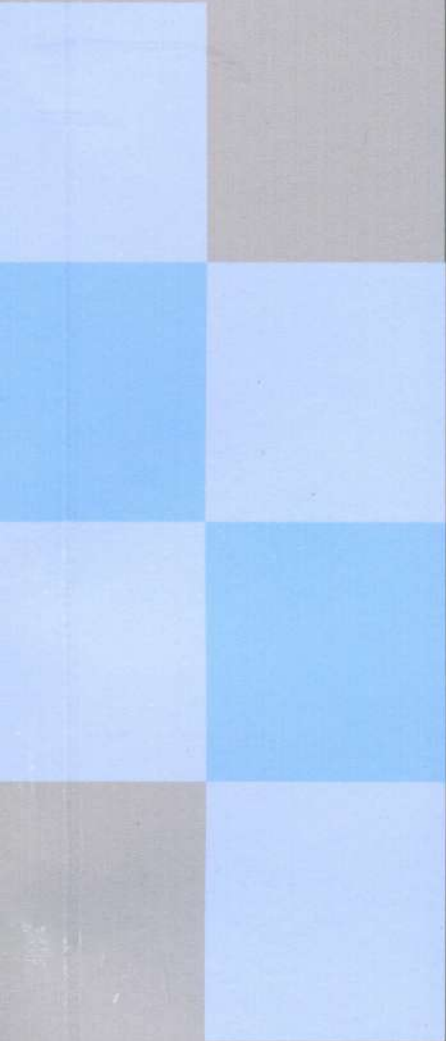


ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская государственная
медицинская академия» МЗ РФ



**«Стандартные
операционные процедуры
в лабораторной
диагностике туберкулеза»**

Методическое пособие

2021г.



Р 542-4

**ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская
государственная медицинская академия» МЗ РФ**

В.В. Дзагоев, Б.М. Малиев, О.З. Басиева

**«Стандартные операционные
процедуры в лабораторной
диагностике туберкулеза»**

Методическое пособие

Владикавказ 2021



ББК 55.4

УДК 616-093/-098

С80

В.В. Дзагоев, Б.М. Малиев, О.З. Басиева

С80 «Стандартные операционные процедуры в лабораторной диагностике туберкулеза». *Методические рекомендации для врачей – бактериологов, врачей – фтизиатров, ординаторов фтизиатров и пульмонологов*

В.: - 2021. – 216 с.: ил.

Рецензенты: к.м.н. А.Е. Гурина, к.м.н. В.С. Одинец

В методическом пособии изложены современные способы идентификации возбудителя туберкулезной инфекции - микобактерий туберкулеза (*M.Tuberculosis*). Представленные в методическом пособии методы лабораторной диагностики являются оригинальной разработкой, в основу которой положен принцип обработки и диагностической оценки полученных результатов лабораторных исследований. Методическое пособие подготовлено с учётом основных требований Министерства здравоохранения Российской Федерации. В нем приведено описание методик, технология проведения, используемая аппаратура, показания и противопоказания к применению, данные о диагностической эффективности их использования. Изложенный материал является инструкцией по методикам выявления и определения чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам микробиологическими и молекулярно-генетическими методами в соответствии с международными стандартами.

Предлагаемое методическое пособие представляет безусловный интерес, заслуживает серьёзного внимания и может принести существенную пользу при его практическом применении.

ISBN 978-5-6047239-7-5



9 785604 723975

УДК 616-093/-098

© В.В. Дзагоев, Б.М. Малиев, О.З. Басиева, 2021

© ООО НПКП «Мавр», 2021

СОДЕРЖАНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ	3
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	5
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА	5
СПИСОК СТАНДАРТНЫХ ОПЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕДУР	5
ПРИЛОЖЕНИЯ	167
ЛИТЕРАТУРА	209
1. СБОР, ДОСТАВКА, ПРИЕМ И РЕГИСТРАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	6
1.1 Режимы и кратность обследования больных	6
1.2 Правила сбора диагностического материала	7
1.3 Виды диагностического материала	7
1.4 Консервация и транспортировка диагностического материала	14
1.4.1 Консервация	14
1.4.2 Транспортировка	14
1.5 Правила работы с диагностическим материалом	17
1.5.1 Прием диагностического материала	19
1.5.2 Техника безопасности при работе с диагностическим материалом	20
1.5.3 Оценка качества и количества мокроты	21
2. ДЕКОНТАМИНАЦИЯ И РАЗЖИЖЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	21
2.1 Стандартные методы разжижения и деконтаминации	21
2.1.1 Метод с использованием N-ацетил-L-цистеина и гидроокиси натрия (<i>NALC-NaOH</i>)	22
2.1.2 Обработка материала 10% раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия	22
2.1.3 Обработка материала 3% серной кислотой	23
2.1.4 Обработка материала 4% раствором едкого натра (модифицированный метод Петрова)	25
2.1.5 Материалы, не нуждающиеся в деконтаминации	26

