лаборатории так, чтобы выполнение каждого следующего этапа было невозможно без качественного выполнения предыдущего этапа!***

**Внутрилабораторный контроль** при проведении исследований по этиологической диагностике ТБ включает регулярный внутренний аудит всех этапов исследования (преаналитического, аналитического, постаналитического) с целью подтверждения соответствия выполняемых процедур установленным правилам. Для обеспечения качества ТЛЧ решающее значение имеет, в частности, контроль качества питательных сред.

**Контроль качества сред**, приготовляемых в лаборатории, подразумевает:

- контроль хранения реагентов (недопустимо применение регентов с истекшими сроками хранения, характеристиками, не соответствующими указанным в прописях, хранящихся в условиях, не соответствующих правилам их хранения);
- регулярную поверку измерительных приборов, применяемых при приготовлении сред;
- контроль и регистрацию температуры коагуляции среды ЛЙ (если применимо);
- контроль стерильности готовых сред;
- контроль ростовых качеств готовых сред;
- контроль условий хранения готовых сред, температуры в холодильниках и морозильниках;
- контроль качества каждой партии сред с АБП с применением контрольных чувствительных штаммов микобактерий туберкулеза.

*В лаборатории должна быть рабочая коллекция охарактеризованных штаммов МБТ (Приложение2).*

В лабораториях с большим объемом ТЛЧ к препаратам 2-го ряда методом пропорций необходимо проведение контроля качества сред и с применением устойчивых к препаратам 1-го и 2-го ряда штаммов МБТ. Коллекция охарактеризованных по чувствительности к АБП штаммов МБТ может пополняться из наборов контрольных образцов, получаемых лабораторией в рамках циклов внешней оценки качества.

Результаты всех мероприятий внутреннего контроля качества сред, приготовляемых в лаборатории, должны регистрироваться в специальном журнале, также, как дата приготовления каждой партии среды и фамилия сотрудника, ее приготовившего (Приложения 9, 10).

**Контроль качества сред, приобретенных у производителей изделий медицинского назначения.** В клинических бактериологических лабораториях могут быть использованы только среды/наборы реагентов, зарегистрированные в РФ как медицинские изделия (Государственный реестр медицинских изделий *https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch*). Применение готовых сред или наборов реагентов и их хранение должно проводиться в соответствии с инструкцией производителя.

Питательные среды, изготовленные промышленно, могут не проходить дополнительное тестирование на стерильность и ростовые качества, если производитель предоставил данные о контроле их качества, проведенном при их производстве: дату изготовления, номер лота/партии, срок годности, использованный для контроля качества среды микроорганизм, дату проведения тестирования и его резуьтаты.

**Для сред, приготовленных в лаборатории**, или не имеющих данных о контроле их качества производителем, каждая партия среды должна быть протестирована на:

- внешний вид среды (цвет, усыхание, контаминация, наличие пузырей),
- стерильность,
- ростовые свойства и активность АБП в средах для ТЛЧ.

Для проверки активности АБП в средах необходимо проверить каждую партию сред с применением чувствительного ко всем АБП и моноустойчивых контрольных штаммов МБТ. Эта проверка может проводиться параллельно с ТЛЧ клинических изолятов.

Процедуры контроля качества сред в лаборатории должны быть изложены письменно в электронном виде и/или на бумажных носителях (в виде СОПов). В специальном журнале необходимо зарегистрировать поступившую в лабораторию партию готовой среды, дату поступления, результаты ее контроля качества, условия и место хранения. Результаты контроля качества партий сред, приготовленных в лаборатории, также должны быть зарегистрированы в журналах контроля качества (примеры формы журналов приведены в Приложениях 9, 10).

**Внешний контроль качества** с применением контрольных штаммов (ВОК) является ретроспективным анализом качества тестирований и направлен на выявление системных ошибок при проведении тестирований. ВОК осуществляется в форме участия лаборатории в межлабораторных сличениях, проводимых организациями, аккредитованными для проведения межлабораторных сличений (при наличии), например,

ФСВОК или международные системы внешней оценки качества. В случае неудовлетворительной оценки полученных результатов руководитель лаборатории обязан принять экстренные меры по выявлению причин ошибок и их устранению.

**Улучшение качества исследований.** Выявление ошибок при контроле качества недостаточно для обеспечения качественной работы лаборатории: необходимо предпринять корректирующие действия для того, чтобы исправить выявленные ошибки, устранить несоответствия установленным правилам и стандартам. При устранении выявленных несоответствий бывают необходимы финансовые вложения: обучение персонала, закупка новых реагентов и расходных материалов, нового оборудования. Однако проведение контроля качества бессмысленно, если невозможно проведение мероприятий по ликвидации выявленных недостатков.

Корректирующие мероприятия, приводящие к улучшению качества исследований в лаборатории, могут включать в себя, в том числе:

- организационные мероприятия – совершенствование организации выполнения процессов исследования;
- совершенствование методической базы;
- повышение квалификации персонала;
- закупка нового оборудования, расходных материалов и реагентов, смена поставщика;
- мероприятия по управлению оборудованием и реагентами.

## 4. Тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза методом пропорций

### 4.1. Общие положения

В клинических рекомендациях для тестирования чувствительности МБТ к АБП рекомендован непрямой метод пропорций. В случае применения непрямого метода ТЛЧ на первом этапе исследования проводится выделение МБТ из клинических образцов с последующим посевом гомогенной суспензии или культуры, выросшей на жидкой среде, на контрольную и содержащую препарат плотную или жидкую среду.

Метод пропорций был разработан Canetti, Rist и Grosset в 1963 году и Middlebrook и Cohn в 1985 году. В настоящее время применяется метод пропорций на плотных средах (ЛЙ и Миддлбрука 7H10 и 7H11), а также модифицированный метод пропорций на жидкой среде Миддлбрука 7H9 с использованием автоматического бактериологического анализатора BACTEC MGIT. В настоящее время метод пропорций применяется для тестирования чувствительности МБТ к АБП в большинстве стран мира.

При применении этого метода определяется доля резистентных микобактерий в культуре изолята МБТ. Если на среде с препаратом в КК доля резистентных бактерий ниже величины критической пропорции, изолят считается чувствительным, если выше – устойчивым. КК – это минимальная концентрация препарата, при которой отсутствует рост микобактерий «дикого» типа (чувствительных к этому препарату). Критическая пропорция - наименьшая доля бактерий, способная расти на среде с препаратом в критической концентрации и ассоциированная с клинической неэффективностью этого препарата. Критическая пропорция принимается равной 1% для всех АБП, кроме пиразинамида (10%). [1]

Долю устойчивых бактерий в культуре определяют сравнением количества выросших колоний на среде с АБП с количеством колоний, выросших на среде без препарата (контрольные образцы). Количество КОЕ (колонии образующих единиц - КОЕ) определяют путем подсчета колоний на плотных средах или по интенсивности флуоресценции при автоматической регистрации роста в системе BACTEC MGIT. Клинический изолят считается резистентным к препарату, если доля резистентных бактерий в нем выше критической пропорции для этого препарата, и считается чувствительным, если эта доля ниже критической пропорции.

Для ТЛЧ могут быть использованы только изоляты МБТ, не контаминированные другими микроорганизмами. Культуру изолята следует тщательно проверить на чистоту:

- выполняют мазок из исходной культуры, окрашивают его по Цилю-Нильсену и проверяют препарат на наличие КУБ и отсутствие других микроорганизмов;

- засевают суспензию культуры изолята на чашку Петри с кровяным агаром (шоколадным агаром или агаром с сердечно-мозговым экстрактом). Инкубируют засеянные чашки Петри при 35 ºС ± 1 ºС в течение 48 часов. Появление колоний микроорганизмов свидетельствует о контаминации культуры МБТ посторонней микрофлорой.В таком случае данная культура не может быть использована для ТЛЧ.

### 4.2. Питательные среды, применяемые для тестирования лекарственной чувствительности

Качество сред для фенотипического ТЛЧ имеет решающее значение для достоверности его результатов. Требования к составу и правилам приготовления как контрольных сред (не содержащих АБП), так и сред с АБП в их КК и КП, направлены на стандартизацию исследований и сопоставимость результатов тестов, полученных в разных лабораториях.

Применение промышленно изготовленных наборов реагентов, готовых сред или сухих смесей сред, при условии строго выполнения рекомендаций производителей по их

[1] КК определена только для системы BACTEC MGIT

применению в значительной степени снижает вероятность отклонений от стандартных прописей и правил приготовления в условиях отдельных клинических лабораторий.

*В клинических бактериологических лабораториях могут быть использованы только среды/наборы реагентов, зарегистрированные в РФ как медицинские изделия (Государственный реестр медицинских изделий https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch*).

Для ТЛЧ МБТ применяются плотные среды – содержащая яйца среда ЛЙ, агаровые среды Миддлбрука 7H10 и 7H11 и жидкая среда Миддлбрука 7H9.

**Среда ЛЙ** продолжительное время применяется в лабораториях для выполнения ТЛЧ МБТ как методом абсолютных концентраций, так и методом пропорций. Существенным недостатком этой среды является то, что получение окончательных результатов ТЛЧ необходимо ожидать 40 дней. Существенным ограничением применения среды ЛЙ является также то, что не для всех АБП для метода пропорций известны значения КК (см. таблицу 2). Включение яичной массы в состав среды делает невозможной ее стандартизацию. Среда ЛЙ может быть приготовлена в лаборатории из яиц и солей (солевая основа), входящих в состав среды. Рекомендации по приготовлению среды см. в Приложении 6, раздел 1.

***Для проведения ТЛЧ должна использоваться среда Левенштейна-Йенсена, не содержащая крахмала!***

**Среды Миддлбрука 7H10 и 7H11**, содержащие агар, более стандартны по составу, реже подвержены контаминации и могут быть разлиты как в пробирки, так и в чашки Петри. Среда 7H11 является модификацией среды 7H10 и включает в свой состав дополнительно 0,1% гидролизата казеина, благодаря чему более эффективна при выращивании клинических изолятов МБТ, резистентных к изониазиду и МЛУ изолятов. На среде Миддлбрука 7H10 рост МЛУ изолятов может быть значительно хуже, а в некоторых случаях может вовсе отсутствовать.

Значения КК для этих двух сред для некоторых АБП различны, а для бедаквилина и деламанида КК определены для среды 7H11, но не для 7H10.

Другим преимуществом агаровых сред является получение результата ТЛЧ в более короткие сроки, чем при использовании среды Левенштейна – Йенсена – на 28 день после посева.

Недостатком агаровых сред Миддлбрука является то, что они высыхают быстрее, чем среда ЛЙ, особенно если они разлиты в чашки Петри. Дневной свет и ультрафиолет, подогрев (для вторичного расплавления агара), хранение при $+4^0$C более 4 недель приводит к выделению формальдегида, подавляющего рост МБТ.

При приготовлении сред Миддлбрука применяют готовые сухие смеси/основы. Перед разливом сред в них добавляют также имеющуюся в продаже добавку OADC, содержащую

олеиновую кислоту, альбумин, декстрозу и каталазу. Приготовление агаровых сред Миддлбрука изложено в Приложении 7, раздел 1.

**Жидкая среда Миддлбрука 7H9** значительно сокращает сроки получения результатов ТЛЧ по сравнению с агаровыми средами Миддлбрука и средой ЛЙ – результаты могут быть учтены на 7-14 день, но для количественного учета результатов культивирования на жидких средах необходимо специальное оборудование.

Пробирки MGIT для ТЛЧ в системе BACTEC MGIT содержат модифицированную среду Миддлбрука 7H9 и добавленную перед засевом добавку OADC, содержащую альбумин, декстрозу и каталазу.

**Для приготовления сред с АБП** могут быть использованы только химически чистые субстанции препаратов.

***Внимание! Не допускается использование лекарственных форм препаратов для ТЛЧ!***

Определение чувствительности МБТ к антимикробным препаратам определяется в отношении КК активного АБП. Однако содержание активного вещества в субстанции АБП может быть ниже 100%. Содержание активного вещества, выраженное в единицах активности или соответствующих им концентрациях чистого вещества в мг/г или в процентах, указывается производителем субстанции в паспорте к партии субстанции АБП либо на этикетке, либо эта информация может быть размещена на сайте производителя, где ее можно уточнить по номеру серии, указанному на этикетке. При определении доли активного вещества учитывается химическая чистота субстанции, а также массовая доля активного начала в используемой форме вещества (исходя из химической формулы активного вещества и его молекулярной массы, содержания в молекуле других ионов, содержания связанной воды в субстанции). При расчете массы навески субстанции ее величина, определенная с учетом необходимого объема исходного рабочего раствора, должна быть скорректирована путем деления на коэффициент содержания активного вещества и коэффициент чистоты субстанции. Расчеты этих коэффициентов приведены в Приложении 4.

***Внимание! Наборы для ТЛЧ для отдельного клинического изолята (контрольные пробирки/чашки Петри/сегменты чашек Петри со средой без препаратов и пробирки/чашки Петри/сегменты чашек Петри со средами с АБП) должны быть приготовлены из одной партии среды!***

Наборы для ТЛЧ на плотных средах должны включать 2 пробирки/чашки Петри/секции чашки Петри со средой без АБП и по одной пробирке/чашке Петри/секции чашки Петри со средой с каждым АБП в его КК и КП.

Наборы сред для ТЛЧ на жидких средах с применением BACTEC MGIT включают одну контрольную пробирку и пробирки с АБП. Необходимы специальные штативы для размещения пробирок в приборе. Количество гнезд в штативах определяется количеством пробирок с АБП для каждого тестируемого изолята плюс контрольная пробирка без АБП.

### 4.3 Постановка теста лекарственной чувствительности методом пропорций

Технология постановки ТЛЧ с использованием различных сред представлена в Приложениях 6-8.

### 4.4. Учет и интерпретация результатов ТЛЧ на плотных питательных средах. Регистрация результатов

Заключение о чувствительности или резистентности изолята к противотуберкулезному препарату делается по результатам сравнения числа колоний, выросших на среде без препарата, и на среде с препаратом путем вычисления пропорции (процентной доли) колоний, выросших на этих средах. Изолят считается устойчивым к препарату, если процентная доля КОЕ, выросших на среде с этим препаратом в КК, равна или превышает 1% от количества КОЕ, выросших на среде без препаратов (с учетом разведения суспензии), и считается чувствительным к препарату, если процентная доля КОЕ, выросших на среде с этим препаратом в КК, менее 1% от количества КОЕ, выросших на среде без препарата (с учетом разведения суспензии).

При оценке количества колоний в тесте, в первую очередь, необходимо оценить качество посеянной суспензии и ее разведения.

1. Если на контрольной среде, засеянной разведением $10^{-2}$, присутствует менее 20 колоний, тест необходимо повторить. В этом случае отсутствие роста на средах с препаратами может быть результатом недостаточного количества КОЕ, заключение о чувствительности изолята к препаратам будет ошибочным. Однако при обнаружении колоний на средах, содержащих АБП, может быть сделано предварительное заключение о резистентности к этим препаратам (вероятность ложной резистентности из-за ошибки в разведениях маловероятна). Такой результат можно сообщить клиницисту как предварительный. Тест необходимо повторить.

2. Засев должен быть оценен как избыточный, если на контрольной среде, засеянной суспензией в $10^{-4}$ разведении, наблюдается более 200 колоний или сплошной газон. Интерпретировать результаты для такого изолята нужно с осторожностью, т. к. присутствие большого количества бактерий может снизить эффективную концентрацию противотуберкулезного препарата за счет механизмов абсорбции или деградации до точки, при которой могут размножаться чувствительные бактерии, что может привести к ложной

резистентности. Однако, если на среде, содержащей противотуберкулезный препарат, роста нет, то изолят может считаться чувствительным, такой результат может быть сообщен клиницистам. Тест необходимо повторить.

3. При получении на контрольных средах, засеянных суспензией в разведении $10^{-4}$, не более 200 колоний, результаты ТЛЧ считаются валидными.

При расчете процентной доли МБТ, резистентных к АБП, учитывают количество колоний, выросших на среде без препарата и на среде с препаратом, засеянных суспензией в одном и том же разведении. Расчет производится по формуле:

$$\frac{\text{Количество колоний на среде с противотуберкулезным препаратом}}{\text{Количество колоний на контрольной среде}} \times 100\%$$

Результат следует интерпретировать как устойчивый, если отношение количества КОЕ на среде, содержащей противотуберкулезный препарат, к их количеству на контрольной среде (с учетом разведения суспензии в контрольной пробирке/чашке Петри/ секции чашки Петри) составляет 1% или более. Если отношение менее 1%, то культура микроорганизма считается чувствительной.

Пример 1. На контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-4}$, выросло 60 колоний, на контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$ – сплошной газон. На среде с изониазидом, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$, выросло 70 колоний. Поскольку контроль был засеян суспензией в разведении $10^{-4,}$ а среда с изониазидом- суспензией в разведении $10^{-2}$, количество колоний на контрольной среде необходимо умножить на 100. Процентная доля резистентных КОЕ в этом изоляте составляет (70*100%)/(60*100) = 1,13%. Доля резистентных МБТ в культуре этого изолята больше 1%, изолят резистентен к изониазиду.

Пример 2. На контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-4}$, выросло 200 колоний, на среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$– сплошной газон. На среде с изониазидом, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$, выросло 2 колонии. С учетом разведений процентная доля резистентных КОЕ в этом изоляте составляет (2*100%)/(200*100) = 0,01%. Доля резистентных МБТ в культуре этого изолята меньше 1%, изолят чувствителен к изониазиду.

Результаты ТЛЧ заносятся в журнал (Приложения 6,7) и как количество КОЕ в контроле и на средах с препаратами, и как процентная доля КОЕ, резистентных к каждому препарату. Результаты представляются в отчете клиницисту как заключение – устойчив (Уст.) или чувствителен (Ч) (Приложение 13).

### 4.5. Модифицированный метод пропорций на жидкой среде

**Общие положения.** Наиболее распространенный модифицированный метод пропорций на жидкой среде – метод с применением бактериологического анализатора с автоматизированной детекцией роста к АБП 1-го и 2-го ряда (BACTEC MGIT). Система BACTEC MGIT является закрытой высокоавтоматизированной и компьютеризированной системой, допускающей применение устройства, сред, расходных материалов и программного обеспечения только одного производителя. При проведении ТЛЧ с применением системы BACTEC MGIT необходимо строго следовать инструкции производителя.

Метод основан на применении устройства BACTEC 960 на 960 пробирок (также возможно использование устройства на 320 пробирок), одноразовых пробирок MGIT с7 мл среды со встроенным в дно пробирок (залитым силиконом) флуорохромом (ТРИС (4,7-дифенил-1, 10-фенонтролин) пентагидрат хлорида рутения), флуоресценция которого гасится в присутствии кислорода. По мере расхода свободного кислорода при росте культуры бактерий интенсивность флуоресценции возрастает. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна степени истощения кислорода. Прибор BACTEC MGIT автоматически измеряет интенсивность флуоресценции. Бактериологический анализатор поддерживает температуру инкубации культур $37^0$C.

В системе используется модифицированная среда Миддлбрука 7H9, дополненная ростовой добавкой OADC (состоящей из олеиновой кислоты, альбумина, декстрозы и каталазы), необходимой для роста МБТ. OADC добавляется в питательную среду перед ее засевом суспензией изолятов МБТ.

**Принцип метода.** Оценка чувствительности к АБП клинических изолятов в системе BACTEC MGIT проводится по тем же принципам, что и при ТЛЧ на плотных средах: путем сравнения интенсивности роста в среде без АБП и в средах с АБП. Суспензию изолята засевают в две пробирки MGIT с модифицированной средой Миддлбрука 7H9. В одну из пробирок добавляется антибактериальный препарат в КК, обе пробирки инкубируют при $37^0$C в самом бактериологическом анализаторе. Интенсивность роста в пробирке с препаратом сравнивается с интенсивностью роста в пробирке без препарата (контрольной пробирке). Если исследуемый препарат активен в отношении микобактерий, то рост в среде с этим препаратом будет подавлен, и в исследуемой пробирке будет наблюдаться ингибирование флуоресценции, в то время как рост в контрольной пробирке не будет подавлен, и флуоресценция будет нарастать. Принципы оценки чувствительности МБТ к препаратам 1-го и 2-го рядов, соответствующие методу пропорций, были адаптированы к

ТЛЧ в системе BACTEC MGIT. Для обеспечения соблюдения 1% критерия суспензию изолята для засева среды, не содержащей АБП (контроль), разводят в 100 раз по сравнению с суспензией, применяемой для засева в среду, содержащую антибактериальный препарат. Рост в двух пробирках сравнивают в момент, когда рост в контрольной пробирке достигает заданного порога ростовых единиц (GU -Growth Units). Продолжительность ТЛЧ с применением BACTEC MGIT обычно занимает от 4 до 13 дней. Для некоторых лекарственно-устойчивых изолятов может потребоваться удлинение времени инкубации свыше 14 дней. Для оценки чувствительности к пиразинамиду в контрольную пробирку засевают суспензию, разведенную в 10 раз, время инкубации составляет 21 день.

Рост культуры контролируется в системе BACTEC MGIT автоматически самим прибором и измеряется в единицах роста (Growth Units - GU). Для препаратов первого ряда прибор автоматически интерпретирует разницу между GU в контрольной пробирке и в пробирке с препаратом, результат выдается прибором как «чувствительный» или «устойчивый». Для препаратов второго ряда значения GU также известны, однако программное обеспечение не обеспечивает сравнения GU в контрольной пробирке и в пробирке с препаратом. Результаты ТЛЧ для препаратов 2-го ряда оператор должен интерпретировать самостоятельно.

