

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФБУН

Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии

_____ И.А. Дятлов

«___» _____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

2.1 Состав XDR-теста

XDR - тест выпускается комплектом, состоящим из девяти флаконов, двух стерильных шприцев и цветовой шкалы для регистрации интенсивности окраски:

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

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

2.3 Принцип действия

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

XDR - тест обеспечивает определение устойчивости культур микобактерий туберкулеза к изониазиду, рифампицину, канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину по появлению красной или розовой окраски во флаконах, содержащих соответствующие противотуберкулезные препараты, после внесения по 0,5 мл 7,5 % водного раствора реактива Грисса

во все флаконы (с №1 по №7), засеянные по 0,2 мл микробной взвеси из разведения 10^{-1} , приготовленной по оптическому стандарту мутности 5 ед., через 8-14 суток инкубирования при температуре (37 ± 1) °С.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Термостат обеспечивающий температуру 37 ± 1 °С;
- Пробирки стеклянные или колбы для приготовления микробных суспензий;
- Бусы стеклянные диаметром 2-3 мм или 3-5 мм;
- Пипетки стеклянные, позволяющие отбирать объемы жидкости 1 мл;
- Пинцет, скальпель или ножницы;
- Вода дистиллированная или 0,02% раствор твина 80.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Культуры микобактерий туберкулеза.

6. БЕЗОПАСНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка XDR–теста.

Перед использованием необходимо осмотреть все флаконы на наличие признаков повреждения или загрязнения. Если во флаконах наблюдаются трещины или признаки возможного загрязнения, такие как изменение цвета или консистенции, то эти флаконы использовать не следует.

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

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

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

7.2. Посев

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

Затем засеянные флаконы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в наклонном положении таким образом, чтобы инокулят равномерно распределялся по всей поверхности склона среды. Для этого их помещают в упаковочную коробку с предварительно выдавленной перфорированной стенкой.

8. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Приготовление раствора реактива Грисса

Непосредственно перед проведением учета результатов готовят 7,5 %-ный раствор реактива Грисса путем добавления 5 мл дистиллированной воды, подогретой до температуры 50 С, к содержимому флакона № 8. Приготовленный раствор можно использовать в течение 14 суток при условии хранения его при температуре 2-8 °С в темном месте.

8.2. Регистрация результатов

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

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

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

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

Возможные причины отсутствия окраски в контрольных флаконах:

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

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

8.3. Интерпретация результатов

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

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

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Срок годности – 3 месяца.

Препарат с истекшим сроком годности использованию не подлежит!

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