3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ, ОКРАСКА ПО Ziehl-Neelsen	26
3.1 Приготовление мазков для микроскопических исследований	26
3.1.1 Оборудование и реактивы для приготовления мазков из диагностического материала при окраске по методу <i>Ziehl-Neelsen</i> и флюорохромными красителями	27
3.1.2 Подготовка предметных стекол	28
3.1.3 Приготовление мазков из нативного материала	29
3.1.4 Фиксация мазков	31
3.1.5 Окраска препаратов для световой микроскопии по методу <i>Ziehl-Neelsen</i>	32
3.1.6 Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии	32
3.1.7 Оборудование и реактивы для окраски по методу <i>Ziehl-Neelsen</i> и флюорохромными красителями	34
3.1.8 Процедура окраски по <i>Ziehl-Neelsen</i>	36
3.1.9 Метод окраски флюорохромными красителями	37
3.2 Хранение приготовленных мазков	38
4. МИКРОСКОПИЯ МАЗКА С ОКРАСКОЙ ПО <i>Ziehl-Neelsen</i> и флюорохромными красителями	38
4.1 Возможности метода микроскопического исследования кислотоустойчивых микобактерий	39
4.1.1 Оборудование и реактивы для проведения микроскопического исследования препаратов, окрашенных по методу <i>Ziehl-Neelsen</i> и флюорохромными красителями	40
4.1.2 Морфологические характеристики кислотоустойчивых микобактерий при окраске по методу <i>Ziehl-Neelsen</i>	41
4.1.3 Порядок проведения микроскопического исследования по <i>Ziehl-Neelsen</i>	41
4.1.4 Порядок проведения микроскопии при окраске флюорохромными красителями	44
4.1.5 Ошибки при выполнении лабораторных процедур	48
4.1.6 Учет результатов микроскопического исследования при окраске по методу <i>Ziehl-Neelsen</i>	50

4.1.7 Учет результатов микроскопического исследования при окраске флюорохромными красителями	51
5. ПОСЕВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ЖИДКИЕ И ТВЕРДЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ	52
5.1 Режимы и кратность обследования больных	54
5.1.1 Культуральные методы диагностики туберкулеза	55
5.1.2 Принципы предпосевной обработки диагностического материала (твердые среды)	55
5.1.3 Техника посева и инкубации, оценка и учет результатов	56
5.1.4 Процедура посева	56
5.1.5 Инкубация	57
5.1.6 Питательные среды	58
5.1.7 Среда Левенштейна-Йенсена	59
5.1.8 Способ приготовления	59
5.1.9 Проверка на стерильность	60
5.2 Хранение	60
5.2.1 Оценка результатов посева	60
5.2.2 Характеристика колоний <i>M. tuberculosis</i>	61
5.2.3 Учет результатов посева диагностического материала	63
5.2.4 Предварительная идентификация комплекса <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	63
5.2.5 Техника посева на жидкие питательные среды (Мидлбрук 7H9)	64
5.2.6 Процедура подготовки пробирок и посев образца	66
5.2.7 Посев в пробирку MGIT	66
5.2.8 Детекция положительного и отрицательного роста	67
6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР	67
6.1 Идентификация выделенных культур	67
6.1.1 Характеристика колоний <i>M. tuberculosis</i>	69
6.1.2 Предварительная идентификация комплекса <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	72
6.1.3 Основные биохимические тесты идентификации <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	72