## 5. НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации"
2. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
3. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 №3 (ред. от 14.02.2022) «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»
4. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 24 декабря 2020 года N 44 «Об утверждении санитарных правил СП 2.1.3678-20 "Санитарно-эпидемиологические требования к эксплуатации помещений, зданий, сооружений, оборудования и транспорта, а также условиям деятельности хозяйствующих субъектов,

осуществляющих продажу товаров, выполнение работ или оказание услуг"» (с изменениями на 14 апреля 2022 года)

5. СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 N 4

6. Методические указания МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 23.12.2005 г.

7. Методические указания МУ 1.3.1877-04 «Порядок сбора, упаковки, хранения, транспортирования и проведения лабораторного анализа биологического материала от больных (и умерших) пациентов с подозрением на тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)», утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 4.03.2004.

8. Руководство Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях», утвержденное Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации от 04.03.2004 г.

9. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза - М, 2015. - 35 с.

10. Приказ Минтруда России от 14.03.2018 года N 145н Профессиональный стандарт «Специалист в области клинической лабораторной диагностики»

11. Приказ Минтруда России от 08.06.2021 N 384н "Об утверждении профессионального стандарта "Специалист в области медицинской микробиологии"

12. Приказ Минздрава России от 18.05.2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных тестирований" (с изменениями и дополнениями)

13. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», 2022. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/16_2

14. Национальный Стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ЕН 12469–2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности», утвержденный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29.12.2010 г. № 1144-ст.

15. Национальный Стандарт Российской Федерации. ГОСТ Р ИСО 15189–2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», утвержденный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27.04.2015 г. №297-ст.

## 6. РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Голышевская В.И., Шульгина М. В., Севастьянова Э. В. и др. Культуральные методы диагностики туберкулёза Учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулёзной службы / УМО-107 Министерство здравоохранения и социального развития РФ, ЦНИИ туберкулеза РАМН, Фонд «Российское здравоохранение», М., ООО «Триада», 208 стр.

2. Кравченко М. А., Вахрушева Д. В., Шульгина М. В. Внутренний контроль качества при микробиологических исследованиях с целью диагностики и контроля лечения туберкулеза. Методические рекомендации Уральского НИИ фтизиопульмонологии/ Екатеринбург, 2006,40 с.

3. Foundation for Innovative New Diagnostics и доступное по адресу: https://www.finddx.org/wp-content/ uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf Обращение июнь 2022.

4. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in European Union. ECDC Technical report. ECDC, 2018. - 119 p. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TB-handbook-2018-final.pdf Обращение июнь 2022.

5. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. - WHO, 2018.- 39 p. https://apps.who.int/iris/handle/10665/275469 Обращение июнь 2022.

6. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis (WHO/CDS/TB/2018.5). Geneva: World Health Organization; 2018.- 132 p. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf. Обращение июль 2022.

7. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine) -WHO, 2018.107p. https://www.who.int/publications/i/item/9789240017283 Обращение июль 2022.

8. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых», 2022 г.

**Приложение 1**

**Оснащение бактериологической лаборатории для проведения тестирований чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам фенотипическими методами**

**Минимальный стандартный список оборудования** (дополнительно к оборудованию бактериологической лаборатории)

| № | **Наименование оборудования и его основные технические характеристики** | Кол-во | Номер из таблицы стандарта оснащения* | Код вида номенклатурной классификации медицинских изделий | Наименование вида медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Бокс микробиологической безопасности (для защиты персонала, окружающей среды и продукта) II класса биологической безопасности с вертикальным потоком воздуха и «HEPA» фильтром (для проведения тестов на лекарственную чувствительность и для процессов с использованием жидких питательных средах и автоматизированных или полуавтоматизированных систем).<br>Рекомендуемая ширина рабочей поверхности бокса – 1500-1800 мм,<br>2 электрические розетки, освещение, УФ-лампа. | 1 | 1 | 273230 | Бокс |
| 2 | Ламинарный шкаф для защиты продукта при приготовлении питательных сред (с горизонтальным или вертикальным ламинарным потоком воздуха и с УФ-лампой),<br>Рекомендуемая ширина рабочей поверхности шкафа – 1200 мм. | 1 | 1 | 228180 | |
| 3 | Весы лабораторные электронные, 500 г./0,01 г. | 1 | 44 | 261490 | Весы лабораторные |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Весы аналитические электронные, 50 г./ 0,1 мг; класс точности 2. | 1 | 44 | 124500 | |
| 5 | Оборудование для термальной комнаты или термостаты на 35 - 37°C для культивирования МБ (рекомендуемый объем термостатов – не менее 500 л, микропроцессорное управление, принудительная вентиляция). Количество термостатов определяется в зависимости от их объема и нагрузки лаборатории. | 1 комплект оборудования для термальной комнаты или не менее 4 термостатов | 4** | 261720<br>134410<br>220210<br>336810 | Термостат/ инкубатор |
| 6 | $CO_2$-инкубатор для культивирования микобактерий | 1 для лабораторий уровня II | 5** | 241170<br>274490<br>266950<br>266910<br>266920 | Термостат анаэробный |
| 7 | Автоматическая система регистрации роста микобактерий (для процессов с использованием жидких питательных сред и автоматизированных систем).<br>Рекомендуемая модель – BACTEC MGIT 960 или 320 | 1 | 12** | 245230 | Анализатор для идентификации/ определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам |
| 8 | Облучатель бактерицидный настенный (рекомендуемая модель – с двумя УФ лампами). | 1 на комнату | 46** | 131980<br>152690<br>375930<br>292620<br>152700 | Установка для обеззараживания воздуха |
| 9 | Облучатель бактерицидный переносной (рекомендуемая модель – с 6 УФ лампами). | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 | Встряхиватель типа Vortex (с регулировкой оборотов). | 1 | 25 | 261700 | Встряхиватель лабораторный |
| 11 | Денситометр<br>Рекомендуемая модель: Денситометр ИВД, полуавтоматический | 1 на 1 рабочее место | 6** | 202130<br>202140<br>245220 | Денситометр/ нефелометр |
| 12 | Таймер 0-60 мин. или набор песочных часов на 5, 3 и 1 минуту. | 1 | Н.д. | Н.д. | Н.д. |
| 13 | pH-метр, класс 2. | | 36 | 165080 | Прибор для измерения водородного показателя (показателя pH) |
| 14 | Электрическая водяная баня с терморегулятором. | 3 | 29** | 108720<br>261720 | Термостат |
| 15 | Лабораторный холодильник для хранения питательных сред, большого размера (рекомендуемый объем – 800–1000 л., температура 0-+4°С) со стеклянной или металлической дверью. | 2 | 38** | 215850<br>261620 | Холодильник для хранения медицинских изделий и образцов биоматериала<br>. |
| 16 | Двухкамерный бытовой холодильник (0-+8°С) с морозильной камерой (до -20°С), – для хранения инфицированных материалов и культур. Рекомендуемый объем холодильной камеры - 200-300 л, морозильной камеры – не более 100 л. | 1 | | | |
| 17 | Лабораторная морозильная камера, от -20°С до -70°С. Рекомендуемый объем – 500 л. | 2 | 39** | 305950<br>122990<br>321680 | Холодильник низкотемпературный для хранения |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 136340<br>145090<br>261620 | медицинских изделий и образцов биоматериала |
| 18 | Настольный бутылочный дозатор для розлива среды в пробирки (в комплектации с бутылями).<br>Рекомендуемая модель: флакон-диспенсер переменного объема (диапазон дозирования 5-25 мл) с бутылями на 1 л и на 2,5 л. | 2 | 15** | 124480<br>124540<br>292390<br>261390<br>292310 | Дозатор |
| 19 | Автоматическая пипетка, одноканальная, с переменным объемом до 200 мкл, со сбрасывателем, с комплектом наконечников (5 000 шт.). | по числу рабочих мест | | | |
| 20 | Автоматическая пипетка, одноканальная, с переменным объемом от 200 мкл до 1000 мкл, со сбрасывателем, с наконечниками (5 000 шт.). | | | | |
| 21 | Автоматическая пипетка, одноканальная, с переменным объемом от 1 мл до 5 мл, со сбрасывателем, с наконечниками (5 000 шт.). | | | | |
| 22 | Автоматическая пипетка, одноканальная, с переменным объемом от 1 мл до 10 мл, со сбрасывателем, с наконечниками (5 000 шт.). | | | | |
| 23 | Пипеточный дозатор (ручной мини насос для работы с любыми стеклянными или пластиковыми пипетками объемом от 1 мл до 50 мл, диапазон дозирования от 0,1 мл до 50 мл) с набором пластиковых одноразовых пипеток на 25 мл и 50 мл (по 100 шт.). | | | | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 24 | Ручной дозатор с регулируемым объемом дозируемой жидкости (степпер), диапазон дозирования от 0,1 до 5 мл с набором одноразовых стерильных наконечников-шприцов (1000 шт.) | | | | |
| 25 | Система автоматической регистрации температур в лабораторном оборудовании (холодильниках, термостатах и т.п.) | 1 на один прибор | Н.д. | Н.д. | Н.д. |
| 26 | Набор стандартов по МакФарланду | 2 | Н.д. | Н.д. | Н.д. |
| 27 | Аппарат для свертывания питательных сред | 2 | Н.д. | Н.д. | Н.д. |

* Указано соответствие названия оборудования наименованию медицинского изделия и коду его номенклатурной классификации как в стандарте оснащения микробиологической лаборатории, утвержденном Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н с дополнениями приказа МЗ 1№7088н «Правила проведения лабораторных тестирований», Приложение 8

** Необходимо наличие одной из указанных позиций

**Примерный список лабораторной посуды, инструментов и расходных материалов, необходимых для тестирования чувствительности 1000 клинических изолятов к АБП в год.**

| № | Наименование | Кол-во |
|---|---|---|
| **Лабораторная посуда и инструменты** | | |
| 1 | Пробирки 16 мм | |
| 2* | Чашки Петри из полистирола диаметром 90 мм односекционные для тестирований на агаризованных средах | 7000 для препаратов 1-го ряда<br>9000 для препаратов 2-го ряда |
| | Чашки Петри из полистирола диаметром 90 мм четырех- или трехсекционные для тестирований на агаризованных средах | 2000 или 3000 для препаратов 1-го ряда<br>2500 или 3000 для препаратов 2-го ряда |
| | Чашки Петри из полистирола диаметром 35 мм для тестирований на агаризованных средах | 5500 для препаратов 1-го ряда<br>9000 для препаратов 2-го ряда |
| 3** | Криопробирки с завинчивающимися крышками, 2 мл из полистирола<br>для замораживания и хранения бактериальных культур<br>Рекомендуемая модель: со штрихкодами | 500 |
| | Пробирки типа Эппендорф, 1, 5 мл из полистирола | 1000 |
| 4 | Криоштативы для хранения криопробирок с замороженными бактериальными культурами<br>На 10 криопробирок | 20 |
| 5 | Колбы стеклянные (желательно из боросиликатного стекла), конические, градуированные, термостойкие (Эрленмейера) с узким горлом:<br>на 250 мл<br>на 500 мл<br>на 1000 мл | <br>30<br>20<br>10 |
| 6 | Колбы круглые плоскодонные:<br>на 250 мл<br>на 500 мл | <br>2<br>2 |
| 7 | Стаканы стеклянные мерные, градуированные, термостойкие (желательно из боросиликатного стекла):<br>на 100 мл<br>на 250 – 300 мл<br>на 500 – 600 мл<br>на 1000 мл | <br>5<br>5<br>5<br>5<br>5 |

| | | |
|---|---|---|
| 8 | Цилиндры мерные, стекло или автоклавируемый пластик:<br>на 25 мл<br>на 100 мл<br>на 250 мл<br>на 500 мл<br>на 1000 мл | <br>2<br>2<br>2<br>2<br>2 |
| 9 | Воронки химические (лабораторные), конические, стеклянные, с узким носиком:<br>диаметром 75 ÷ 110 мм<br>диаметром 100 ÷ 150 мм | <br>2<br>4 |
| 10 | Флаконы для реагентов:<br>на 50 мл<br>на 100 мл<br>на 250 мл<br>на 500 мл<br>на 1000 мл | <br>10<br>10<br>5<br>5<br>2 |
| 11 | Пипетки, измерительные, градуированные, на полный слив:<br>на 1 мл<br>на 2 мл<br>на 5 мл<br>на 10 мл | <br>300<br>200<br>100<br>100 |
| 12 | Штативы пластиковые, автоклавируемые, на 24 гнезда, для центрифужных пробирок объемом 50 мл, диаметром 30 мм. | 8 |
| 13 | Груша силиконовая для пипеток | 5 |
| 14 | Термометр, стекло, 20°-110°. | 2 |
| 15 | Стеклянные палочки 250 мм. | 100 |
| 16 | Лопаточка бактериологическая из нихрома с держателем. | 50 |
| 17 | Шпатели (лопатки) для взвешивания навесок, из нержавеющей стали:<br>- с лопаточкой на 15 см,<br>- с двумя микро лопаточками. | <br>2<br>2 |
| 18 | Пробирки боросиликатные на 30 мл с крышкой – винт (для постановки тестов на ЛЧ МБТ). | 500 |
| 19 | Бусы – шарики стеклянные, боросиликатные, диаметром 3 мм | 1 кг<br>(2 уп.) |
| 20 | Лента для герметизации пробок типа Парафильм. | 2 |

| | | |
|---|---|---|
| 21 | Перчатки латекс, одноразовые, все размеры. | 2 000 |
| 22 | Халаты одноразовые. | 250/человека |
| 23 | Шапочки одноразовые. | 250/человека |
| 24 | Бахилы одноразовые. | 250/человека |
| 25 | Маски защитные (противоаэрозольные респираторы) одноразовые, степень защиты FFP3. | 300 |
| 26 | Перчатки латекс, одноразовые, стерильные разных размеров. | 1000 |

* Необходимо наличие одной из указанных позиций

**Приложение 2**

**Хранение культур клинических изолятов и контрольных штаммов микобактерий туберкулеза**

**Общие положения.** Все клинические изоляты и эталонные штаммы микобактерий, используемые для контроля качества, должны храниться с соблюдением действующих санитарных правил и в условиях, сохраняющих их жизнеспособность и специфические характеристики. При отправке культур клинических изолятов для ТЛЧ в другую лабораторию необходимо следовать правилам транспортировки ПБА III группы патогенности, в том числе оформлять соответствующие сопроводительные документы, определенным в действующих санитарных правилах.

В лаборатории должны быть разработаны и утверждены руководителем медицинской организации правила хранения клинических изолятов и эталонных штаммов микобактерий туберкулеза, определяющие, в том числе, условия и сроки хранения клинических изолятов и эталонных образцов и состав рабочей коллекции эталонных штаммов. Для контроля качества партий сред для ТЛЧ и самого ТЛЧ должны использоваться контрольные эталонные штаммы, чувствительные ко всем тестируемым АБП, и штаммы моноустойчивые хотя бы к изониазиду и рифампицину.

Клинические изоляты и эталонные штаммы микобактерий туберкулеза должны храниться в «заразной» зоне в холодильниках или морозильниках с запирающимися дверцами. Доступ к рабочей коллекции должен быть ограничен. В лаборатории должен быть назначен ответственный за хранение клинических изолятов и эталонных штаммов микобактерий туберкулеза, его/ее фамилия имя и отчество должны быть указаны в утвержденных правилах хранения клинических изолятов и эталонных штаммов

микобактерий.

В лаборатории должен вестись учет эталонных штаммов микобактерий туберкулеза в соответствии с требованиями к хранению ПБА III–IV групп патогенности в действующих санитарных правилах.

При хранении клинических изолятов и эталонных штаммов микобактерий туберкулеза необходимо избегать серийных пересевов, которые могут привести к генетическому дрейфу (накоплению мутаций) и изменению фенотипических характеристик штаммов/изолятов.

По той же причине необходимо стремиться использовать для ТЛЧ первичные клинические изоляты и только в крайнем случае прибегать к использованию субкультивированных культур.

**Хранение эталонных штаммов микобактерий туберкулеза**

В случае эталонных штаммов несколько аликвот концентрированных суспензий культур необходимо хранить в криопробирках при температуре –70°С или –20°С. Замороженные в соответствии с приведенными ниже правилами культуры могут храниться при –70°С в течение одного года. Жизнеспособность замороженных культур микобактерий, хранящихся при –20°С снижается быстрее.

*Внимание! Не допускается размораживание и повторное замораживание культур!*

**Оборудование, расходные материалы и среды, необходимые для хранения эталонных штаммов.** Для хранения эталонных штаммов в замороженном виде необходима морозильная камера, способная поддерживать температуру ≤-20°С или от -60°С до -80°С. Оптимальная температура хранения -70°С - 80°С.

*Внимание! Необходимо обеспечить бесперебойное электропитание морозильной камеры (необходим резервный источник электроэнергии, автоматически обеспечивающий электропитание приборов при отключении постоянного источника электроэнергии).*

Для хранения суспензий необходимы криопробирки с завинчивающимися крышками объемом 1–2 мл или пробирки типа Эппендорф, объемом 1,5 мл, и криоштативы, криобоксы или другие контейнеры для упорядоченного размещения пробирок в морозильнике. Использование криопробирок со штрих-кодами, считывателя штрих-кодов и компьютерной программы для учета хранящихся культур существенно облегчает работу с образцами.

Культуры микобактерий могут быть суспендированы и храниться в одной из нескольких сред:

- бульон Миддлбрука 7H9, обогащенный ADC, приготовленный в соответствии с инструкциями производителя;

- бульон Миддлбрука 7H9, обогащенный ADC, приготовленный в соответствии с инструкциями производителя, с 20% объемными процентами глицерина;
- 10% обезжиренное молоко, автоклавированное при 110°C в течение 10 минут;
- 5% или 20% объемных процента глицерина в 0,85% растворе хлорида натрия, автоклавированный при 110°C в течение 10 минут.

**Подготовка культур для замораживания.** Для замораживания используют только свежие культуры. Если культура старше 3 недель, необходимо сделать пересев на свежий скошенный агар и инкубировать его при 37°C. При появлении хорошего роста используют эту культуру для приготовления суспензии.

Отбирают как можно больше колоний с плотной среды и готовят однородную густую суспензию в одной из вышеперечисленных сред. Можно использовать и свежевыращенную на среде Миддлбрука 7H9 культуру.

*Внимание! Чем больше концентрация живых бактериальных клеток в суспензии, тем выше вероятность последующего оживления культуры!*

Наносят на пробирки дату приготовления и информацию о культуре, если на них нет штрих-кода.

Переносят примерно по 1–1,5 мл суспензии или культуры, выращенной на среде Миддлбрука 7H9**,** в криопробирки или пробирки типа Эппендорф с соблюдением правил асептики.

Плотно закрывают крышки пробирок (завинчивают крышки криопробирок), обеспечивая их герметичность.

Пробирки размещают в контейнере и помечают контейнер датой приготовления хранящихся в них аликвот и данными о хранящихся в них штаммах. Переносят контейнеры в морозильную камеру для длительного хранения.

Необходимо внести данные о помещенных на хранение штаммах в журнал (в электронной форме или на бумажном носителе) или программу учета образцов, находящихся в коллекции.

**Оживление культур.** Для оживления замороженных культур размораживают содержимое криопробирки при комнатной температуре и проводят засев всего содержащегося объема суспензии в пробирку с 7 мл стерильной жидкой среды Миддлбрука 7H9, обогащенной ADC, или на плотную питательную среду. Инкубируйте при $37^0$ C.

*Недопустимо повторное замораживание суспензии!*

**Приложение 3**

**Общие правила приготовления сред и растворов**

Все реактивы, применяемые при этиологической диагностике туберкулеза, должны иметь степень очистки не ниже категории "химически чистый" (ХЧ). **Не следует использовать реактивы категории «чистый» (Ч).**

Для приготовления растворов антибактериальных препаратов, применяемых для ТЛЧ, используют только химические субстанции, для которых производитель указал степень чистоты субстанции или долю активного вещества в ней, а также химическую формулу активного вещества.

***Внимание! Не допускается использование лекарственных форм препаратов для ТЛЧ!***

При приготовлении сред и иных растворов необходимо использовать химически чистую лабораторную посуду, а также свежеприготовленную дистиллированную, стерильную воду. Приготовление среды должно в точности соответствовать инструкциям производителя (если применимо) или методическим указаниям и рекомендациям. ***Недопустимы модификации состава среды!***

**Помещения для приготовления сред и растворов**. Приготовление сред и других растворов, применяемых в бактериологических исследованиях для диагностики туберкулеза, проводится в отдельных помещениях в «чистой» зоне лаборатории.

Во избежание загрязнения сред и иных растворов посторонней микрофлорой помещения, где приготавливаются среды, содержат в максимальной чистоте. Необходимо ежедневно проводить уборку с применением дезинфицирующих средств; перед приготовлением сред необходимо подвергать помещение обработке УФ.

Для приготовления сред:

- используют только стерильную посуду;

***Внимание! При приготовлении растворов бедаквилина и сред, содержащих бедаквилин, допускается использовать только стеклянную или полистироловую посуду.***

- Необходимо использовать точно взвешенные количества реагентов;
- для приготовления растворов необходимо использовать мерную посуду, следует доводить объем раствора по нижней границе мениска (в мерных цилиндрах и мерных пипетках) (см. рис. 1);

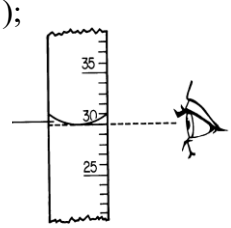
мениск 


Рисунок 1. Доведение объема раствора по нижней границе мениска.

- при приготовлении среды объемом более 1 л может быть использована мерная посуда большого диаметра (например, колбы, широкие стаканы), в этом случае объем раствора/среды доводят до верхней границы мениска;
- необходимо строго соблюдать асептику при розливе сред и растворов, например, обжигать горлышки пробирок и колб. По возможности необходимо проводить работы по розливу сред и растворов в ламинарных боксах, обеспечивающих защиту продукта, чистую рабочую зону (класс III в соответствии с ISO 14644-1);
- не допускается подвергать приготовленную среду воздействию УФ лучей. Готовые среды следует хранить в темноте, в холодильнике;
- необходимо разливать в пробирки по 5 мл среды, в чашки Петри диаметром 90 мм односекционные ─ 20 мл, диметром 35 мм – 5 мл среды;
- необходимо выполнять контроль качества каждой партии сред (Приложения 6, 7).

**Приготовление навесок**. Для приготовления сред применяются весы с точностью взвешивания не менее 0,01 г и возможностью взвешивания не менее 100 г.

Для приготовления растворов антибактериальных препаратов применяются аналитические весы с точностью взвешивания не менее 0,0002 г, и с возможностью взвешивания не менее 1 г.

Весы должны проходить ежегодную поверку уполномоченными организациями. Весы должны быть установлены на устойчивом столе со строго горизонтальной поверхностью, вдали от возможных источников вибрации и движения воздуха. Необходимо проводить настройку (центровку) согласно рекомендациям производителя).

При взвешивании веществ необходимо соблюдать следующие правила:

- следует осуществлять взвешивание в специальном контейнере (флаконе),
- необходимо учесть вес контейнера до того, как на него будет помещено взвешиваемое вещество; (если весы имеют функцию «Тара», используйте ее);
- для каждого индивидуального вещества необходимо использовать свой контейнер (флакон) для взвешивания, в котором далее будет осуществляться его растворение, и одноразовый шпатель для забора вещества (или многократного применения, но обрабатываемого после каждого взвешивания). **Недопустимо перекрестное загрязнение реактивов!**
- недопустим перенос вещества из контейнера для взвешивания обратно в банку с веществом. В случае избытка вещества в навеске пересчитайте объем приготовляемого раствора соответственно ее массе.

Весы и разновесы необходимо оберегать от пыли, загрязнений и влаги!

После работы следует всегда арретировать (застопорить) весы и закрыть их чехлом!

**Приложение 4**

**Приготовление, разведение и хранение растворов антибактериальных препаратов**

**1. Общие положения.**

***ВНИМАНИЕ! Для определения чувствительности МБТ к ПТП должны применяться только чистые субстанции препаратов. Использование лекарственных форм недопустимо!***

Субстанции препаратов хранятся в соответствии с указанием их производителей. ***Не допускайте обводнения и загрязнения субстанций!***

При взятии навесок субстанций АБП для уменьшения ошибки взвешивания следует взвешивать навески массой не менее 20 мг (лучше более 100 мг), готовя большие объемы растворов. *Погрешность навески не должна превышать 1,5%.* Растворы, не использованные для внесения в среды сразу после их приготовления, допускается хранить в замороженном состоянии (см. ниже).

**2. Расчет корректирующих коэффициентов с учетом содержания в субстанции активного вещества и ее химической чистоты.**

Значения КК/КП АБП в таблице приведены для активного вещества – собственно АБП, содержание которого в субстанции может существенно отличаться от 100%, варьировать у различных производителей и от лота к лоту. При расчете массы активного вещества учитывается масса молекул воды, остатков солей, катионов, входящих в состав брутто-формулы молекулы, содержащей структуру с собственно антибактериальной активностью. Помимо дополнительных составляющих молекулярной формы АБП, в состав субстанции могут входить вещества, не удаленные полностью при ее производстве. Доля активного вещества определяется производителем субстанции и должна содержаться в сопроводительных документах при ее продаже.

2.1. **Расчет навески АБП исходя из указанного производителем содержания активного вещества**. Содержание активного вещества (potency), выраженное в процентах активного вещества или в единицах мкг/мг субстанции, обычно предоставляется в сертификате производителя. Масса навески, рассчитанная из значений КК/КП АБП и объема исходного «базового/маточного» раствора (раствор А), должна быть скорректирована с учетом доли активного вещества и химической чистоты субстанции, указанных производителем.

Корректирующий коэффициент $К_А$ равен массовой доле (в долях единицы) активного начала в используемой форме АБП. Например, моксифлоксацин часто выпускается в виде гидрохлорида моксифлоксацина. В гидрохлориде моксифлоксацина ($C_{21}H_{24}FN_3O_4$*HCl) активным началом является только моксифлоксацин ($C_{21}H_{24}FN_3O_4$). Массовая доля моксифлоксацина ($C_{21}H_{24}FN_3O_4$) в гидрохлориде моксифлоксацина ($C_{21}H_{24}FN_3O_4$*HCl) рассчитывается следующим образом: (M($C_{21}H_{24}FN_3O_4$)*100%)/M($C_{21}H_{24}FN_3O_4$*HCl) = (401,44*100%)/437,90 = 91,67%. Соответственно для гидрохлорида моксифлоксацина $К_А$ = 0,917.

Химическая чистота используемой субстанции АБП учитывается корректирующим коэффициентом $К_с$. Например, для гидрохлорида моксифлоксацина некоторые производители указывают на флаконе с веществом степень чистоты 98%, таким образом, для данной конкретной субстанции $К_с$ = 0,98. Чистота субстанций АБП может меняться от партии к партии и в зависимости от производителя, поэтому данные о чистоте конкретных, находящихся в лаборатории субстанций, должны быть взяты из паспортов (с этикеток) данных субстанций.

Для некоторых препаратов, например канамицина, производителем указывается совокупное значение активности, учитывающее $К_А$ и $К_с$.

2.2. **Определение корректирующих коэффициентов исходя из молекулярной массы формы АБП.** При определении доли активного вещества в субстанции исходят из его химической формулы, молекулярной массы, содержания в молекуле других химических элементов, содержания связанной воды в субстанции, а также химической чистоты субстанции. Примеры расчетов корректирующих коэффициентов с учетом доли активного вещества ($К_А$) и химической чистоты субстанции ($К_с$) приведены ниже. Скорректированную массу навески для раствора А вычисляют, деля ее значение, рассчитанное исходя из значений КК/КП и объема раствора А, на $К_А$ и $К_с$.

**Препараты 1-го ряда**

**Изониазид:** Химическая формула **$C_6H_7N_3O$,** М.М. 137,14**.** Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Чистота субстанции >99%. В этом случае нет необходимости вводить дополнительные коэффициенты для расчета навески. $К_с$= 1.

**Рифампицин:** Химическая формула **$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$,** М.М. 823,05**.** Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Химическая чистота субстанции варьирует от лота к лоту и в зависимости от производителя: 95–99%. Соответственно, $К_с$ может варьировать от 0,95 до 0,99. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Этамбутол:** Химическая формула **$C_{10}H_{24}N_2O_2$**. М.М. 204,31.

В продаже имеется дигидрохлорид этамбутола. Химическая формула **$C_{10}H_{24}N_2O_2$*2HCl**, М.М. 277,23. Активное вещество составляет 73,70%. $К_А$ = 0,737.

Чистота субстанции у большинства производителей составляет >99%, в этом случае вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1

**Стрептомицин:** Химическая формула **$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$** М.М. 583,59.

В продаже имеется субстанция дигидрострептомицина сульфата: химическая формула **$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$*3/2$H_2SO_4$,** или **2$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$*3 $H_2SO_4$**, М.М. 730,71. Активное вещество составляет 79,9%, $К_А$ = 0,799**.**

Продаваемая субстанция представляет собой белый порошок с чистотой обычно 95%–98%. Кс может варьировать: 0,95–0,98. В ряде случаев производителем может быть указана совокупная активность, например 0,75, то есть $К_А$*Кс = 0,75. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Пиразинамид:** Химическая формула **$C_5H_5N_3O$**, М.М. 123.12. Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Чистота субстанции варьирует от лота к лоту и в зависимости от производителя: 98–99%. Соответственно, $К_с$ может варьировать: 0,98 -0,99. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Препараты 2-го ряда**

**Амикацин:** Химическая формула **$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$** М.М.585.61.

В продаже имеется субстанция в форме амикацина дисульфата. Химическая формула **$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$*2$H_2SO_4$** М.М. 781.75 Часто производителем указана совокупная активность, например 0,674-0,786, то есть ($К_А$*$К_с$) =.0,674-0,786. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Бедаквилин:** Химическая формула **$C_{32}H_{31}BrN_2O_2$** М.М. 555.52. Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Чистота субстанции более 99%, вводить коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

В продаже также имеется субстанция в форме фумарата бедаквилина. Химическая формула **$C_{32}H_{31}BrN_2O_2$*$C_4H_4O_4$** М.М.671.59 Активное вещество составляет 82,72% от продаваемого вещества. $К_А$ = 0,827.

Чистота субстанции более 99%, вводить коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

**Деламанид:** Химическая формула $C_{25}H_{25}F_3N_4O_6$ М.М.534.49 Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А = 1$

Чистота субстанции 98% и выше, $К_с$=0,98. При чистоте субстанции >99% вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

**Канамицин:** Химическая формула $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$. М.М. 484,50

В продаже имеется субстанции двух форм:

Канамицин сульфат моногидрат Химическая формула $C_{18}H_{36}N_4O_{11}*H_2SO_4*H_2O$ М.М. 600.59. Канамицин моносульфат $C_{18}H_{36}N_4O_{11}*H_2SO_4$ М.М. 585.58. Часто производителем указана совокупная активность, например 0.75, то есть ($К_А$*$К_с$) = 0,75. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Капреомицин:** Химическая формула $C_{24}H_{42}N_{14}O_8$, М.М. 654,69.

В продаже имеется субстанция капреомицина сульфата. Химическая формула $C_{24}H_{42}N_{14}O_8*H_2SO_4$, М.М.752.76.

Часто производителем указана совокупная активность, например 0.70, то есть ($К_А$*$К_с$) = 0,70. Расчёт производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

**Линезолид:** Химическая формула $C_{16}H_{20}FN_3O_4$ М.М. 337.35 Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А = 1$.

Чистота субстанции 98% и выше, $К_с$=0,98. При чистоте субстанции >99% вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

**Левофлоксацин:** Химическая формула $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, М.М. 361.37. Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А = 1$.

Чистота варьирует от лота к лоту и в зависимости от производителя: 98–102%. Если чистота субстанции более 99%, вводить коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1. Расчет производится в соответствии с данными производителя для конкретной партии субстанции.

Другая форма левофлоксацина, имеющаяся в продаже, - левофлоксацин гемигидрат. Химическая формула $C_{18}H_{20}FN_3O_4*0.5H_2O$ М.М. 370.37. Активное вещество составляет 97.57%, $К_А = 0,976$.

Чистота субстанции у большинства производителей составляет >99% сухого порошка, в этих случаях вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1

**Моксифлоксацин:** Химическая формула $C_{21}H_{24}FN_3O_4$ М.М. 401.44.

В продаже имеются субстанции двух форм:

Моксифлоксацина гидрохлорид. Химическая формула **$C_{21}H_{24}FN_3O_4$*HCl** М.М. 437.90 Активное вещество составляет 91.67%, $К_А$ = 0,917.

Чистота субстанции 98% и выше, $К_с$=0,98. При чистоте субстанции >99% вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

Моксифлоксацина гидрохлорид моногидрат.

Химическая формула **$C_{21}H_{24}FN_3O_4$*HCl * $H_2O$** М.М. 455.91. Активное вещество составляет 88,05%, $К_А$ = 0,88.

Чистота субстанции 98% и выше, $К_с$=0,98. При чистоте субстанции >99% вводить дополнительный коэффициент, корректирующий величину навески, не требуется. $К_с$=1.

**Протионамид:** Химическая формула **$C_9H_{12}N_2S$,** М.М. 180.27**.** Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Чистота субстанции >98%. Если чистота субстанции 98%, $К_с$= 0,98. Если чистота субстанции более 99%, нет необходимости вводить дополнительные коэффициенты для расчета навески. $К_с$= 1.

**Этионамид:** Химическая формула **$C_8H_{10}N_2S$,** М.М. 166.24**.** Активное вещество составляет 100% от продаваемого вещества. $К_А$ = 1.

Чистота субстанции >98%. Если чистота субстанции 98%, $К_с$= 0,98. Если чистота субстанции более 99%, нет необходимости вводить дополнительные коэффициенты для расчета навески. $К_с$= 1.

## 3. Приготовление рабочих растворов антибактериальных препаратов и их разведений

Концентрации АБП в рабочих растворах зависят от их КК и КП в применяемых средах, поэтому содержание АБП в рабочих растворах различается для различных сред (см. таблицу 2). Навески АБП для приготовления растворов различаются в зависимости от объема приготовляемого исходного раствора и объема партии среды.

Общие правила взвешивания субстанций АБП и приготовления растворов – см. в Приложении 3.

При расчёте массы навески необходимо учитывать корректирующие коэффициенты $К_А$ и $К_с$.

## 4. Хранение растворов антибактериальных препаратов

*При хранении растворов АБП при температуре +5$^0$С и выше более 6 часов может произойти снижение их активности.* Поэтому, растворы АБП необходимо готовить непосредственно перед приготовлением сред. Если исходные растворы АБП приготовлены заранее, они должны быть заморожены.

Для замораживания растворы должны быть разлиты в криопробирки или пробирки типа Эппендорф (для бедаквилина – только стекло или полистирол) в объеме, необходимом для взятия аликвоты для добавления в одну порцию среды. Замороженные растворы большинства ПТП могут храниться в морозильной камере при температуре -70$^0$ С до 1 года, при -20$^0$ С – до 6 месяцев (до 3 месяцев- для бедаквилина), но не дольше истечения срока годности препарата, указанного производителем. Замороженные растворы АБП должны храниться в морозильных камерах в «чистой» зоне лаборатории.

***Внимание! Необходимо обеспечить бесперебойное электропитание морозильной камеры (необходим резервный источник электроэнергии, автоматически обеспечивающий электропитание морозильной камеры при отключении постоянного источника электроэнергии).***

*Не допускайте размораживания и повторного замораживания растворов АБП.*

**Приложение 5**

**Приготовление суспензии клинических изолятов микобактерий туберкулеза и посев на плотные среды**

***ВНИМАНИЕ! Процедура приготовления суспензии приводит к образованию инфекционного аэрозоля! Для приготовления суспензии следует использовать толстостенные (предпочтительно из боросиликатного стекла) пробирки без видимых повреждений или стерильные полипропиленовые пробирки.***

**Меры предосторожности:** Работа с культурами, а также все манипуляции с ними должны выполняться внутри БМБ.

Используйте стерильные пробирки, стерильный физиологический раствор и асептические методы работы с инфекционным материалом.

**Использование культуры, полученной на плотной среде**

Для приготовления суспензии используют первичный изолят. После пересева культуры состав популяции МБТ (например, доля резистентных бактерий) может измениться. Независимо от того, используется ли первичный изолят или субкультура, необходимо использовать активно растущую культуру, в течение 1–2 недель после появления роста. Если со дня регистрации появления роста на среде прошло более 2 недель, повторите пересев и используйте свежую культуру.

**Подготовка к выполнению процедуры приготовления микобактериальной суспензии**

Для каждой культуры готовят набор стерильных пустых пробирок и пробирок с реагентами, содержащий:

−стерильную толстостенную пробирку из боросиликатного стекла с завинчивающейся крышкой или стерильную полипропиленовую пробирку, содержащую 6–10 стеклянных бусин диаметром 3 мм и 3–6 мл стерильного физиологического раствора. Можно заменить пробирку с бусами на сухую стерильную толстостенную пробирку из боросиликатного стекла с завинчивающимися пробками и стерильные стеклянные палочки с закругленными концами;

−пробирку со стерильным физиологическим раствором – для доведения суспензии до мутности, соответствующей стандарту МакФарланда 1.0;

−стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой, диаметр которой соответствует диаметру пробирки со стандартом мутности МакФарланда 1.0;

−пробирки с завинчивающимися крышками, содержащие по 9 мл стерильного физиологического раствора - для приготовления серийных разведений;

−стерильные пипетки Пастера объемом 1 мл – 5 штук.

В БМБ также должны находиться:

−встряхиватель типаVortex,

−контейнер для использованных пипеток/наконечников с дезинфицирующим раствором,

−емкость с дезинфицирующим средством и салфетки,

−денситометр для контроля мутности суспензии МБТ (если применимо).

Проверенные и отобранные для ТЛЧ культуры расставляют в штативе в порядке возрастания номеров (номера отобранных для исследования культур заносят в лабораторный журнал регистрации результатов ТЛЧ – Приложения 6, 7);

Маркируют пробирки для приготовления суспензии номерами отобранных культур и расставляют все пробирки одного набора (для серийных разведений) в штатив в один ряд. Следует располагать ряды в порядке возрастания номеров культур.

**Процедура приготовления суспензии из культуры, выращенной на плотной среде**

- Собирают колонии со всей поверхности плотной среды, не допуская захвата питательной среды, поскольку остаточная питательная среда будет давать ложные показания мутности суспензии.

- Переносят бактериальную массу в заранее подготовленную и промаркированную пробирку со стеклянными бусами и 3–6 мл стерильного физиологического раствора, плотно закройте крышку пробирки и перемешивайте на встряхивателе типа Vortex в течение 1 минуты.

**Или***:* Собранную биомассу помещают в сухую толстостенную пробирку. Стеклянной палочкой тщательно растирают о стенки пробирки культуру микобактерий и по каплям добавляют 2–3 мл физиологического раствора. После окончания растирания биомассы в пробирку добавляют еще 1–2 мл стерильного физиологического раствора, плотно закрывают крышку пробирки и перемешают на встряхивателе типа Vortex

***Внимание! При перемешивании суспензии на встряхивателе типа Vortex должны использоваться герметично закрытые пробирки с завинчивающимися крышками!***

***Приготовленную суспензию отстаивают в течение 30 минут***

Переносят 1–2 мл жидкости из верхней части суспензии в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки со стандартом мутности МакФарланда 1 (стандарт мутности МакФарланда можно приобрести готовым; приготовление стандарта мутности МакФарланда возможно и в лаборатории – см. в Приложении 14). Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не захватить осадок.

Добавлением стерильного физиологического раствора доводят мутность суспензии до стандарта МакФарланда 1.0, контролируя ее с помощью денситометра.

**Процедура приготовления суспензии из культуры, выращенной на жидкой среде.**

Для каждой культуры готовят набор пробирок и пробирок с реагентами, содержащий стерильную толстостенную пробирку из боросиликатного стекла с завинчивающейся крышкой, содержащую 6–10 стеклянных бусин диаметром 3 мм и 0,5-1,0 мл стерильного физраствора.

Обычно используют культуру, полученную на среде Миддлбрука 7H9 с ADC и 0,05% TWEEN 80 (Приложение 7).

- Переносят 5 мл свежей культуры из жидкой среды 7H9 в пробирку с соответствующей маркировкой, содержащую стеклянные бусы. Закрывают пробирку.
- Тщательно встряхивают пробирку с использованием встряхивателя типа Vortex. Добавляют еще 5–5,5 мл физраствора.
- Дальнейшие процедуры – как при приготовлении суспензии МБТ, выращенных на плотных средах.

**Разведения суспензий.** Осуществляют десятикратные серийные разведения суспензии с мутностью, соответствующей стандарту МакФарланда 1.0 ($3x10^8$ КОЕ/мл). В пробирку, содержащую 9 мл стерильного физиологического раствора, добавляют 1 мл этой суспензии, пробирку герметично закрывают и встряхивают. Новой стерильной пипеткой/наконечником переносят 1 мл разведенной суспензии в следующую пробирку с 9 мл стерильного

физраствора, пробирку закрывают и процедуру повторяют еще дважды. В дальнейшем используют суспензию, разведенную в 100 и 10 000 раз.

При применении свежей культуры и правильно выполненных разведениях в разведении $10^{-2}$ на средах без препаратов удается получить сплошной рост, а в разведении $10^{-4}$ – поддающееся подсчету число колоний. Эти разведения применяют для засева в контрольные пробирки для определения количества живых МБТ в культуре изолята. Разведение $10^{-2}$ засевают и на среды с препаратами для определения количества бактерий, резистентных к препаратам, в культуре изолята.

**Приложение 6**

**Постановка теста на лекарственную чувствительность на среде Левенштейна-Йенсена**

**1. Приготовление среды Левенштейна-Йенсена**

Общие правила приготовления сред изложены в Приложении 3.

*ВНИМАНИЕ! Пробирки и чашки Петри со средами без АБП (контрольные) и с АБП для каждой серии ТЛЧ (для каждого изолята) должны быть приготовлены из одной партии среды!*

Среда ЛЙ — это плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерий туберкулеза получают приблизительно на 18-25-й день после посева микроскопически положительного материала.

Для проведения ТЛЧ используют среду без крахмала, содержащую солевую основу, яичную массу и раствор антисептика малахитового зеленого, предотвращающего рост на среде микроорганизмов, иных, чем микобактерии.