6.1.3.1 Ниациновый тест	74
6.1.3.2 Тест с наличием нитратредуктазы	77
6.1.3.3 Каталазный тест	82
6.1.4 Дополнительные биохимические тесты	85
6.1.4.1 Тест с паранитробензойной кислотой (PNB-тест)	85
6.1.4.2 Тест с 5% хлоридом натрия	86
6.1.4.3 Пиразиnamидазный тест	86
6.1.4.4 Тест с салициловокислым натрием	87
6.1.4.5 Тест с гидразидом тиофен-2-карбоксиловой кислоты	88
7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ	
<i>M. TUBERCULOSIS</i> К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ	
ПРЕПАРАТАМ 1 И 2 РЯДА НА ЖИДКИХ И ТВЕРДЫХ	
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ	88
7.1 Виды лекарственной устойчивости	89
7.1.1 Критерии лекарственной устойчивости	90
7.1.2 Метод абсолютных концентраций	91
7.1.3 Разведение противотуберкулезных препаратов и приготовление питательных сред	92
7.1.4 Примеры приготовления питательных сред с препаратами	93
7.1.5 Постановка опытов по определению лекарственной устойчивости	98
7.1.6 Приготовление бактериальной суспензии	98
7.1.7 Процедура исследования	99
7.1.8 Оценка результатов	100
7.2 Тесты на лекарственную чувствительность к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу (<i>SIRE</i>) на анализаторе <i>ВАСТЕС MGIT 960/320</i>	100
7.2.1 Реагенты	100
7.2.2 Добавление лекарственного препарата в пробирку со средой	101
7.2.3 Подготовка инокулята. Посев и инкубация	101
7.2.4 Процедура посева на ЛЧ	102
7.2.5 Тесты на чувствительность к пиразинамиду	103

7.2.6	Принцип проведения теста	103
7.2.7	Реагенты	103
7.2.8	Методика исследования	103
7.2.9	Подготовка инокулята	103
7.3	Посев и инкубация	103
7.3.1	Определение лекарственной чувствительности к препаратам 2-го ряда в системе <i>BACTEC MGIT 960/320</i>	104
7.3.2	Общие требования по технике безопасности	105
7.3.3	Исследование лекарственной чувствительности в системе <i>BACTEC MGIT 960/320</i>	106
7.3.4	Приготовление рабочих растворов препаратов	107
7.3.5	Разведения препаратов 2-го ряда	107
7.3.6	Хранение рабочих растворов ПТП	112
7.3.7	Подготовка пробирок и посев образца	112
7.3.8	Подготовка пробирок <i>MGIT</i>	112
7.3.9	Подготовка суспензии культуры, посев	113
7.4	Установка тестов в прибор <i>BACTEC MGIT 960/320</i> , интерпретация и выдача результатов	115
7.4.1	Важные примечания	117
7.4.2	Контроль качества	117
7.4.3	Методика выполнения	118
7.4.4	Ожидаемые результаты	118
7.4.5	Анализ воспроизводимости	118
7.4.6	Анализ и критерии приемлемости	119
8. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ		119
8.1	Принцип метода	119
8.1.1	Ограничения метода	121
8.1.2	Анализируемые пробы	122
8.1.3	Условия транспортировки и возможного хранения анализируемых проб	125
8.1.4	Меры предосторожности к материалу исследования	125

8.1.5 Обеззараживание проб	125
8.1.6 Проведение анализа	125
8.1.7 Выделение ДНК ручным методом	126
8.1.8 Выделение ДНК на автоматизированных станциях	128
8.1.9 Проведение количественного ПЦР-РВ анализа	130
8.2 Процедура измерения результатов анализа	132
8.2.1 Интерпретация результатов анализа	133
8.2.2 Оценка результатов количественного анализа	135
8.2.3 Оценка валидности положительного результата по уровню контаминации при ручном методе выделения ДНК	136
8.2.4 Критерии отбора положительных образцов для молекулярно-генетического анализа на определение лекарственной устойчивости с помощью набора «Амплитуб-МЛУ-РВ»	136
8.2.5 Порядок оценки результатов, полученных на амплификаторе <i>Rotor Gene</i>	137
8.2.6 Определение мутаций <i>M.tuberculosis</i> complex, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, методом ПЦР-РВ	139
8.2.7 Подготовка к проведению реакции «Multi»	139
8.2.8 Определение лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду	140
8.2.9 Определение лекарственной устойчивости к фторхинолонам	146
8.3 Проведение мультиплексной ПЦР-РВ с помощью комплекта «Multi-FQ»	148
8.3.1 Определение генных мутаций в <i>gyrA</i> локусе МБТ	150
8.3.2 Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза методом <i>Xpert MTB/RIF</i>	154
9. ОРГАНИЗАЦИЯ И УПРАВЛЕНИЕ РАБОТОЙ ЛАБОРАТОРИИ	162