**Приготовление составляющих среды**

**<u>Солевая основа</u>**

| | |
|---|---|
| Калий однозамещенный фосфорнокислый $KH_2PO_4$ | 2,4 г |
| Магний сернокислый $MgSO_4 *7H_2O$ | 0,24 г |
| Магний лимоннокислый $Mg_3(C_6H_5O_7)_2 * 14H_2O$ | 0,6 г |
| L- аспарагин $C_4H_8N_2O_3 * H_2O$ | 3,6 г |
| Глицерин $C_3H_8O_3$ | 12,0 мл |
| Вода дистиллированная | 600 мл |

*Внимание! Приведенные выше массы навесок реагентов для приготовления солевой основы рассчитаны для веществ с указанным в формулах содержанием молекул воды в молекуле веществ. Если используются вещества с другой брутто-формулой, необходимо пересчитать массы навесок!*

**Приготовление солевого раствора:**

- соли последовательно растворяют в 500 мл теплой дистиллированной воды в указанной последовательности при слабом подогревании (не доводя до кипения) на водяной бане;
- L-аспарагин растворяют отдельно в 10 мл дистиллированной воды и вносят перед добавлением глицерина;
- доводят объем до 600 мл.

Солевой раствор стерилизуют в автоклаве при 1 атм. ($121^0$C) в течение 30 минут.

Срок хранения раствора составляет 3–4 недели при комнатной температуре.

**Раствор малахитового зеленого (2%):**

малахитовый зеленый (порошок) — 2 г

стерильная дистиллированная вода — 100 мл

*Внимание! Порошок малахитового зеленого легко образует пыль при пересыпании! При взвешивании реактива и его растворении используйте латексные перчатки, для защиты органов дыхания - хирургическую маску или респиратор (H318), а для защиты глаз - защитные очки.*

Взвешенный порошок малахитового зеленого суспендируют в теплой дистиллированной воде и помещают в термостат ($37^0$C) на 2,5 часа для растворения, периодически перемешивая. Полученную суспензию фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат разливают по флаконам. Приготовленный раствор не подлежит длительному хранению. При появлении осадка или изменении цвета раствор не должен использоваться.

*ВНИМАНИЕ! Приготовления яичной массы и среды необходимо осуществлять с соблюдением правил асептики, с использованием стерильной посуды и инструментов, в стерильных боксах.*

**Яичная масса**

Свежие диетические куриные яйца без трещин и дефектов скорлупы тщательно моют в теплой проточной воде, применяя щетки и мыло. Оставляют яйца в мыльном растворе на 30 минут. После этого яйца тщательно промывают в проточной воде и погружают в 70% этиловый спирт на 30 минут.

*Дальнейшие операции рекомендуется проводить в стерильном боксе, с применением стерильных инструментов и посуды. Применяйте стерильные латексные перчатки!*

Вымытые яйца переносят на стерильную поверхность и высушивают.

Яйца разбивают в стерильную посуду, доводя общий объем яичной массы до 1 л (для этого требуется, в среднем, 20–25 яиц, в зависимости от их величины).

***Внимание! Необходимое количество яичной массы определяется по объему, а не по количеству яиц!***

Тщательно взбивают яичную массу стерильным венчиком или в стерильном миксере при минимальной скорости. М*инимизируйте образование пены!*

**Приготовление среды.**

*Внимание! Строго соблюдайте правила асептики при приготовлении среды!*

В стерильную емкость объемом более 2000 мл, соблюдая правила асептики, вливают:

- солевую основу — 600 мл
- гомогенизированную яичную массу — 1000 мл

Тщательно перемешивают полученную смесь и фильтруют через чистую стерильную марлю (не менее 4-х слоев).

К профильтрованной среде добавляют 20 мл 2% раствора малахитового зеленого, тщательно перемешивают, избегая образования пены, и *в течение не более 15 минут* разливают в пробирки по 5 мл. *Не допускайте попадания пены в пробирки!*

Для приготовления среды с АБК в КК концентрациях в мерную стерильную посуду разливают по 200 мл среды (на 40 пробирок), добавляют рабочие растворы АБК (см. ниже).

**2. Приготовление рабочих растворов антибактериальных препаратов для среды Левенштейна-Йенсена**

*Необходимо проверить чистоту и активность субстанций, которые Вы используете!*

Перечень АБП для постановки ТЛЧ на среде ЛЙ приведен в таблице ниже:

| Препараты | Критические концентрации (мкг/мл) |
|---|---|
| изониазид | 0,2 |
| рифампицин | 40,0 |
| этамбутол | 2,0 |
| стрептомицин | 4,0 |
| левофлоксацин | 2,0 |
| моксифлоксацин (КК) | 1,0 |
| амикацин | 30,0 |
| канамицин | 30,0 |
| капреомицин | 40,0 |
| этионамид | 40,0 |
| протионамид | 40,0 |

Далее приводятся расчеты навесок АБП для 200 мл среды ЛЙ.

*Рекомендуется добавлять 2 мл раствора АБП в 200 мл среды для его лучшего распределения при перемешивании среды.*

**Изониазид**

Критическая концентрация изониазида для среды ЛЙ составляет 0,2 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 40 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для изониазида

равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией изониазида 0,8 мг/мл необходимо 40 мл*0,8 мг/мл = 32 мг изониазида.

**Раствор А.** Растворяют 32 мг изониазида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 800 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 19,5 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 20 мкг/мл.

Вносят 2 мл **раствора Б** во флакон с 200 мл готовой среды и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация изониазида 0,2 мкг/мл. Оставшийся объем раствора Б (18 мл) можно аликвотировать по 2,2-2,5 мл и заморозить для хранения.

**Рифампицин**

Критическая концентрация рифампицина для среды ЛЙ составляет 40 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 8 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для рифампицина равны $К_А$=1 и $К_с$=0,97. Для приготовления 10 мл **раствора А** с концентрацией рифампицина 4 мг/мл (4 мг/мл*10 мл = 40 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 40 мг/($К_А$*$К_с$) = 40 мг/(1*0,97) = 41,24 мг рифампицина.

*Внимание! Рифампицин не растворим в воде.*

**Раствор А.** Растворяют 41,24 мг рифампицина в 6,0 мл 95%-ного этанола или диметилформамида. Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35 – 40ºС.

После полного растворения препарата добавляют небольшими порциями при тщательном перемешивании 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества – 4 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ а и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация рифампицина 40 мкг/мл.

**Этамбутол**

Критическая концентрация этамбутола для среды ЛЙ составляет 2,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 0,4 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этамбутола дигидрохлорида равны $К_А$=0,737 и $К_с$=1. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки

массы навески необходимо 80 мг/($К_А$*$К_с$) = 80 мг/(0.737*1) = 108.55 мг этамбутола дигидрохлорида.

**Раствор А.** Растворяют 108,55 мг этамбутола дигидрохлорида в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 19 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,2 мг/мл активного вещества.

Вносят 2 мл **раствора Б** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этамбутола 2,0 мкг/мл.

**Стрептомицин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

Критическая концентрация стрептомицина для среды ЛЙ составляет 4,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 0,8 мг препарата. Для стрептомицина сульфата производителем указана активность 750 мг/г или 75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $К_А$ и $К_с$). Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 8 мг/мл (20 мл*8 мг/мл = 160 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 160/0,75 = 213,33 мг стрептомицина сульфата.

**Раствор А.** Растворяют 213,33 мг сульфата стрептомицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 8 мг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,4 мг/мл активного вещества.

Вносят 2 мл **раствора Б** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация стрептомицина 4,0 мкг/мл.

**Левофлоксацин**

Критическая концентрация левофлоксацина для среды ЛЙ составляет 2,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 0,4 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для левофлоксацина равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется. Для приготовления 10 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл необходимо 10 мл*4 мг/мл = 40 мг левофлоксацина.

**Для приготовления 0,1М** раствора NaOH 400 мг NaOH растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

**Раствор А.** Растворяют 40 мг левофлоксацина в 10 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,2 мг/мл активного вещества.

Вносят 2 мл **раствора Б** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация левофлоксацина 2,0 мкг/мл.

**Моксифлоксацин**

Критическая концентрация моксифлоксацина для среды ЛЙ составляет 1,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 0,2 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для моксифлоксацина гидрохлорида равны $К_А$=0,917 и $К_с$=0,98. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2 мг/мл (20 мл*2 мг/мл = 40 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 40 мг/($К_А$*$К_с$) = 40 мг/(0.917*0,98) = 44.51 мг.

**Раствор А.** Растворяют 44.51 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 20 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 2 мг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,1 мг/мл активного вещества.

Вносят 2 мл **раствора Б** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация моксифлоксацина 1,0 мкг/мл.

**Амикацин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

Критическая концентрация амикацина для среды ЛЙ составляет 30,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 6 мг препарата. Для амикацина дисульфата производителем указана активность 674–786 мкг/мг или 67,4–78,6% (в этой величине уже учтены коэффициенты $К_А$ и $К_с$); для примера выполним расчёт на 68% активности. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 3 мг/мл (40 мл*3 мг/мл = 120 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 120/0,68 = 176,47 мг.

**Раствор А.** Растворяют 176,47 мг дисульфата амикацина в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 3 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация амикацина 30,0 мкг/мл.

**Канамицин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

Критическая концентрация канамицина для среды ЛЙ составляет 30,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 6 мг препарата. Для канамицина моносульфата производителем

указана активность >750 мкг/мг или >75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 75% активности. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 3 мг/мл (40 мл*3 мг/мл = 120 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 120/0,75 = 160 мг.

**Раствор А.** Растворяют 160 мг моносульфата канамицина в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 3 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация канамицина 30,0 мкг/мл.

**Капреомицин**

Критическая концентрация капреомицина для среды ЛЙ составляет 40,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 8 мг препарата. Для капреомицина сульфата производителем указана активность 700–1050 мкг/мг или 70-105% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); для примера выполним расчёт на 70% активности. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (40 мл*4 мг/мл = 160 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 160/0,70 = 228,57 мг.

**Раствор А.** Растворяют 228,57 мг сульфата капреомицина в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация канамицина 40,0 мкг/мл.

**Этионамид**

Критическая концентрация этионамида для среды ЛЙ составляет 40,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 8 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этионамида равны $K_A$=1 и $K_c$=0.98. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80 мг/($K_A$*$K_c$) = 80 мг/(1*0.98) = 81.63 мг.

**Раствор А.** Растворяют 81.63 мг этионамида в 20 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этионамида 40,0 мкг/мл.

**Протионамид**

Критическая концентрация протионамида для среды ЛЙ составляет 40,0 мкг/мл. В 200 мл среды необходимо добавить 8 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для

протионамида равны $К_А$=1 и $К_с$=0.98. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80 мг/($К_А$*$К_с$) = 80 мг/(1*0.98) = 81.63 мг.

**Раствор А.** Растворяют 81.63 мг протионамида в 20 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

Вносят 2 мл **раствора А** во флакон с 200 мл готовой среды ЛЙ и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация протионамида 40,0 мкг/мл.

**Коагуляция среды**

Для коагуляции среды используют специальные аппараты-коагуляторы “АСПС”. Пробирки с разлитой в них средой помещают в специальные штативы с подобранным углом наклона для формирования скошенной поверхности среды длиной 8–10 см. Штативы устанавливают в коагулятор и проводят коагуляцию при 85°С в течение 45 минут

*Внимание! Постоянно контролируйте температуру в коагуляторе. Не допускайте перегрева сред!*

Обесцвечивание среды, наличие пузырьков или углублений на ее поверхности свидетельствует о нарушении температурного режима и времени коагуляции. При нарушении режима коагуляции среда подлежит уничтожению.

***Внимание! Свертывание является не стерилизующей, а лишь коагулирующей процедурой. Стерильность среды обеспечивается стерильными условиями ее приготовления и розлива!***

**3. Хранение среды Левенштейна-Йенсена с препаратами**

Не допускается подвергать приготовленную среду воздействию УФ лучей. Готовые среды необходимо хранить в темноте, в холодильнике.

Приготовленная партия среды без препаратов и с АБП должна иметь этикетки с датой изготовления и может сохраняться в холодильнике при $4^0$С с плотно закрытыми пробками для предотвращения высыхания. Срок хранения среды с препаратами и без препаратов не должен превышать 4 недели.

**4. Контроль качества среды Левенштейна-Йенсена**

**Визуальная оценка.** Свежеприготовленная яичная среда после ее коагуляции или хранившиеся в холодильнике среда перед применением должна быть подвергнута визуальной оценке. Правильно приготовленная среда должна быть плотной и прочно прилипшей к стенкам пробирки. Содержание конденсата в пробирке со средой не должно превышать 0,2

мл. Обесцвечивание среды или появление на ее поверхности углублений или пузырей внутри среды и на ее поверхности могут свидетельствовать об избыточной температуре коагуляции. Партия среды с выявленными недостатками не может использоваться для посева и должна быть уничтожена (автоклавированием). Пробирки с признаками контаминации посторонними микроорганизмами должны также уничтожаться (автоклавированием).

**Тест на стерильность**

При объеме приготовленной партии среды 2600 мл (520 пробирок) 6 пробирок из свежеприготовленной партии среды (без препаратов) помещают в термостат при $37^0$С на 3 суток. Если хотя бы в 1 пробирке обнаружен рост микроорганизмов, аналогичным образом должны быть проверены 10 дополнительных пробирок. Если хотя бы в одной из этих 10 пробирок обнаруживается рост, должны быть проверены все пробирки данной партии. Все пробирки с ростом загрязняющих микроорганизмов следует удалить. Остальные неконтаминированные пробирки могут быть использованы.

**Тест на проверку ростовых качеств сред**

Тестирование ростовых качеств каждой партии среды проводится с помощью контрольного штамма - лабораторного(музейного) штамма *M. tuberculosis $H_{37}Rv$*.

Готовят суспензию культуры контрольного штамма:

- делают смыв культуры с обильным/сплошным ростом с поверхности плотной среды, возраст культуры должен быть не более 14 дней с момента появления роста,
- гомогенизируют суспензию с помощью встряхивания со стеклянными бусами на встряхивателе типа Vortex 1 минуту.

Выполняют несколько разведений суспензии следующим образом:

- готовят бактериальную суспензию по стандарту мутности МакФарланд 1 – суспензия №1,
- готовят 5 серийных 10-кратных разведений из суспензии №1;
- засевают по 0,2 мл суспензии в разведении $10^{-4}$ и $10^{-5}$ на поверхность двух пробирок испытываемой партии среды и двух пробирок со стандартной средой. *Не используйте для сравнения пробирки из предыдущей партии среды!*

Дальнейшую инкубацию проводите при $37^0$С. Регистрируйте еженедельно рост и относительный размер колоний в пробирках, сравнивая рост на двух партиях среды (отмечайте срок появления роста, количество и размер колоний). Засевы суспензий в разведении $10^{-4}$ и $10^{-5}$ должны дать рост 10–100 и 1–10 колоний соответственно в сроки, не более продолжительные, чем на стандартной среде. При таком росте на контролируемых средах они считаются удовлетворительными.

*Контроль ростовых свойств среды можно проводить с одновременно с посевом клинических изолятов.* В случае неудовлетворительного качества среды ТЛЧ должны быть поставлены повторно (см. раздел 3.3).

**Контроль качества сред для ТЛЧ.** Проводится ТЛЧ контрольных штаммов (как минимум, стандартного штамма *M. tuberculosis $H_{37}Rv$)* ко всем АБП одновременно с клиническими образцами.

Для более полной оценки качества сред рекомендуется, наряду со стандартным чувствительным штаммом, провести тест на чувствительность со штаммами, устойчивыми к АБП, чувствительность к которым должна быть установлена.

***Регистрация результатов контроля качества каждой партии сред должна производиться в журнале*** регистрации приготовления сред и проверки их качества. Пример форм журналов – в Приложениях 9, 10

## 5. Проведение посева

ТЛЧ методом пропорций на среде ЛЙ проводится в пробирках. Готовят наборы пробирок для ТЛЧ каждого изолята (2 контрольные пробирки без препарата и по одной пробирке для каждого препарата). *Все пробирки, включенные в набор, должны быть приготовлены из одной партии среды!*

Все пробирки набора должны быть промаркированы с указанием краткого обозначения препарата, его концентрации. Помечают контрольные пробирки, указав разведения суспензии, которые планируется в них внести: $10^{-2}$ и $10^{-4}$. Дополнительно наносят на все пробирки набора номер изолята.

Готовят стерильные одноразовые пипетки Пастера, как минимум, по одной для каждого изолята.

В одну пробирку со средой без препарата, помеченную разведением $10^{-4}$, вносят 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-4}$ (приготовление суспензии – см. приложение 5). Затем засевают 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-2}$ на среды, содержащие АБП в КК и в пробирку со средой без препарата (контроль, $10^{-2}$). Равномерно распределяют суспензию по поверхности среды. Закрывают пробирки, неплотно закрутив крышки.

После этого приступают к засеву набора для ТЛЧ суспензией другого изолята (используют новую стерильную пипетку Пастера).

Размещают засеянные пробирки наклонно так, чтобы суспензия не выходила за границу верхней части скошенной питательной среды и помещают в термостат на 2-4 часа на $37^0$ С, крышки оставляют неплотно закрученными для обеспечения испарения избытка влаги. После того, как жидкость инокулята впитается в среду, оставляют пробирки в термостате в вертикальном положении.

**6. Инкубация**

Засеянные пробирки со средой ЛЙ инкубируют при 37°С ± 1°С. Через 24–48 часов крышки закручивают, пробирки просматривают, удаляют контаминированные посторонними микроорганизмами пробирки. Если произошла контаминация, необходимо повторить ТЛЧ. *Внимание! При удалении контаминированных пробирок необходимо повторить тест к препаратам, содержавшимся в этом наборе, полностью, включая две контрольные пробирки. Необходимо избегать утечки конденсата из пробирок – он может быть контаминирован МБТ! Необходимо контролировать температуру в термостате в месте расположения пробирок!*
Пробирки инкубируют до 40 дней с момента посева.

**7. Учет и интерпретация результатов**

Общие требования к учету результатов изложены в разделе 4.4.

Учет результатов производится на 21, 28 и 40 день со дня засева.

Если на 21 или 28 день отношение числа колоний на среде, содержащей АБП, к числу колоний на контрольной среде (с учетом разведения суспензии) составляет 1% или более, то культура устойчива. Если не наблюдается колоний на среде, содержащей АБП, а на контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$, имеется сливной рост, изолят считается чувствительным.

Если на 28-й день в контрольных пробирках (среда без АБП, засеянная суспензией в разведениях $10^{-2}$) наблюдается 20 колоний или менее, засев был недостаточен. Если при этом на среде, содержащей противотуберкулезный препарат, есть колонии, изолят может быть зарегистрирован как устойчивый. Если на среде, содержащей противотуберкулезный агент, нет роста, тест необходимо повторить с использованием свежего инокулята.

Все остальные результаты (в том числе, заключение о чувствительности изолята к препарату) следует сообщать после 40 дней инкубации.

## 8. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Левенштейна-Йенсена (на развернутый лист)

Дата постановки ТЛЧ:_____ [1]№ постановки:_____ [2]Количество изолятов для ТЛЧ:____ Ответственный за постановку ТЛЧ:_____

[3]Дата приготовления сред с ПТП:_____ [4]№ партии:_____ [5]Дата проведения КК сред:_____

| № | Лабораторный № | ФИО пациента | Дата появления роста на среде, с которой получен изолят | День культивирования | *K1* (разведение $10^{-2}$) | *K2* (разведение $10^{-4}$) | STM 4 мкг\мл | | | INH 0,2 мкг/мл | | | RIF 40 мкг/мл | | | EMB 2 мкг/мл | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) |
| 1 | 2 | 3 | [6]4 | 5 | [7]6 | 7 | 8 | [8]9 | 10 | 11 | | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 1 | | | | 21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 28 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 40 | | | | | | | | | | | | | | |

2-я страница

| LFX 2 мкг/мл | | | MFX 1 мкг/мл | | | AMK 30 мкг/мл | | | KAN 30 мкг/мл | | | CAP 40 мкг/мл | | | ETO 40 мкг/мл | | | PTO 40 мкг/мл | | | Результаты валидны? (Да/Нет) | Дата перестановки ТЛЧ | Дата выдачи результата |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | | | |
| 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | [9]40 | [10]41 | 42 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Пояснения:
[1] № постановки по счету.
[2] Количество культур от пациентов, которым будет поставлена ТЛЧ в этой постановке.
[3] Дата приготовления ЛЙ с ПТП.
[4] № партии питательной среды с ПТП, которая используется в постановке.
[5] Дата проведения контроля качества приготовленных сред с помощью контрольных штаммов.
[6] Необходимо указать дату, когда появился рост на среде, с которой был получен изолят. Если был пересев изолята, то указывается дата получения роста при пересеве.
[7] В столбцах 6,7,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28 заполняется фактическое количество КОЕ.
[8] В столбцах 9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29 следует указывать соотношение КОЕ выросших на питательной среде с ПТП к количеству КОЕ выросших на контрольной среде ($10^{-2}$ или $10^{-4}$ *100) , число выражается в %. Приемлемый способ записи >1% или <1%. Что будет в дальнейшем интерпретироваться, соответственно, как устойчивый или чувствительный изолят.
**[9]** Так же можно указать причины невалидности результатов. Например, гиперзасев, контаминация.
[10] Указывается в том, случае, когда результат не валидный и необходима перестановка ТЛЧ.

**Приложение 7**

## Постановка теста на лекарственную чувствительность на агаровых средах Миддлбрука 7H10 и 7H11

### 1. Приготовление агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11

Общие правила приготовления сред изложены в Приложении 3.

*ВНИМАНИЕ! Пробирки/чашки Петри со средами без АБП (контрольные) и с АБП для каждой серии ТЛЧ (для каждого изолята) должны быть приготовлены из одной партии среды!*

Агаровые среды Миддлбрука продаются в виде сухих готовых смесей ингредиентов. При их приготовлении необходимо следовать инструкции производителя.

Заранее маркируют пробирки/чашки Петри/секции чашек Петри, обозначив АБП и их концентрации, которые должны быть в среде, которую планируется внести в эту пробирку/ чашку Петри/ секцию чашки Петри.

Рассчитывают навеску сухой среды, необходимую для приготовления требуемого объема среды (исходя из рекомендаций производителя). Например, для получения 200 мл готовой среды взвешивают 3,6 г сухой смеси (необходимо пересчитать в соответствии с инструкцией производителя) и суспендируют ее в 180 мл свежеприготовленной дистиллированной воды (в колбе объемом 500 мл).

Добавляют 1,0 мл глицерина (х.ч.) и тщательно перемешивают содержимое колбы.

Колбу закрывают ватной пробкой и автоклавируют при 1 атм. ($121^0$C) 10-15 минут (в соответствии с инструкцией производителя).

Пока колба со средой автоклавируется, достаньте растворы АБП и добавку OADC из холодильника и поместите их при комнатной температуре.

Извлекают агаровую среду из автоклава и охлаждают ее до 50-$52^0$C (помещают в водяную баню, установленную на эту температуру). Проверяют качество готовой среды – она должна быть прозрачной. Причины образования осадка в колбе:

- температура и время автоклавирования оказались недостаточны для расплавления агара,
- плохое качество сухой смеси,
- загрязненная посторонними веществами колба.

*Внимание! Разливайте готовую среду как можно быстрее! Если проавтоклавированная среда выдерживается в водяной бане 50-$52^0$C слишком долго, в среде может образоваться осадок.*

С соблюдением мер асептики добавляют в колбу со средой 20 мл OADC и тщательно перемешивают содержимое колбы.

Питательная добавка OADC продается в виде стерильного раствора, содержащего олеиновую кислоту, бычий альбумин, декстрозу и каталазу.

Во флаконы, подготовленные для приготовления среды с АБП, вносят необходимые объемы растворов АБП, затем в них добавляют соответствующую питательную среду (необходимо предварительно пометить флаконы, указав название среды, препарата и его концентрацию).

*Разливают готовую среду сразу, не допуская ее застывания и повторного расплавления.* Разливают готовую среду без препаратов и с АБП в пробирки – по 5 мл, в односекционные чашки Петри диаметром 90мм – по 20 мл среды, диаметром 3 мм – по 5 мл, и в секции 90 мм многосекционной чашки Петри – по 5 мл среды. Неплотно закрывают пробирки и размещают их в штативы под углом. Размещают чашки Петри на ровной поверхности в стерильном боксе, с закрытыми крышками. *Не допускается подвергать приготовленную среду воздействию УФ*. После застывания агара чашки Петри могут быть перевёрнуты крышками вниз; пробирки ставят в контейнеры для хранения вертикально.

**2. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для среды Миддлбрука 7H10**

*Проверьте чистоту и активность субстанций, которые вы используете!*

Перечень АБП для постановки ТЛЧ на среде Миддлбрука 7H10 приведен в таблице ниже:

| Препараты | Критические концентрации (мкг/мл) |
|---|---|
| изониазид | 0,2 |
| рифампицин | 0,5 |
| этамбутол | 5,0 |
| стрептомицин | 2,0 |
| левофлоксацин | 1,0 |
| моксифлоксацин (КК) | 0,5 |
| моксифлоксацин (КП) | 2,0 |
| линезолид | 1,0 |
| амикацин | 2,0 |
| канамицин | 4,0 |
| капреомицин | 4,0 |
| этионамид | 5,0 |

Далее приводятся примеры расчётов навесок АБП для приготовления 50 мл среды Миддлбрука 7H10.

**Изониазид**

КК изониазида для среды Миддлбрука 7H10 (далее 7H10) составляет 0,2 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 10 мкг препарата. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией изониазида 400 мкг/мл необходимо 400 мкг/мл*40 мл = 16 мг изониазида.

Корректировочные коэффициенты для изониазида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 16 мг изониазида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 400 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 20 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7Н10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация изониазида 0,2 мкг/мл.

**Рифампицин**

КК рифампицина для среды 7Н10 составляет 0,5 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 25 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для рифампицина равны $К_А$=1 и $К_с$=0,97. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией рифампицина 1 мг/мл (1 мг/мл*20 мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(1*0,97) = 20,62 мг рифампицина.

*Внимание! Рифампицин не растворим в дистиллированной в воде.*

**Раствор А.** Растворяют 20,62 мг рифампицина в 20 мл 95%-ного этанола или диметилформамида. Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35 – 40°С. Полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют небольшими порциями при тщательном перемешивании 9.5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества – 50 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7Н10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация рифампицина 0,5 мкг/мл.

**Этамбутол**

КК этамбутола для среды 7Н10 составляет 5,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,25 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этамбутола дигидрохлорида равны $К_А$=0,737 и $К_с$=1. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 5 мг/мл (20 мл*5 мг/мл = 100 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 100 мг/($К_А$*$К_с$) = 100 мг/(0.737*1) = 135.69 мг.

**Раствор А.** Растворяют 135,69 мг этамбутола дигидрохлорида в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 5 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,5 мг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этамбутола 5,0 мкг/мл.

**Стрептомицин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

КК стрептомицина для среды 7H10 составляет 2,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,1 мг препарата. Для стрептомицина сульфата производителем указана активность 750 мг/г или 75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$). Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80/0,75 = 106,67 мг.

**Раствор А.** Растворяют 106,67 мг сульфата стрептомицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,2 мг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация стрептомицина 2,0 мкг/мл.

**Левофлоксацин**

КК левофлоксацина для среды 7H10 составляет 1,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 50 мкг препарата. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией левофлоксацина 1 мг/мл необходимо 1 мг/мл*20 мл = 20 мг левофлоксацина.

Корректировочные коэффициенты для левофлоксацина равны $K_A$=1 и $K_c$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

Готовят 0,1М раствор NaOH. Для этого растворяют 0,4 г NaOH в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг левофлоксацина в 20 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 1 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 100 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация левофлоксацина 1,0 мкг/мл.

**Моксифлоксацин (0.5 мкг/мл)**

КК моксифлоксацина для среды 7H10 составляет 0,5 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 25 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для моксифлоксацина гидрохлорида равны $К_А$=0,917 и $К_с$=0,98. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 0,5 мг/мл (40 мл*0,5 мг/мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(0.917*0,98) = 22.26 мг.

**Раствор А.** Растворяют 22.26 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 40 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 500 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 50 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация моксифлоксацина 0,5 мкг/мл.

**Моксифлоксацин (2.0 мкг/мл)**

КП моксифлоксацина для среды 7H10 составляет 2.0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 100 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для моксифлоксацина гидрохлорида равны $К_А$=0,917 и $К_с$=0,98. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 0,5 мг/мл (40 мл*0,5 мг/мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(0.917*0,98) = 22.26 мг.

**Раствор А.** Растворяют 22.26 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 40 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 500 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 2 мл **раствора А** добавляют 3 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 200 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация моксифлоксацина 2 мкг/мл.

**Линезолид**

КК линезолида для среды 7H10 составляет 1,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 50 мкг препарата. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией линезолида 1000 мкг/мл необходимо 1000 мкг/мл*20 мл = 20 мг линезолида. Корректировочные коэффициенты для линезолида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг линезолида в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 100 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация линезолида 1,0 мкг/мл.

**Амикацин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

КК амикацина для среды 7H10 составляет 2,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,1 мг препарата. Для амикацина дисульфата производителем указана активность 674–786 мкг/мг или 67,4 - 78,6% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 68% активности. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2 мг/мл (20 мл*2 мг/мл = 40 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 40/0,68 = 58,82 мг.

**Раствор А.** Растворяют 58,82 мг дисульфата амикацина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 2 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 200 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация амикацина 2,0 мкг/мл.

**Канамицин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

КК канамицина для среды 7H10 составляет 4,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,2 мг препарата. Для канамицина моносульфата производителем указана активность >750 мкг/мг или >75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 75% активности. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80/0,75 = 106,67 мг.

**Раствор А.** Растворяют 106,67 мг моносульфата канамицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 400 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация канамицина 4,0 мкг/мл.

**Капреомицин**

КК капреомицина для среды 7H10 составляет 4,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,2 мг препарата. Для капреомицина сульфата производителем указана активность 700-1050 мкг/мг или 70-105% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 70% активности. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80/0,70 = 114,29 мг.

**Раствор А.** Растворяют 114,29 мг сульфата капреомицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 400 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация капреомицина 4,0 мкг/мл.

**Этионамид**

КК этионамида для среды 7H10 составляет 5,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,25 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этионамида равны $K_A$=1 и $K_c$=0.98. Для приготовления 8 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2,5 мг/мл (8 мл*2,5 мг/мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($K_A$*$K_c$) = 20 мг/(1*0.98) = 20,41 мг.

**Раствор А.** Растворяют 20,41 мг этионамида в 8 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 2,5 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 0,5 мг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H10 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этионамида 5,0 мкг/мл.

### 3. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для среды Миддлбрука 7H11

*Проверьте чистоту и активность субстанций, которые вы используете!*

Перечень АБП для постановки ТЛЧ на среде Миддлбрука 7Н11 приведен в таблице ниже:

| Препараты | Критические концентрации (мкг/мл) |
|---|---|
| изониазид | 0,2 |
| рифампицин | 1,0 |
| этамбутол | 7,5 |
| стрептомицин | 2,0 |
| моксифлоксацин (КК) | 0,5 |
| бедаквилин | 0,25 |
| линезолид | 1,0 |
| деламанид | 0,016 |
| этионамид | 10,0 |

Далее приводятся примеры расчётов навесок АБП для приготовления 50 мл среды Миддлбрука 7Н11 (далее 7Н11).

**Изониазид**

КК изониазида для среды 7Н11 составляет 0,2 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 10 мкг препарата. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией изониазида 400 мкг/мл необходимо 400 мкг/мл*40 мл = 16 мг изониазида. Корректировочные коэффициенты для изониазида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 16 мг изониазида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 400 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 20 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7Н11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация изониазида 0,2 мкг/мл.

**Рифампицин**

КК рифампицина для среды 7Н11 составляет 1,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 50 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для рифампицина равны $К_А$=1 и $К_с$=0,97. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией рифампицина 1 мг/мл (1 мг/мл*20 мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(1*0,97) = 20,62 мг рифампицина.

*Внимание! Рифампицин не растворим в дистиллированной в воде.*

**Раствор А.** Растворяют 20,62 мг рифампицина в 20 мл 95%-ного этанола или диметилформамида. Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35 – 40°С. Полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют небольшими порциями при тщательном перемешивании 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества – 100 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация рифампицина 1,0 мкг/мл.

**Этамбутол**

КК этамбутола для среды 7H11 составляет 7,5 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,375 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этамбутола дигидрохлорида равны $K_A$=0,737 и $K_c$=1. Для приготовления 10 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 7,5 мг/мл (10 мл*7,5 мг/мл = 75 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 75 мг/($K_A$*$K_c$) = 75 мг/(0.737*1) = 101,76 мг.

**Раствор А.** Растворяют 101,76 мг этамбутола дигидрохлорида в 10 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 7,5 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,75 мг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этамбутола 7,5 мкг/мл.

**Стрептомицин**

***Внимание!*** *Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете*!

КК стрептомицина для среды 7H11 составляет 2,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,1 мг препарата. Для стрептомицина сульфата производителем указана активность 750 мг/г или 75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$). Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 4 мг/мл (20 мл*4 мг/мл = 80 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 80/0,75 = 106,67 мг.

**Раствор А.** Растворяют 106,67 мг сульфата стрептомицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 0,2 мг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация стрептомицина 2,0 мкг/мл.

**Моксифлоксацин**

КК моксифлоксацина для среды 7H11 составляет 0,5 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 25 мкг препарата. Корректировочные коэффициенты для моксифлоксацина гидрохлорида равны $К_А$=0,917 и $К_с$=0,98. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 0,5 мг/мл (40 мл*0,5 мг/мл = 20 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(0.917*0,98) = 22.26 мг.

**Раствор А.** Растворяют 22.26 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 40 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 500 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 50 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация моксифлоксацина 0,5 мкг/мл.

**Бедаквилин**

***Для всех манипуляций необходимо использовать посуду только из стекла или полистирола!*** КК бедаквилина для среды 7H11 составляет 0,25 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 12,5 мкг препарата. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией бедаквилина 500 мкг/мл необходимо 500 мкг/мл*40 мл = 20 мг бедаквилина. Корректировочные коэффициенты для бедаквилина равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

В случае наличия бедаквилина фумарата необходима корректировка навески в соответствии с $К_А$ =0,827 ($К_с$ = 1). Масса навески составит 20 мг/($К_А$*$К_с$) = 20 мг/(0,827*1) = 24,18 мг.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг бедаквилина (или 24,18 мг бедаквилина фумарата) в 40 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 500 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 19 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 25 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация бедаквилина 0,25 мкг/мл.

**Линезолид**

КК линезолида для среды 7H11 составляет 1,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 50 мкг препарата. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией линезолида 1000 мкг/мл необходимо 1000 мкг/мл*20 мл = 20 мг линезолида. Корректировочные

коэффициенты для линезолида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг линезолида в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 100 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация линезолида 1,0 мкг/мл.

**Деламанид**

КК деламанида для среды 7H11 составляет 0,016 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,8 мкг препарата. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией деламанида 1000 мкг/мл необходимо 1000 мкг/мл*20 мл = 20 мг деламанида. Корректировочные коэффициенты для деламанида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг деламанида в 20 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 100 мкг/мл.

**Раствор В.** К 0,5 мл **раствора Б** добавляют 30,75 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 1,6 мкг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора В** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация деламанида 0,016 мкг/мл.

**Этионамид**

КК этионамида для среды 7H11 составляет 10,0 мкг/мл. В 50 мл среды необходимо добавить 0,5 мг препарата. Корректировочные коэффициенты для этионамида равны $К_А$=1 и $К_с$=0.98. Для приготовления 8 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 5,0 мг/мл (8 мл*5,0 мг/мл = 40 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 40 мг/($К_А$*$К_с$) = 40 мг/(1*0.98) = 40.82 мг.

**Раствор А.** Растворяют 40,82 мг этионамида в 8 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 5,0 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 1,0 мг/мл.

Вносят 0,5 мл **раствора Б** во флакон с 50 мл готовой среды 7H11 и тщательно перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получена концентрация этионамида 10,0 мкг/мл.

*Растворы Б рекомендуется разлить в криопробирки в объемах, достаточных для отбора аликвот для добавления в среду, и хранить в соответствии с требованиями к хранению растворов препаратов, изложенным в приложении 4.*

**4. Хранение агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11**

*Внимание! Храните только среды, разлитые в пробирки/чашки Петри! При хранении сред во флаконах больших объемов и повторном нагревании среды для расплавления агара происходит образование формальдегида, ингибирующего рост микобактерий!*

Храните готовые среды в темноте, в холодильнике.

Пробирки/чашки Петри со средой без препаратов могут храниться в холодильнике при $4^0$C с плотно закрытыми пробками (для пробирок) и крышками вниз (для чашек Петри) в герметично закрытых контейнерах, пакетах (для предотвращения высыхания). Каждая партия среды без препаратов и с АБП должна иметь этикетки с датой их изготовления. *Срок хранения среды без препаратов не должен превышать 4 недели!*

**5. Контроль качества агаровых сред Миддлбрука 7H10 и 7H11**

**Визуальная оценка.** Свежеприготовленная и разлитая среда Миддлбрука 7H10 и 7H11, хранившаяся в холодильнике, перед применением должна быть подвергнута визуальной оценке. Пробирки/чашки Петри с признаками подсыхания среды, изменения цвета, пузырьками, следами роста посторонних микроорганизмов должны быть уничтожены.

**Тест на стерильность.** 1–5% от всех пробирок/чашек Петри каждой партии среды должны быть помещены в термостат ($37^0$C). Просмотрите пробирки/чашки Петри через 48 часов и через 21 день. Все пробирки с ростом загрязняющих микроорганизмов следует удалить. Остальные не контаминированные пробирки могут быть использованы.

**Тест на проверку ростовых качеств сред.** Тестирование ростовых качеств каждой партии среды для ТЛЧ проводится с помощью контрольного штамма - лабораторного(музейного) штамма *M. tuberculosis $H_{37}Rv$*.

Готовят суспензию культуры контрольного штамма:

– делают смыв культуры с обильным/сплошным ростом с поверхности плотной среды (возраст культуры не должен превышать 14 дней с момента появления роста),

−гомогенизируют суспензию с помощью встряхивания со стеклянными бусами на встряхивателе типа Vortex1 минуту.

Выполняют несколько разведений приготовленной суспензии следующим образом:

- разводят бактериальную суспензию по стандарту мутности МакФарланд 1 – суспензия №1,
- готовят 5 серийных 10-кратных разведений каждой культуры из суспензии №1;
- засевают по 0,2 мл суспензий в разведении $10^{-4}$ и $10^{-5}$ на поверхность двух пробирок/чашек Петри испытываемой партии среды.

Дальнейшую инкубацию проводят при $37^0$С. Регистрируют еженедельно рост и относительный размер колоний в пробирках/чашках Петри (отмечают срок появления роста, количество и размер колоний). Засевы суспензий в разведении $10^{-4}$ и $10^{-5}$ должны дать рост 10-100 и 1-10 колоний соответственно. При таком росте на контролируемых средах качество сред считают удовлетворительным.

*Контроль ростовых свойств среды можно проводить одновременно с посевом клинических изолятов.* В случае неудовлетворительного качества среды ТЛЧ необходимо повторить.

**Контроль качества сред для ТЛЧ.** Проводят ТЛЧ контрольных штаммов (как минимум, стандартного штамма *M. tuberculosis $H_{37}Rv$)* ко всем исследуемым АБП одновременно с клиническими образцами.

Для более полной оценки качества сред рекомендуется, наряду со стандартным чувствительным штаммом, провести тест на чувствительность со штаммами, устойчивыми к АБП, чувствительность к которым ранее была установлена.

***Регистрация результатов контроля качества каждой партии сред должна производиться в журнале*** регистрации приготовления сред и проверки их качества. Примеры форм журналов – в Приложениях 9 и 10.

## 6. Проведение посева

ТЛЧ методом пропорций на агаровых средах может быть выполнен в пробирках, а также в чашках Петри, в том числе секционных. Готовят наборы пробирок/чашек Петри для ТЛЧ каждого изолята (2 контрольные пробирки/чашки Петри/секции чашки Петри без препарата и по одной пробирке/чашке Петри/секции чашки Петри для каждого препарата). Все пробирки/чашки Петри/секции чашки Петри должны быть промаркированы с указанием краткого обозначения препарата, его концентрации. Дополнительно наносят на пробирки/чашки Петри/секции чашки Петри набора номер изолята. Помечают контрольные

пробирки/чашки Петри/секции чашки Петри, указав разведения суспензии, которые планируется в них внести: $10^{-2}$ и $10^{-4}$.

Готовят стерильные одноразовые пастеровские пипетки, как минимум, по одной для каждого изолята или дозатор со сменными стерильными наконечниками с фильтрами.

В одну пробирку/чашку Петри/секцию чашки Петри со средой без препарата, помеченную разведением $10^{-4}$, вносят 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-4}$. Затем засевают 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-2}$ на среды, содержащие АБП в КК, и в одну пробирку/чашку Петри/секцию чашки Петри со средой без препарата (контроль $10^{-2}$). Равномерно распределяют суспензию по поверхности среды. Закрывают пробирки, неплотно закрутив крышки. Чашки Петри закрывают крышками.

После этого можно приступают к засеву другого набора для ТЛЧ суспензией другого изолята (используют стерильные пипетки/наконечники).

Размещают засеянные пробирки наклонно (так, чтобы поверхность скошенной среды располагалась горизонтально) и помещают в термостат на 2 -4 часа на $37^0$ С, крышки оставляют неплотно закрученными для обеспечения испарения избытка влаги. После того, как жидкость инокулята впитается в среду, оставляют пробирки в термостате в вертикальном положении.

Чашки Петри могут быть оставлены на рабочей поверхности в БМБ на 1–2 часа для впитывания суспензии. После засева и выдерживания в течение 1–2 часов (пока не впитается инокулят) крышками вверх чашки Петри герметизируют, закрепляя крышки лентой типа Парафильм, запечатывают в пакет и помещают в термостат на $37^0$ С также крышками вверх.

**7. Инкубация**

Засеянные пробирки/чашки Петри инкубируют при температуре 37°С ±1°С, не допуская попадания на них света. При наличии углекислотного термостата рекомендуется проводить инкубацию в нем, в проницаемых для $CO_2$ пакетах, в атмосфере с 5–10% $CO_2$ с поддержанием необходимой влажности.

Через 3–7 дней инкубации осмотрите пробирки/чашки для выявления посевов, контаминированных посторонними микроорганизмами. Удалите контаминированные пробирки/чашки и повторите ТЛЧ.

*Контролируйте температуру в термостате в месте расположения пробирок/чашек!*

Далее пробирки/чашки инкубируют до 28 дней с момента посева.

*Внимание! При удалении контаминированных пробирок/чашек Петри необходимо повторить тест к препаратам, содержавшимся в этих пробирках/чашках Петри полностью, включая две контрольные пробирки/чашки.*

**8. Учет и интерпретация результатов**

Общие требования к учету результатов изложены в разделе 3.4.

Учет результатов производится на 21 и 28 день со дня засева. На 21 день сообщается предварительный результат, на 28 – окончательный результат ТЛЧ.

Если на 21 или 28 день отношение числа колоний на среде, содержащей АБП, к числу колоний на контрольной среде с учетом разведений составляет 1% или более, то культура устойчива. Если нет колоний на среде, содержащей АБП, а на контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$, имеется сливной газон, изолят считается чувствительным.

Если на 21-й день в контроле (среда без АБП, засеянная суспензией в разведении $10^{-2}$) наблюдается 50 колоний или менее, засев был недостаточен. Тест должен быть учтен на 28 день. Если при этом на среде, содержащей противотуберкулезный препарат, есть колонии, изолят может быть зарегистрирован как устойчивый.

Все остальные результаты (в том числе заключение о чувствительности изолята к препарату) следует сообщать после 28 дней инкубации.

## 9. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Миддлбрука 7H10 (на развернутый лист)

Дата постановки ТЛЧ:_____ [1]№ постановки:_____ [2]Количество изолятов для ТЛЧ:____ Ответственный за постановку ТЛЧ:_____

[3]Дата приготовления сред с ПТП:_____ [4]№ партии:_____ [5]Дата проведения КК сред:_____

| № | Лабораторный № | ФИО | Дата появления роста на среде, с которой получен изолят | День культивирования | *K1* (разведение $10^{-2}$) | *K2* (разведение $10^{-4}$) | STM 2,0 мкг/мл | | | INH 0,2 мкг/мл | | | RIF 0,5 мкг/мл | | | EMB 5 мкг/мл | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) |
| 1 | 2 | 3 | [6]4 | 5 | [7]6 | 7 | 8 | [8]9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 1 | | | | 21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 28 | | | | | | | | | | | | | | |

2-я страница

| LFX 1,0 мкг/мл | | | MFX 0,5 мкг/мл | | | MFX 2,0 мкг/мл | | | AMK 2,0 мкг/мл | | | KAN 4,0 мкг/мл | | | CAP 4 мкг/мл | | | ETO 5 мкг/мл | | | LNZ 1 мкг/мл | | | Результаты валидны? (Да/Нет) | Дата перестановки ТЛЧ | Дата выдачи результата |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | | | |
| 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | [9]44 | [10]45 | 46 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**10. Пример формы журнала регистрации результатов тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам на среде Миддлбрука 7H11** (на развернутый лист)

Дата постановки ТЛЧ:_____ [1]№ постановки:_____ [2]Количество изолятов для ТЛЧ:____ Ответственный за постановку ТЛЧ:_____

[3]Дата приготовления сред с ПТП:_____ [4]№ партии:_____ [5]Дата проведения КК сред:_____

| № | Лабораторный № | ФИО | Дата появления роста на среде, с которой получен изолят | День культивирования | *K1* (разведение $10^{-2}$) | *K2* (разведение $10^{-4}$) | STM 2 мкг/мл | | | INH 0,2 мкг/мл | | | RIF 1 мкг/мл | | | EMB 7,5 мкг/мл | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) |
| 1 | 2 | 3 | [6]4 | 5 | [7]6 | 7 | 8 | [8]9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| 1 | | | | 21 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 28 | | | | | | | | | | | | | | |

2-я страница

| BDQ 0,25 мкг/мл | | | MFX 0,5 мкг/мл | | | LNZ 1,0 мкг/мл | | | DLM 0,016 мкг/мл | | | ETO 10 мкг/мл | | | Результаты валидны? (Да/Нет) | Дата перестановки ТЛЧ | Дата выдачи результата |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | КОЕ | КОЕ/*K1*, % | Рез-тат (ч/уст.) | | | |
| 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | [9]35 | [10]36 | 37 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Пояснения:
[1] № постановки по счету.
[2] Количество культур от пациентов, которым будет поставлена ТЛЧ в этой постановке.
[3] Дата приготовления 7H10/7H11 с ПТП.
[4] № партии питательной среды с ПТП, которая используется в постановке.
[5] Дата проведения контроля качества приготовленных сред с помощью контрольных штаммов.
[6] Необходимо указать дату, когда появился рост на среде, с которой был получен изолят. Если был пересев изолята, то указывается дата получения роста при пересеве.
[7] В столбцах 6,7,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28 заполняется фактическое количество КОЕ.
[8] В столбцах 9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29 следует указывать соотношение КОЕ выросших на питательной среде с ПТП к количеству КОЕ выросших на контрольной среде ($10^{-2}$ или $10^{-4}$ *100) , число выражается в %. Приемлемый способ записи >1% или <1%. Что будет в дальнейшем интерпретироваться, соответственно, как устойчивый или чувствительный изолят.
**[9]** Так же можно указать причины невалидности результатов. Например, гиперзасев, контаминация.
[10] Указывается в том, случае, когда результат не валидный и необходима перестановка ТЛЧ.

**Пример СОП «Приготовление растворов антибактериальных препаратов для ТЛЧ на средах Миддлбрука 7Н10, 7Н11»**

| | | |
|---|---|---|
| УНИИФ – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава РФ Отделение микробиологии и ПЦР диагностики | Стандартная Операционная Процедура **Приготовление растворов антибактериальных препаратов для ТЛЧ на средах Миддлбрука 7Н10, 7Н11** | Код 20.07.2022 Страница 83 из 9 |

**Содержание:**


1. **Цели и сфера применения**
2. **Сокращения и определения**
3. **Требования к персоналу**
4. **Принцип**
5. **Безопасность и защита окружающей среды**
6. **Оборудование и материалы**
7. **Реагенты и химические вещества**
8. **Процедура**
9. **Контроль качества**
10. **Уборка рабочего места и утилизация отходов**
11. **Нормативные документы**


| | Составил | Проверил | Утвердил | Новая версия |
|---|---|---|---|---|
| Имя | | | | Код: |
| Дата | | | | |
| Подпись | | | | |

Количество копий: Причина изменения:

**История редакций**

| Дата | Версия | Разделы | Поправки |
|---|---|---|---|
| 14.07.2022 | 01 | Все | Новый СОП |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

***1. Цели и сфера применения.***

Подготовить субстанции лекарственных препаратов для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза.

***2. Сокращения и определения***

МБТ - микобактерии туберкулеза
INH– изониазид
RIF – рифампицин
EMB – этамбутол
LZD – линезолид;
DLM – деламанид;
LFX – левофлоксацин;
MFX – моксифлоксацин;
AMK – амкацин;
KAN – канамицин
CAP – капреомицин
NaOH – гидроксид натрия
ПТП – противотуберкулезные препараты
ЛЧ – лекарственная чувствительность

Для различных ПТП установлена определенная критическая концентрация. Она отличается от минимальной ингибирующей концентрации и имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на микобактерий туберкулеза (МБТ) в условиях макроорганизма и выбрана с учетом фармакокинетических и фармакодинамических свойств ПТП.

Для разных по составу питательных сред критическая концентрация одного и того же препарата различна. Значения критических концентраций ПТП существенно отличаются при использовании разных методов определения ЛЧ МБТ.

*3.* ***Требования к персоналу***

3.1. Медицинские требования

В соответствии с Федеральными законами и санитарными правилами к работе с патогенными микроорганизмами III и IV групп патогенности допускаются специалисты, не имеющие медицинских противопоказаний к работе в медицинской микробиологической лаборатории, в том числе к вакцинации. Контроль за состоянием здоровья сотрудников включает:

ежедневное термометрирование;

рентгенография легких 2 раза в год;

диспансеризация 1 раз в год.

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

К работе допускаются:

специалисты с высшим образованием, прошедших обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи бактериологи или врачи медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология»;

специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;

все специалисты, допущенные к проведению исследований, должны пройти инструктаж по работе с ПБА III и IV группы патогенности.

***4. Принцип***

Все реактивы, применяемые при этиологической диагностике туберкулеза, должны иметь степень очистки не ниже категории "химически чистый" (ХЧ). **Не следует использовать реактивы категории «чистый» (Ч) и ниже.**

Для приготовления растворов антибактериальных препаратов, применяемых для ТЛЧ, используют только химические субстанции, для которых производитель указал степень чистоты субстанции или долю активного вещества в ней, а также химическую формулу активного вещества. Если этих сведений нет на этикетке или в паспорте субстанции, необходимо уточнить данные на сайте производителя, используя номер лота имеющейся в лаборатории партии субстанции.

***Внимание! Не допускается использование лекарственных форм препаратов для ТЛЧ!***

При приготовлении сред и иных растворов необходимо использовать химически чистую лабораторную посуду, а также свежеприготовленную дистиллированную, стерильную воду. Приготовление среды должно в точности соответствовать инструкциям производителя (если применимо) или методическим указаниям и рекомендациям. **Недопустимы модификации состава среды!**

### *5. Безопасность и защита окружающей среды*

Работа осуществляется в боксе микробиологической безопасности, с использованием одноразовых инструментов с последующим автоклавированием и утилизацией отходов.

### *6. Оборудование и материалы*

Аналитические весы
Штативы
Стерильная одноразовая посуда
Стерильные многоразовые колбы
Пипетки
Стол
Бокс микробиологической безопасности
Пробирки

### *7. Реагенты и химические вещества*

- Субстанции антибиотиков:
  - INH– изониазид;
  - RIF – рифампицин;
  - EMB – этамбутол;
  - LZD – линезолид;
  - DLM – деламанид;
  - LFX – левофлоксацин;
  - MFX – моксифлоксацин;
  - AMK – амкацин;
  - KAN – канамицин;
  - CAP – капреомицин;
- NaOH – гидроксид натрия;
- Стерильная дистиллированная вода;
- Этанол 95%;
- ДМСО (диметилсульфоксид);
- Сухая основа агара Миддлбрука 7H10;
- Сухая основа агара Миддлбрука 7H11.

### *8. Процедура*

#### *0,1 М раствор NaOH*

Навеску NaOH массой 400 мг растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды.
Полученный раствор автоклавируют 15 минут $121^0$C.
Остужают.
Хранят без доступа воздуха.

## ДЛЯ ТЛЧ К ПРЕПАРАТАМ НА СРЕДЕ 7H11

***Изониазид 0,2***

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 1000 мг активного начала = 100%.

Берут навеску 16 мг изониазида. Маркируют емкости для разведения.

*Готовят раствор А:*

Берут навеску 16 мг изониазида. Растворяют в 40 мл стерильной дистиллированной воде - 400 мкг/мл;

*Готовят раствор Б:*

Берут 9,5 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 0,5 мл раствора А - 20 мкг/мл.

*Готовят питательную среду с ПТП:*

Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7H11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Рифампицин 1,0***

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 970 мг активного начала = 0,97%.

Берут навеску 20,62 мг рифампицина. Маркируют емкости для разведения.

*Готовят раствор А:*

Берут навеску 20,62 мг рифампицина. Растворяют в 20 мл 95%-ного этанола = 1000 мкг/мл;

*Готовят раствор Б:*

Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и осторожно, при помешивании, добавляют 1 мл раствора А - 100 мкг/мл.

*Готовят питательную среду с ПТП:*

Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7H11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Этамбутол 7,5***

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 737 мг активного начала = 73%.

Берут навеску 101,76 мг дигидрохлорида этамбутола. Маркируют емкости для разведения.

*Готовят раствор А:*

Берут навеску 101,76 мг этамбутола. Растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воде – 7,5 мг/мл;

*Готовят раствор Б:*

Берут 9 мл дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А – 0,75 мг/мл.

*Готовят питательную среду с ПТП:*

Берут 0,5 мл раствора Б и доливют питательной среды **7Н11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Линезолид 1,0***

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 1000 мг активного начала = 100%.
Берут навеску 20 мг линезолида. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 20 мг линезолида.
Растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воде - 1000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 100 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Деламанид 0,016***

Берут навеску 20 мг деламанида. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 20 мг деламанида. Растворяют в 20 мл ДМСО - 1000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл ДМСО и добавляют 1 мл раствора А - 100 мкг/мл.
*Готовят раствор В:*
Берут 30,75 мл ДМСО и добавляют 0,5 мл раствора Б – 1,6 мкг/мл
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Бедаквилин. 0,25***

***ВСЕ МАНИПУЛЯЦИИ НЕОБХОДИМО ОСУЩЕСТВЛЯТЬ ТОЛЬКО В СТЕКЛЯННОЙ ПОСУДЕ!***

Берут навеску 20 мг бедаквилина. В случае наличия бедаквилина фумарата, навеска составляет 24,18 мг. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 20 мг бедаквилина или 24,18 мг бедаквилина фумарата. Растворяют в 40 мл ДМСО - 500 мкг/мл. Отставляют, периодически помешивая, до полного растворения бедаквилина.

*Готовят раствор Б:*
Берут 19 мл ДМСО и добавляют 1 мл раствора А - 25 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н11** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

## ДЛЯ ТЛЧ К ПРЕПАРАТАМ НА СРЕДЕ 7Н10

### *Левофлоксанин 1,0*

Активность препарата: в 1 г чистой субстанции содержится 1000 мг активного начала = 100%.

Берут навеску 20 мг левофлоксацина. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 20 мг левофлоксацина. Растворяют в 20 мл 0.1 М раствора NaOH - 1000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 100 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

### *Моксифлоксацин 0.5*

Активность препарата: гидрохлорид, содержание моксифлоксацина - 91%.

Берут навеску 22,26 мг моксифлоксацина. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 22,26 мг моксифлоксацина. Растворяют в 40 мл 0.1 М раствора NaOH - 500 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 50 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

### *Моксифлоксацин 2.0*

Берут навеску 22,26 мг моксифлоксацина гидрохлорида. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 22,26 мг моксифлоксацина гидрохлорида. Растворяют в 40 мл 0.1 М раствора NaOH - 500 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 3 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 2 мл раствора А - 200 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7H10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Амикацин 2.0***

Активность препарата: дисульфат, содержание амикацина 68%.

Берут навеску 58,82 мг амикацина дисульфата. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 58,82 мг амикацина. Растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воде - 2000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 200 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7H10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Канамицин 4,0***

Активность препарата: канамицина моносульфат, содержание канамицина 75 % с сайта PanReac Appl Chem.
Берут навеску 106,67 мг канамицина моносульфата. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 106,67 мг канамицина моносудьфата. Растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды - 4000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 400 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7H10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Капреомицин 4,0***

Активность препарата: капреомицина сульфат, содержание капреомицина 84% CAS 1405-27428602.
Берут навеску 114,29 мг капреомицина сульфата. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А:*
Берут навеску 114,29 мг капреомицина сульфата. Растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды - 4000 мкг/мл;
*Готовят раствор Б:*
Берут 9 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А - 400 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Этионамид 5,0***

Берут навеску 20,41 мг этионамида. Маркируют емкости для разведения.
*Готовят раствор А*:
Берут навеску 20,41 мг этионамида. Растворяют в 8 мл диметилсульфоксида – получают концентрацию активного вещества 2,5 мг/мл.
*Готовят раствор Б.*
Берут 4 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 1 мл раствора А – 0,5 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н10** до 50 мл. Перемешивают. Разливают по чашкам ≈ 4 мл. Оставляют до полного охлаждения при комнатной температуре.

***Стрептомицин 2,0***

Внимание! Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете!
Для стрептомицина сульфата производителем указана активность 750 мг/г или 75%. Берут навеску 106,67 мг сульфата стрептомицина. Маркируют емкости для разведения.
*Готовим раствор А*.
Берут навеску 106,67 мг сульфата стрептомицина. Растворяют в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 4 мг/мл.
*Готовим раствор Б:*
Берут 9,5 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 0,5 мл раствора А – 0,2 мкг/мл.
*Готовят питательную среду с ПТП:*
Берут 0,5 мл раствора Б и доливают питательной среды **7Н10** до 50 мл. Перемешивают, не допуская интенсивного взбалтывания среды. Получают концентрацию стрептомицина 2,0 мкг/мл.

**9. Контроль качества**

Контроль каждой постановки лекарственной чувствительности осуществляется посевом контрольного штамма $H_{37}Rv$.

**10. Уборка рабочего места и утилизация отходов**

Дезинфекцию поверхностей в помещениях, оборудования, лабораторной мебели, приборов и прочего, а также воздуха с использования УФ, проводят после окончания работ, а при необходимости, и перед проведением работ.

Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Не разрешается вынос необеззараженных медицинских отходов из рабочих зон лаборатории. Медицинские отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры).

Обеззараживание медицинских отходов должно проводиться с применением физических методов дезинфекции (автоклавирование).

**11. Нормативные документы**

- Приказ № 109 от 21.03.03 МЗ РФ «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ».
- Учебное пособие «Культуральные методы диагностики туберкулеза» 2008 год.
- Приказ № 951 от 29.12.2014 МЗ РФ «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
- Методические рекомендации «Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций», Москва, 2022

**Пример СОП «Постановка теста лекарственной чувствительности на плотной питательной среде Миддлбрука 7H10, 7H11 методом пропорций»**

| | | |
|---|---|---|
| УНИИФ – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава РФ Отделение микробиологии и ПЦР диагностики | Стандартная операционная процедура **Постановка теста лекарственной чувствительности на плотной питательной среде Миддлбрука 7H10, 7H11 методом пропорций** | Код **МА В** 14.07.2022 Страница 93 из 8 |

**Оглавление:**


**12. Цели и сфера применения**
**13. Сокращения и определения**
**14. Требования к персоналу**
**15. Принцип**
**16. Безопасность и защита окружающей среды**
**17. Оборудование и материалы**
**18. Реагенты и химические вещества**
**19. Процедура.**
**20. Контроль качества**
**21. Уборка рабочего места и утилизация отходов**
**22. Нормативные документы**


| | Составил | Проверил | Утвердил | Новая версия |
|---|---|---|---|---|
| Имя | ФИО | ФИО | ФИО | Код: **МА В** |
| Дата | | | | |
| Подпись | | | | |

| | |
|---|---|
| Количество копий: | Причина изменения: |

**История редакций**

| Дата | Версия | Разделы | Поправки |
|---|---|---|---|
| 14.07.2022 | 01 | Все | Новый СОП |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

## 1. Цели и сфера применения

Данный СОП описывает технологию тестирования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза методом пропорций на плотной питательной среде. Микробиология.

## 2. Сокращения и определения

ЛЧ – лекарственная чувствительность;
ПТП – противотуберкулезные препараты;
МБТ – микобактерий туберкулеза;
ЛУ – лекарственная устойчивость;
ПВБ – промывные воды бронхов;
БМБ – бокс микробиологической безопасности
СОП - *Standard Operating Procedure* = Стандартная операционная процедура= Инструкция по проведению лабораторного исследования.
КК – это минимальная концентрация препарата, при которой отсутствует рост микобактерий «дикого» типа (чувствительных к этому препарату).
Критическая пропорция (КП) - наименьшая доля бактерий, способная расти на среде с препаратом в критической концентрации и ассоциированная с клинической неэффективностью этого препарата. Критическая пропорция принимается равной 1% для всех АБП, кроме пиразинамида (10%).

*Лекарственная чувствительность (ЛЧ) микобактерий к противотуберкулезным препаратам (ПТП)* – это неспособность бактериальных клеток расти на питательной среде

с концентрацией препарата, задерживающей рост микобактерий при стандартных условиях постановки опыта.

*Чувствительными* к данному препарату считаются те культуры микобактерий, на которые этот препарат в критической концентрации оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие.

*Устойчивость (резистентность)* - снижение чувствительности до такой степени, что данная культура микобактерий способна размножаться при воздействии на нее ПТП в критической или более высокой концентрации**.**

*Уровень (или степень) устойчивости* данного штамма - максимальная концентрация препарата (мкг/мл), при которой еще наблюдается размножение микобактерий.

*Критическая концентрация* – это минимальная концентрация препарата в питательной среде, которая in vitro ингибирует рост 99% клинических изолятов дикого типа.

Для различных ПТП установлена определенная критическая концентрация. Она отличается от минимальной ингибирующей концентрации и имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на микобактерий туберкулеза (МБТ) в условиях макроорганизма и выбрана с учетом фармакокинетических и фармакодинамических свойств ПТП.

Для различных по составу питательных сред значение критической концентрации одного и того же препарата может различаться. Значения критических концентраций ПТП существенно отличаются при использовании разных методов определения ЛЧ МБТ.

**3. Требования к персоналу**

3.1. Медицинские требования

- ежедневное термометрирование;
- рентгенография легких 2 раза в год;
- диспансеризация 1 раз в год.

3.2. Образование и обучение (инструктаж)

К работе допускаются:

- специалисты с высшим образованием, прошедшие обучение в соответствии с действующим профессиональным стандартом специалиста клинической лабораторной диагностики, врачи бактериологи или врачи медицинские микробиологи, биологи, имеющие удостоверение о повышении квалификации по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и/или «Бактериология»;
- специалисты со средним медицинским образованием, имеющие сертификат или свидетельство об аккредитации специалиста по специальности «Лабораторная диагностика» или «Бактериология»;
- все специалисты, допущенные к проведению исследований, должны пройти инструктаж по работе с ПБА III и IV группы патогенности;
- все специалисты, имеющие доступ к персональным данным пациента (например, привлекаемые к регистрации образцов), должны быть ознакомлены с правилами охраны персональных данных пациентов.

**4. Принцип**

Метод пропорций был разработан Canetti, Rist и Grosset в 1963 и Middlebrook и Cohn в 1985 году. В настоящее время применяется метод пропорций на плотных средах (ЛЙ и Миддлбрука 7H10 и 7H11), а также модифицированный метод пропорций на жидкой среде Миддлбрука 7H9 с использованием автоматического бактериологического анализатора BACTEC MGIT.

При применении этого метода определяется доля резистентных микобактерий в культуре изолята МБТ. Если на среде с препаратом в КК доля резистентных бактерий ниже величины критической пропорции, изолят считается чувствительным, если выше – устойчивым.

Для тестирования ЛЧ МБТ требуется соблюдать определенные *стандарты исследований*:

- При получении от больного культур МБТ из различного биологического материала (мокроты, ПВБ, мочи, гноя, биопсийного и операционного материала) необходимо исследование каждого выделенного изолята.

- При одновременном получении от больного двух и более культур МБТ из однородного диагностического материала достаточно исследовать один изолят из пробирки с наиболее массивным ростом.

- При выделении культуры МБТ в количестве, недостаточном для получения микобактериальной суспензии необходимой концентрации, тестирование ЛЧ не производят, культуру следует пересеять.

## 5. Безопасность и защита окружающей среды

Работа осуществляется в боксе микробиологической безопасности, с использованием одноразовых инструментов с последующим автоклавированием и утилизацией отходов.

Тестирование ЛЧ МБТ необходимо производить в боксах микробиологической безопасности II класса, которые обеспечивают не только защиту оператора, но и сохранность от контаминации биологического объекта

## 6. Оборудование и материалы

- Стерильные одноразовые пробирки с физиологическим раствором
- Стерильные одноразовые пробирки со стеклянными бусами
- Пробирки со стерильным физиологическим раствором
- Стерильные одноразовые чашки Петри диаметром 35 мм
- Пипетки
- Стерильные одноразовые петли
- Денситометр
- Емкость для отходов
- Шаговый дозатор (степпер)Стерильные наконечники для шагового дозатора (степпера)
- Автоматический одноканальный дозатор (пипетка)

- Стерильные наконечники, снабжённые противоаэрозольным фильтром, для автоматического дозатора
- Бокс микробиологической безопасности 2 класса
- Встряхиватель типа Vortex
- Штативы
- Термостат t= $37^0$C

## 7. Реагенты и химические вещества

- Среда 7H10
- Среда 7H11
- Стерильный физиологический раствор

## 8. Процедура

**Выбор культур для ТЛЧ**

Для ТЛЧ используют изоляты МБТ, не контаминированные другими микроорганизмами. Культуру изолята следует тщательно проверить на чистоту:
- необходимо сделать мазок из исходной культуры, окрасить его по Цилю-Нильсену и проверить препарат на наличие КУМ и отсутствие других микроорганизмов;
- после проверки засевают суспензию культуры изолята на чашку Петри с кровяным агаром. Инкубируют засеянные чашки Петри при 35 ºС ± 1 ºС в течение 48 часов. Если рост появляется, культура контаминирована, и ТЛЧ проводить не следует.

**Приготовление суспензии**

Пробирки с проверенными и отобранными для ТЛЧ культурами расставляют в штативе в порядке возрастания номеров. Маркируют пробирки для приготовления суспензии номерами отобранных для ТЛЧ культур и расставляют все пробирки одного набора (для серийных разведений) в штатив в один ряд. Располагают ряды в порядке возрастания номеров культур.

Приготовление суспензии из культуры, выросшей на плотной питательной среде.

• Собирают колонии со всей поверхности плотной среды, *не допуская повреждения поверхности среды*, поскольку остаточная среда будет давать ложные показания мутности суспензии.
• Переносят бактериальную массу в заранее подготовленную и промаркированную пробирку со стеклянными бусами. Перемешивают на встряхивателе типа Vortex в течение 1 минуты. Добавляют 3–6 мл стерильного физиологического раствора, плотно закрывают крышку пробирки и перемешивают на встряхивателе типа Vortex в течение 1 минуты.
Приготовленной суспензии дают отстояться в течение 30 минут.

Переносят 1–2 мл жидкости из верхней части суспензии в стерильную пробирку, диаметр которой соответствует диаметру пробирки со стандартом мутности 1.0 МакФарланда. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не захватить осадок.
Доводят мутность суспензии до стандарта 1.0 МакФарланда, контролируя ее с помощью денситометра.

Разведения суспензий.

Маркируют пробирки К $10^{-2}$ – для разведения в 100 раз, и К $10^{-4}$ – для разведения в 10 000 раз. Добавляют в пробирки по 9,9 мл стерильного физиологического раствора.
Из пробирки с суспензией 1 MF переносят 100 мкл (0,1 мл) в пробирку К $10^{-2}$. Перемешивают на встряхивателе типа Vortex в течение 10 секунд.
Из пробирки с суспензией К $10^{-2}$ переносят 100 мкл (0,1 мл) в пробирку К $10^{-4}$.
Перемешивают на встряхивателе типа Vortex в течение 10 секунд.

Посев.

Маркируют наборы чашек для постановки ТЛЧ:

*Для всей постановки*:
Контроль среды 7Н10 (К0) (не засевают),
Или Контроль среды 7Н11 (К01) (не засевают),
*Для каждого изолята:*
Контрольная чашка Петри с номером изолята без препарата со средой 7Н10, разведение суспензии культуры МБТ $10^{-2}$ (К2).
Контрольная чашка Петри с номером изолята без препарата со средой 7Н10, разведение суспензии культуры МБТ $10^{-4}$ (К4).
Контрольная чашка Петри с номером изолята без препарата со средой 7Н11, разведение суспензии культуры МБТ $10^{-2}$ (К21).
Контрольная чашка Петри с номером изолята без препарата со средой 7Н11, разведение суспензии культуры МБТ $10^{-4}$ (К41).
*Набор чашек Петри для каждого изолята должен быть приготовлен из одной партии среды.*
Чашки с номером изолята, названием препарата, его концентрацией.

Посев суспензии МБТ

Берут автоматическую пипетку, устанавливают указатель на цифру «2», вставляют стерильный наконечник, получают объем одной дозы 100 мкл (0,1 мл). *Осторожно, не задевая стенки пробирки стержнем пипетки*, опускают наконечник в пробирку с суспензией в разведении $10^{-4}$ и набирают полный наконечник. Аккуратно, по стенке пробирки, сбрасывают первую дозу обратно в пробирку, чтобы удалить воздушные пузырьки.

Набирают полный наконечник повторно и засевают по 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-4}$ в чашку со средой без препарата (К 4 и К 41).

Опускают тот же наконечник в пробирку с суспензией в разведении $10^{-2}$ и набирают полный наконечник.

Засевают по 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-2}$ на среды, содержащие препараты.

Засевают по 0,1 мл суспензии в разведении $10^{-2}$ в чашку со средой без препарата (К 2 и К 21).

При использовании степпера набирают полный наконечник суспензии и пошагово засевают по 0,1 мл в соответствующие чашки. Закрывают пробирки с суспензией.

Покачивая чашку, равномерно распределяют суспензию по поверхности среды.

Засеянные чашки закрывают крышками.

Далее повторяют процедуру с остальными изолятами. Для каждого изолята используют отдельные стерильные наконечники.

Засеянные чашки оставляют на рабочей поверхности в БМБ до впитывания суспензии.

Когда суспензия впитается, герметизируют чашки лентой «Парафильм», запечатывают в пакет и ***крышками вверх*** помещают в термостат на $37^0$ С.

Инкубация

Засеянные чашки инкубируют ***крышками вверх*** при температуре 37°С ±1°С.

Через 3–7 дней инкубации осматривают чашки для выявления контаминированных посевов. Удаляют контаминированные чашки и повторяют ТЛЧ.

Чашки инкубируют до 28 дней с момента посева.

## Оценка результатов тестирования лекарственной чувствительности

Учет и интерпретация результатов

Долю устойчивых бактерий в культуре определяют сравнением их количества на среде с АБП с количеством выросших бактерий на среде без препарата (контрольные образцы). Количество выросших бактерий (колонии образующих единиц - КОЕ) определяют путем подсчета колоний на плотных средах. Клинический изолят считается резистентным к препарату, если доля резистентных бактерий в нем выше критической пропорции для этого препарата, и считается чувствительным, если эта доля ниже критической пропорции.

Учет результатов ТЛЧ производят на 21 и 28 день со дня засева. На 21 день сообщают предварительный результат, на 28 – окончательный результат ТЛЧ.

Если на 21 или 28 день отношение числа колоний на среде, содержащей препараты, к числу колоний на контрольной среде с учетом разведений составляет 1% или более, то культуру считаем устойчивой. Если нет колоний на среде, содержащей препараты, а на контрольной среде, засеянной суспензией в разведении $10^{-2}$, наблюдается сплошной рост, изолят считают чувствительным.

Если на 21-й день в контроле (среда без АБП, засеянная суспензией в разведении$10^{-2}$) наблюдаем 50 колоний или менее, засев был недостаточен, и учет результатов на 28 день. Если при этом на среде, содержащей противотуберкулезный препарат, есть колонии, изолят регистрируют как устойчивый.

Все остальные результаты сообщают после 28 дней инкубации.

Результаты исследования переносят из Журналов регистрации исследований в электронную базу «АЛИСА» и в форму для представления результатов в клинику.

9. **Контроль качества** Контроль каждой постановки лекарственной чувствительности осуществляется посевом контрольного штамма $H_{37}Rv$. Контроли К0 и К01 (2-3 чашки) помещают в термостат сразу после розлива агара в чашки Петри. Оставшиеся К0 и К01 помещают в пакеты с другими засеянными чашками на весь срок инкубации.

## 10. Уборка рабочего места и утилизация отходов

Дезинфекцию поверхностей в помещениях, оборудования, лабораторной мебели, приборов и прочего, а также воздуха "заразной" зоны с использования УФ, проводят после окончания работ с ПБА, а при необходимости, и перед проведением работ с ПБА.

При проведении ТЛЧ образуются медицинские отходы, относящиеся к классам Б и В. Сбор, хранение и утилизация отходов проводится в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Отходы, содержащие (потенциально содержащие) ПБА (материалы и инструменты, предметы, загрязненные биологическим материалом), относят к медицинским отходам класса В, которые подлежат обязательному обеззараживанию. Не разрешается вынос необеззараженных медицинских отходов из рабочих зон лаборатории. Медицинские отходы класса В собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (не прокалываемую) упаковку (контейнеры) красного или иного цвета, но имеющие красную маркировку. Выбор упаковки зависит от состава отходов. Обеззараживание медицинских отходов должно проводиться с применением физических методов дезинфекции (автоклавирование).

## 11. Нормативные документы

- Приказ № 109 от 21.03.03 МЗ РФ «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ».
- Учебное пособие «Культуральные методы диагностики туберкулеза» 2008 год.
- Приказ № 951 от 29.12.2014 МЗ РФ «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
- Методические рекомендации «Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций», Москва, 2022

**Приложение 8**

## Постановка теста на лекарственную чувствительность МБТ на жидкой среде (модифицированный метод пропорций)

Принцип метода описан в разделе 4.5.

### 1. Приготовление и хранение жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9

Бульон Миддлбрука 7H9 может применяться как для приготовления суспензий культур МБТ для посева при ТЛЧ, так и для ТЛЧ при использовании автоматизированного бактериологического анализатора с флуоресцентной детекцией роста BACTEC MGIT. При ТЛЧ в автоматизированной системе используются пробирки MGIT с готовой питательной средой (раздел 3.4).

Сухая среда Миддлбрука 7H9 имеется в продаже, при приготовлении бульона из сухой среды необходимо строго выполнять рекомендации производителей.

При приготовлении среды из готовой смеси рассчитывают навеску сухой среды, необходимую для приготовления требуемого объема среды (исходя из рекомендаций производителя). Например, для получения 1000 мл готовой среды взвешивают 4,7 г сухой смеси (пересчитайте в соответствии с инструкцией производителя) и суспендируйте ее в 900 мл дистиллированной воды.

*При приготовлении среды соблюдайте правила асептики!*

Добавьте 2,0 мл глицерина (х.ч.) ***или*** 0,5 г TWEEN 80 (не применяйте глицерин и TWEEN 80 вместе) и тщательно перемешайте содержимое колбы.

Закройте колбу ватной пробкой и автоклавируйте ее при 1 атм. ($121^0$C) 15 минут.

Достаньте среду из автоклава и охладите ее до $45^0$C (поместите в водяную баню, установленную на эту температуру).

Добавьте в среду 100 мл питательной добавки ADC и тщательно перемешайте.

Среда готова к применению.

Питательная добавка ADC продается в виде стерильной суспензии, содержащей бычий альбумин, каталазу и декстрозу в физиологическом растворе. Хранить при $+4^0$C. Перед добавлением в среду ADC подогревают до комнатной температуры, встряхивают для получения равномерной суспензии.

В наборах для ТЛЧ BACTEC MGIT модифицированный бульон Миддлбрука 7H9 разлит по 7 мл в пробирки MGIT. В состав среды для ТЛЧ с использованием пробирок MGIT включен казеиновый пептон (панкреатический гидролизат казеина). Вместо добавки ADC применяют стерильную добавку SIRE, входящую в состав набора для ТЛЧ BACTEC MGIT к препаратам 1-го

ряда (изониазиду, рифампицину, этамбутолу и стрептомицину). В состав добавки SIRE входят бычий альбумин, декстроза, каталаза и олеиновая кислота (OADC). Стерильную добавку SIRE вносят в каждую пробирку.

**Приготовление среды для ТЛЧ к пиразинамиду.** Метод ТЛЧ с применением BACTEC MGIT – единственный, для которого определена КК пиразинамида (таблица 2), т.е., единственный метод ТЛЧ МБТ к этому препарату. Состав среды и добавки для ТЛЧ к этому препарату отличаются от применяемых для ТЛЧ к другим АБП. Для ТЛЧ к пиразинамиду используется модифицированная среда Мидлбрука 7H9 с pH=5,9. Обогатительная добавка к среде содержит бычий альбумин, декстрозу, TWEEN 80, каталазу и олеиновую кислоту. При постановке ТЛЧ к пиразинамиду следуйте инструкциям производителя, используйте готовый набор для ТЛЧ к пиразинамиду.

Обогатительную добавку вносят в каждую пробирку перед добавлением раствора пиразинамида.

Во флаконы с готовой средой (пометьте их, указав название препарата и его концентрацию), приготовленными для внесения АБП, внесите необходимые объемы растворов АБП (см. приложение 4).

Для приготовления пробирок MGIT с препаратами используют препараты из набора для ТЛЧ производителя прибора или приобретенные отдельно чистые субстанции препаратов и инструкции по их разведению.

Пробирки MGIT с обогатительными добавками и АБП готовят непосредственно перед засевом и не хранятся.

## 2. Приготовление растворов антибактериальных препаратов для жидкой среды Миддлбрука 7H9

*Необходимо проверить чистоту и активность субстанций, которые Вы используете!*

Перечень АБП для постановки ТЛЧ на жидкой среде Миддлбрука 7H9 приведен в таблице ниже:

| Препараты | BACTEC MGIT |
|---|---|
| изониазид | 0,1 |
| рифампицин | 0,5 |
| этамбутол | 5,0 |
| пиразинамид | 100,0 |
| стрептомицин | 1,0 |
| левофлоксацин | 1,0 |
| моксифлоксацин (КК) | 0,25 |
| моксифлоксацин (КП) | 1,0 |
| бедаквилин | 1,0 |
| линезолид | 1,0 |

| | |
|---|---|
| деламанид | 0,06 |
| амикацин | 1,0 |
| канамицин | 2,5 |
| капреомицин | 2,5 |
| этионамид | 5,0 |
| протионамид | 2,5 |

После внесения ростовой добавки, раствора АБП и суспензии МБТ совокупный объём жидкости в индикаторной пробирке MGIT составляет 8,4 мл (7 мл 7H9 + 0,8 мл SIRE/OADC + 0,1 мл раствора АБП + 0,5 мл суспензии МБТ = 8,4 мл).

Ниже приведены примеры расчётов навесок и порядок приготовления растворов АБП для выполнения ТЛЧ 20 изолятов.

Если используются готовые наборы субстанций препаратов производства Becton Dickinson, разведения препаратов следует готовить в соответствии с инструкцией производителя.

**Изониазид**

КК изониазида при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 0,1 мкг/мл. В одну пробирку MGIT необходимо внести 0,1 мкг/мл*8,4 мл = 0,84 мкг изониазида. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно, необходимо приготовить раствор изониазида с концентрацией 0,84 мкг/0,1 мл = 8,4 мкг/мл.

Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией изониазида 420 мкг/мл необходимо 420 мкг/мл*40 мл = 16,8 мг изониазида. Корректировочные коэффициенты для изониазида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

**Раствор А.** Растворяют 16,8 мг изониазида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 24,5 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 8,4 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация изониазида 0,1 мкг/мл.

**Рифампицин**

КК рифампицина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 0,5 мкг/мл. В одну пробирку MGIT необходимо внести 0,5 мкг/мл*8,4 мл = 4,2 мкг рифампицина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор рифампицина с концентрацией 4,2 мкг/0,1 мл = 42 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для рифампицина равны $К_А$=1 и $К_с$=0,97.

Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией рифампицина 420 мкг/мл (420 мкг/мл*40 мл =16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($K_A$*$K_c$) = 16,8/(1*0,97) = 17,32 мг рифампицина.

Внимание! Рифампицин не растворим в воде.

**Раствор А.** Растворяют 17,32 мг рифампицина в 40 мл 95%-ного этанола или диметилформамида. Для ускорения полного растворения препарата допустимо легкое подогревание на водяной бане до 35 – 40°С. Полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют небольшими порциями при тщательном перемешивании 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества – 42 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация рифампицина 0,5 мкг/мл.

**Этамбутол**

КК этамбутола при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 5,0 мкг/мл. В одну пробирку MGIT необходимо внести 5,0 мкг/мл*8,4 мл = 42 мкг этамбутола. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор этамбутола с концентрацией 42 мкг/0,1 мл = 420 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для этамбутола дигидрохлорида равны $K_A$=0,737 и $K_c$=1. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 420 мкг/мл (40 мл*420 мкг/мл = 16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($K_A$*$K_c$) = 16,8 мг/(0.737*1) = 22.8 мг дигидрохлорида этамбутола.

**Раствор А.**

Растворяют 22,8 мг этамбутола дигидрохлорида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора А** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация этамбутола 5,0 мкг/мл.

**Стрептомицин**

Внимание! Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете!

КК стрептомицина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл. В одну пробирку MGIT необходимо внести 1,0 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг стрептомицина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно, необходимо приготовить раствор стрептомицина с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл. Для

стрептомицина сульфата производителем указана активность 750 мг/г или 75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$). Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 840 мкг/мл (40 мл*840 мкг/мл = 33,6 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 33,6/0,75 = 44,8 мг стрептомицина сульфата.

**Раствор А.** Растворяют 44,8 мг сульфата стрептомицина в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 840 мкг/мл.

**Раствор Б**. К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды - полученная концентрация активного вещества 84 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация стрептомицина 1,0 мкг/мл.

**Левофлоксацин**

КК левофлоксацина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 1,0 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг левофлоксацина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор левофлоксацина с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл.

Корректировочные коэффициенты для левофлоксацина равны $K_A$=1 и $K_c$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется.

Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 840 мкг/мл необходимо 20 мл*840 мкг/мл = 16,8 мг левофлоксацина.

Готовят 0,1М раствор NaOH. Для этого растворяют 0,4 г NaOH в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

**Раствор А**. Растворяют 16,8 мг левофлоксацина в 20 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 840 мкг/мл.

**Раствор Б**. К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 84 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация левофлоксацина 1,0 мкг/мл.

**Моксифлоксацин (0.25 мкг/мл)**

КК моксифлоксацина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 0,25 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 0,25 мкг/мл*8,4 мл = 2,1 мкг моксифлоксацина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор моксифлоксацина с концентрацией 2,1 мкг/0,1 мл = 21 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для гидрохлорида моксифлоксацина равны $K_A$=0,917 и $K_c$=0,98.

Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 420 мкг/мл (40 мл*420 мкг/мл = 16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($К_А$*$К_с$) = 16,8 мг/(0.917*0,98) = 18,69 мг гидрохлорида моксифлоксацина.

Готовят 0,1М раствор NaOH. Для этого растворяют 0,4 г NaOH в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

**Раствор А.** Растворяют 18,69 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 40 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 0,5 мл **раствора А** добавляют 9,5 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 21 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация моксифлоксацина 0,25 мкг/мл.

**Моксифлоксацин (1.0)**

КП моксифлоксацина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 1 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг моксифлоксацина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор моксифлоксацина с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для гидрохлорида моксифлоксацина равны КА=0,917 и Кс=0,98.

Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 420 мкг/мл (40 мл*420 мкг/мл = 16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($К_А$*$К_с$) = 16,8 мг/(0.917*0,98) = 18,69 мг гидрохлорида моксифлоксацина.

Готовят 0,1М раствор NaOH. Для этого растворяют 0,4 г NaOH в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

**Раствор А.** Растворяют 18,69 мг моксифлоксацина гидрохлорида в 40 мл 0.1М раствора NaOH – полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация – 84 мкг/мл активного вещества.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация моксифлоксацина 1,0 мкг/мл.

**Амикацин**

*Внимание! Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете!*

КК амикацина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 1 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг амикацина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор амикацина с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл. Для амикацина дисульфата производителем указана активность 674 – 786 мкг/мг или 67,4 - 78,6% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 68% активности.

Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 840 мкг/мл (20 мл*840 мкг/мл = 16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8/0,68 = 24,71 мг амикацина дисульфата.

**Раствор А.** Растворяют 24,71 мг дисульфата амикацина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 840 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 84 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация амикацина 1,0 мкг/мл.

**Канамицин**

*Внимание! Проверьте чистоту субстанции препарата, которую Вы используете!*

КК канамицина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 2,5 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 2,5 мкг/мл*8,4 мл = 21 мкг канамицина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор канамицина с концентрацией 21 мкг/0,1 мл = 210 мкг/мл. Для канамицина моносульфата производителем указана активность >750 мкг/мг или >75% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 75% активности.

Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2100 мкг/мл (20 мл*2100 мкг/мл = 42 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 42/0,75 = 56 мг канамицина моносульфата.

**Раствор А.** Растворяют 56 мг моносульфата канамицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 2100 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 210 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация канамицина 2,5 мкг/мл.

**Капреомицин**

КК капреомицина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 2,5 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 2,5 мкг/мл*8,4 мл = 21 мкг капреомицина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор капреомицина с концентрацией 21 мкг/0,1 мл = 210 мкг/мл. Для капреомицина сульфата производителем указана активность 700-1050 мкг/мг или 70-105% (в этой величине уже учтены коэффициенты $K_A$ и $K_c$); выполним расчёт на 70% активности. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2100 мкг/мл (20 мл*2100 мкг/мл = 42 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 42/0,70 = 60 мг.

**Раствор А.** Растворяют 60 мг сульфата капреомицина в 20 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 2100 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 210 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация капреомицина 2,5 мкг/мл.

**Этионамид**

КК этионамида при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 5,0 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 5,0 мкг/мл*8,4 мл = 42 мкг этионамида. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор этионамида с концентрацией 42 мкг/0,1 мл = 420 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для этионамида равны $K_A$=1 и $K_c$=0.98. Для приготовления 8 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 2,1 мг/мл (8 мл*2,1 мг/мл = 16,8 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($K_A$*$K_c$) = 16,8 мг/(1*0.98) = 17.14 мг.

**Раствор А.** Растворяют 17,14 мг этионамида в 8 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 2,1 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 0,42 мг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация этионамида 5,0 мкг/мл.

**Протионамид**

КК протионамида при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 2,5 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 2,5 мкг/мл*8,4 мл = 21 мкг протионамида. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор протионамида с концентрацией 21 мкг/0,1 мл = 210 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для протионамида равны $К_А$=1 и $К_с$=0.98. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией активного вещества 1,05 мг/мл (20 мл*1,05 мг/мл = 21 мг) с учётом корректировки массы навески необходимо 21 мг/($К_А$*$К_с$) = 21 мг/(1*0.98) = 21.43 мг.

**Раствор А.** Растворяют 21,43 мг протионамида в 20 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 1,05 мг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл стерильной дистиллированной воды. Полученная концентрация активного вещества 0,21 мг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация протионамида 2,5 мкг/мл.

**Бедаквилин**

***Для всех манипуляций используйте посуду только из стекла или полистирола!***

КК бедаквилина при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл. В одну пробирку MGIT необходимо внести 1,0 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг бедаквилина. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно, необходимо приготовить раствор бедаквилина с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл.

Корректировочные коэффициенты для бедаквилина равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией бедаквилина 420 мкг/мл необходимо 420 мкг/мл*40 мл = 16,8 мг бедаквилина.

В случае бедаквилина фумарата необходима корректировка навески в соответствии с $К_А$ =0,827 ($К_с$=1). Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией бедаквилина 420 мкг/мл (420 мкг/мл*40 мл = 16,8 мг ) с учётом корректировки массы навески необходимо 16,8 мг/($К_А$*$К_с$) = 16,8 мг/(0,827*1) = 20,31 мг фумарата бедаквилина.

**Раствор А.** Растворяют 16,8 мг бедаквилина (или 20,31 мг фумарата бедаквилина) в 40 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 420 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 4 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 84 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация бедаквилина 1,0 мкг/мл.

**Линезолид**

КК линезолида при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 1,0 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 1,0 мкг/мл*8,4 мл = 8,4 мкг линезолида. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно, необходимо приготовить раствор линезолида с концентрацией 8,4 мкг/0,1 мл = 84 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для линезолида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется. Для приготовления 40 мл **раствора А** с концентрацией линезолида 840 мкг/мл необходимо 840 мкг/мл*40 мл = 33,6 мг линезолида.

**Раствор А.** Растворяют 33,6 мг линезолида в 40 мл стерильной дистиллированной воды – полученная концентрация активного вещества 840 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 84 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора Б** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация линезолида 1,0 мкг/мл.

**Деламанид**

КК деламанида при выполнении ТЛЧ с использованием BACTEC MGIT составляет 0,06 мкг/мл.

В одну пробирку MGIT необходимо внести 0,06 мкг/мл*8,4 мл = 0,504 мкг деламанида. Вносимая в пробирку MGIT аликвота – 0,1 мл, соответственно необходимо приготовить раствор деламанида с концентрацией 0,504 мкг/0,1 мл = 5,04 мкг/мл. Корректировочные коэффициенты для деламанида равны $К_А$=1 и $К_с$=1, поэтому корректировка массы навески не требуется. Для приготовления 20 мл **раствора А** с концентрацией деламанида 1000 мкг/мл необходимо 1000 мкг/мл*20 мл = 20 мг деламанида.

**Раствор А.** Растворяют 20 мг деламанида в 20 мл диметилсульфоксида – полученная концентрация активного вещества 1000 мкг/мл.

**Раствор Б.** К 1 мл **раствора А** добавляют 9 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 100 мкг/мл.

**Раствор В.** К 1 мл **раствора Б** добавляют 18,84 мл диметилсульфоксида, тщательно перемешивают полученный раствор - полученная концентрация активного вещества 5,04 мкг/мл.

Вносят 0,1 мл **раствора В** в подготовленную пробирку MGIT и тщательно перемешивают. Получена концентрация деламанида 0,06 мкг/мл.

**Приготовление суспензии клинических изолятов микобактерий туберкулеза**

***ВНИМАНИЕ! Процедура приготовления суспензии приводит к образованию инфекционного аэрозоля!*** Работа с культурами, а также все манипуляции с ними должны выполняться внутри боксов микробиологической безопасности.

Для постановки ТЛЧ на жидкой среде с использованием системы BACTEC MGIT могут использоваться как культуры изолятов, выращенные в пробирках MGIT, так и культуры, выращенные на плотных средах.

*Культура, полученная в пробирках MGIT*. Для получения посевного материала используют культуры в возрасте 1–5 дней с момента регистрации в ней роста прибором (день, когда был зарегистрирован рост в пробирке, считается 0, в этот день культура еще не готова для постановки ТЛЧ). Культуру можно инкубировать в другом инкубаторе при 37 ºС ± 1 ºС. Культура, инкубировавшаяся более 5-го дня после регистрации роста, должна быть пересеяна в новую пробирку MGIT со средой Миддлбрука 7H9, с добавкой OADC и инкубироваться в приборе до регистрации положительного результата. Эта культура может быть использована с 1-го по 5-й день после регистрации роста.

3. **Приготовление инокулята**

Тщательно перемешивают содержимое пробирки с применением встряхивателя типа Вортекс, чтобы разбить комки. Оставляют пробирку в покое на 5–10 минут, чтобы крупные комки осели на дно. Для ТЛЧ к пиразинамиду оставляют пробирку в покое на 15–20 минут. Осторожно собирают надосадочную жидкость (с помощью стерильной пипетки) в чистую стерильную пробирку (пробирка 1).

Переносят (с помощью стерильной пипетки) 1,0 мл суспензии из пробирки 1 в стерильную пробирку, содержащую 4,0 мл стерильного физиологического раствора (разведение А), и хорошо перемешивают содержимое. Используют это разведение суспензии (1:5) для посева в пробирки со средами, содержащими АБП.

Культура, полученная на плотных средах. Подготовка суспензии культур и меры предосторожности при приготовлении суспензии – такие же. как в разделе 3.2.2.

После гомогенизации суспензии и отстаивания ее в течение 30 минут осторожно отбирают надосадочную жидкость (осевшие частицы не должны попасть в отобранную аликвоту) и переносят ее в стерильную пробирку.

Доводят мутность суспензии до соответствия стандарту МакФарланда 0,5 (см. Приложение 14) с помощью стерильного физиологического раствора. *Не допустимо осуществлять засев суспензии с меньшей мутностью!*

Разводят полученную суспензию в 5 раз, добавив 1,0 мл суспензии к 4,0 мл стерильного физиологического раствора (разведение А). Хорошо перемешивают и используют для засева в пробирки со средой, содержащей АБП.

4. **Подготовка к засеву суспензии и посев суспензии в пробирки MGIT**

Подготавливают пробирки MGIT в количестве, необходимом для засева, с учетом числа тестируемых изолятов, количества тестируемых препаратов и, дополнительно, по одной контрольной пробирке (без препарата) для каждого изолята. Маркируют пробирки, указав номер изолята и тестируемый препарат.

Добавляют в пробирки необходимые добавки в соответствии с Руководством для пользователя от производителя.

С соблюдением мер асептики добавляют в пробирку MGIT 0,1 мл раствора АБП. Хорошо перемешивают.

В последнюю очередь добавляют с соблюдением правил асептического посева:

- 0,5 мл суспензии изолята в разведении А в пробирки со средами с АБП;
- разводят суспензию в разведении А в 100 раз (добавляют 0,1 мл суспензии А к 9,9 мл стерильного физиологического раствора), тщательно перемешивают и вносят 0,5 мл полученной суспензии в контрольные пробирки.

Для приготовления контрольной пробирки для ТЛЧ к пиразинамиду суспензию А разводят в 10 раз (добавляют 0,5 мл суспензии А в пробирку с 4,5 мл стерильного физиологического раствора), тщательно перемешивают полученную суспензию и добавляют 0,5 мл полученной суспензии в контрольную пробирку. Помечают эту пробирку как контроль для пиразинамида.

Завинчивают крышки пробирок MGIT и тщательно перемешивают содержимое пробирок.

Культивирование и автоматическая регистрация роста. Порядок расстановки пробирок в держателе и держателя в прибор проводится в соответствии с инструкцией производителя и руководством пользователя.

Прибор поддерживает постоянную температуру 37°С ± 1°С внутри отсека, в который помещаются пробирки для инкубации.

Прибор автоматически считывает заранее внесенные в программу штрих-коды держателей и анализирует появление в пробирках флуоресценции в пороговых значениях, регистрируя рост в пробирках, размещенных в определенных держателях, в определенном положении. Когда тест будет завершен, прибор предоставит распечатку, интерпретирующую результаты для тестируемых препаратов.

Настройки по умолчанию, обычно используемые для тестирования антибактериальных препаратов первого ряда, не применяются при ТЛЧ препаратов второго ряда. Однако есть возможность ввести пробирку как «содержащую неизвестный агент» или «Неуточненный

препарат». В этом случае прибор будет контролировать рост и значения GU всех пробирок в наборе. Как только GU в такой пробирке достигает значения 400 или более, прибор прекращает тестирование и помечает пробирку как завершившую тестирование, но не интерпретирует результаты. Результаты ТЛЧ для препаратов 2-го ряда интерпретируются оператором самостоятельно.

*Внимание! Необходимо обеспечить бесперебойное электропитание автоматического бактериологического анализатора и принтера (необходим резервный источник электроэнергии, автоматически обеспечивающий электропитание приборов при отключении постоянного источника электроэнергии).*

*Необходимо поддержание постоянного напряжения (используйте стабилизатор напряжения адекватной мощности)*.

**5. Интерпретация результатов**

Для препаратов 1-го ряда результаты интерпретируются прибором в автоматическом режиме.

Для препаратов 2-го ряда результаты интерпретируются в соответствии с руководством пользователя следующим образом:

• Устойчивый изолят - значение GU контроля достигает 400 или более, а значение GU пробирки с тестируемым препаратом составляет 100 или более.

• Чувствительный изолят - значение GU контроля достигает 400 или более, а значение GU пробирки с тестируемым препаратом составляет менее 100.

Ошибка X: результаты являются неопределенными из-за некоторых условий, повлиявших на достоверность теста, например:

−ошибка X400: GU контрольной пробы достигает 400 или выше менее, чем за 4 дня. Эта ошибка указывает на то, что посевной материал был контаминирован или посевная доза была слишком высокой. Следует повторить тест, соблюдая правила приготовления суспензии.

−ошибка X200: эта ошибка возникает, если инокулят содержал недостаточное количество жизнеспособных организмов. В этом случае контроль не достигнет необходимого количества GU в течение 13 дней – максимального срока инкубации, предусмотренного протоколом тестирования, заложенным в программное обеспечение прибора. Следует повторить тест, соблюдая правила приготовления суспензии.

Приложение 9

**Пример журнала регистрации приготовления сред** (в электронной форме или на бумажном носителе) – на разворот листа

| №[1] | Название среды[2] | Название АБП, содержащегося в среде | Дата изготов-ления | Разлито в пробирки/ чашки Петри (какие)[3] | Кол-во единиц[4] | ФИО приготовившего партию среды | Место хранения партии среды | Номер первого изолята* | Номер последнего изолята ** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

2-я страница

| Контроль качества партии | | | | | | | | | № |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Визуаль-ный контроль[5] | Результаты теста на стерильность | Результаты теста на ростовые качества[6] | Результаты тестирования активности сред с АБП[7] | ФИО выполнившего контроль качества | Дата постановки контроля качества | Заключение о годности среды [8] | Примечания[9] | Дата заключе-ния | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

[1]номер соответствует номеру набора сред для ТЛЧ – 2 контроля и по 1 пробирке с препаратами
[2] указать название среды
[3]указать: пробирки, чашки Петри 90 мм односекционные, 35 мм, 90 мм многосекционные
[4]Указать кол-во разлитых пробирок/чашек Петри
[5]указать сколько пробирок/чашек Петри выбраковано
[6] указать количество выросших колоний в обоих засеянных разведениях суспензий
[7] Указать наличие/отсутствие роста контрольного штамма
[8] заключение о годности/негодности среды
[9]указать причины выбраковки образцов,
* номер клинического изолята, с которого начали использовать партию среды
** номер последнего клинического изолята, протестированного с применением этой партии среды

**Приложение 10**

**Пример журнала регистрации поступивших в лабораторию сред/наборов реагентов (**в электронной форме или на бумажном носителе**) – на развернутый лист**

| № | Дата поступления в лабораторию | Наименование среды/ номер регистрационного удостоверения | Произво-дитель | Серия/ лот | Дата изготов-ления | Единицы[2] | Кол-во единиц[3] | Место хранения партии среды | Номер первого изолята** | Номер последнего изолята *** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

2-я страница

| Контроль качества партии | | | | | | | | | № |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Визуаль-ный контроль[4] | Результаты теста на стерильность[5] | Результаты теста на ростовые качества[5] | Результаты тестирования активности сред с АБП[6] | ФИО выполнившего контроль качества | Дата постановки контроля качества | Заключение о годности среды[7] | Примечания[8] | Дата заключе-ния | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

[1] указать название среды и рег. номер в Государственном реестре медицинских изделий https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch

[2]указать вид единиц пробирки, чашки Петри 90 мм односекционные, 35 мм, 90 мм многосекционные

[3]Указать кол-во единиц пробирок/чашек Петри

[4]указать сколько пробирок/чашек Петри выбраковано

[5] указать количество выросших колоний в обоих засеянных разведениях суспензий. Если приложены результаты контроля качества производителя, указать наличие данных

[6] указать наличие/отсутствие роста контрольного штамма. Если приложены результаты контроля качества производителя, указать наличие данных

[7] заключение о годности/негодности среды Если приложены результаты контроля качества производителя не требуется

[8]указать причины выбраковки образцов,

*номер клинического изолята, с которого начали использовать партию среды

** номер последнего клинического изолята, протестированного с применением этой партии среды

**Приложение 11**

**Пример журнала поступивших в лабораторию субстанций антибактериальных препаратов** (в электронной форме или на бумажном носителе) – на развернутый лист

| № | Дата поступления в лабораторию | Наименование АБП, его каталожный номер у поставщика | Производитель /поставщик | Серия/лот | Дата изготовления | Единицы[2] | Кол-во единиц[3] | Брутто-формула/мол.масса | Активность /чистота |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

2-я страница

| Номер первого изолята** | Номер последнего изолята *** | Место хранения партии субстанции | ФИО ответственного за хранение | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

[1] указать название АБП

[2]указать вид единиц (мг) во флаконе

[3]Указать кол-во единиц

*номер клинического изолята, с которого начали использовать партию АБП

** номер последнего клинического изолята, протестированного с применением этой партии АБП

**Приложение 12**

**Пример журнала учета приготовления растворов антибактериальных препаратов** (в электронной форме или на бумажном носителе) – на развернутый лист

| № | Дата приготовления раствора АБП | Наименование АБП | Номер партии и дата поступления партии субстанции | Масса навески, мг | Растворитель | Объем растворителя | Использовано ex tempore | Хранение | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | Объем в криопробирке | Кол-во единиц криопробирок | Место хранения, номер контейнера |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

2-я страница

| Номер первого изолята** | Номер последнего изолята *** | Место хранения партии субстанции | ФИО приготовившего раствор | № |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

[1] указать название АБП

*номер клинического изолята, с которого начали использовать базовый раствор АБП

** номер последнего клинического изолята, протестированного с применением этого базового раствора АБП

**Приложение 13**

Пример формы лабораторного заключения о результатах тестирования чувствительности микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам

*[1]Наименование учреждения*

*[2]Адрес*

**Результат исследования лекарственной чувствительности МБТ на [3]*питательных средах* методом пропорций**

ФИО пациента: _____ Дата рождения: _____ Пол: _____

Лабораторный №: _____ Вид биоматериала: _____

Дата сбора материала: _____ Дата доставки материала: _____

Отделение: _____

| № | Противотуберкулезный препарат | Значение критической концентрации (мг/л) | Результат |
|---|---|---|---|
| 1 | [4]Стрептомицин | [5] | Чувствительность / устойчивость |
| 2 | Изониазид | | |
| 3 | Рифампицин | | |
| 4 | Этамбутол | | |
| 5 | Левофлоксацин | | |
| 6 | Моксифлоксацин | | |
| N | … | … | |

*Примечание:*

[6]Тип результата: предварительный/окончательный

Дата выдачи: Подпись: ([7]ФИО)

[1]Прописывается наименование лечебного учреждения

[2] Адрес лечебного учреждения

[3] Указать наименование питательной среды, на которой определяли ТЛЧ

[4] Перечисляются ПТП, к которым проводили ТЛЧ. Зависит от вида питательной среды.

[5] Концентрации указываются в зависимости от вида питательной среды.

[6] Ставится отметка: предварительные результаты или окончательные

[7] ФИО специалиста, выполнившего исследование

**Приложение 14**

**Приготовление стандартов МакФарланда 1,0 и 0,5**

Для стандартизации суспензии микобактерий, приготовленной для посева, проводят визуальное или с использованием денситометра сравнение ее мутности с мутностью стандарта МакФарланда 1.0, соответствующего бактериальной суспензии Escherichia coli $3x10^8$КОЕ, и стандарта МакФарланда 0.5, соответствующего бактериальной суспензии Escherichia coli $1,5x10^8$КОЕ

Стандарт МакФарланда готовят в лаборатории следующим образом.

*Внимание! Для приготовления растворов, измерения объемов ингредиентов и приготовления навесок используйте химическую мерную посуду и аналитические весы с точностью 0,01 г.*

Готовят раствор серной кислоты с ее объемной долей, равной 1%: к 99 мл дистиллированной воды медленно добавляют 1 мл химически чистой концентрированной серной кислоты. *Всегда добавляйте кислоту в воду!*

Готовят раствор хлорида бария с его массовой долей 1% (1 г химически чистого $BaCl_2$ растворить в 100 мл воды)

Правила взвешивания и приготовления растворов см. в Приложении 3.

**Приготовление стандарта Макфарланда 1.0** К 99 мл раствора серной кислоты добавьте 1 мл раствора $BaCl_2$. Тщательно перемешайте полученный раствор, осторожно встряхивая пробирку.

**Приготовление стандарта Макфарланда 0,5** К 99,5 мл раствора серной кислоты добавьте 0, 5 мл раствора $BaCl_2$. Тщательно перемешайте полученный раствор, осторожно встряхивая пробирку.

*Или* к 5 мл дистиллированной воды добавить 5 мл тщательно перемешанной суспензии из стандарта МакФарланда 1.0.

Перенесите полученные растворы в 1-2 пробирки с завинчивающимися пробками и закройте их герметично (залейте пробку воском или замотайте парафильмом). Пробирки со взвесью сульфата бария могут служить стандартом МакФарланда 1.0 и 0,5 в течение нескольких лет, если исключить испарение из них жидкости.

***Внимание! Ширина пробирок, применяемых для стандартов, и толщина их стекла должны быть такими же, как и у пробирок, применяемых для приготовления суспензий микобактерий.***

# СОСТАВ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ

**Беляев Данила Владимирович –** младший научный сотрудник научно-исследовательского клинического отдела Уральского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии- филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Вахрушева Диана Владимировна –** заведующая научно-исследовательским отделом микробиологии и доклинических исследований Уральского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии - филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Винокуров Анатолий Сергеевич –** младший научный сотрудник лаборатории микробиологии, вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования, врач бактериолог отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Голубева Людмила Андреевна –** заведующая отделением микробиологии и ПЦР-диагностики Уральского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии - филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Грачева Александра Николаевна** - врач бактериолог отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Казюлина Анастасия Александровна** - младший научный сотрудник лаборатории микробиологии, вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования.

**Красноборова Светлана Юрьевна –** директор Уральского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии - филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Панова Анна Евгеньевна** – заведующая отделением лабораторной диагностики, заведующая лабораторией микробиологии, вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

**Шульгина Марина Владимировна** – советник директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.