



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

Министерство на здравеопазването

Министър на здравеопазването

ЗАПОВЕД

№ РД-01-42 / 10.03.2016г.

На основание чл. 25, ал. 4 от Закона за администрацията и чл. 5, ал. 2, т. 20 от Устройствения правилник на Министерството на здравеопазването, във връзка с чл. 2, т. 3 от Закона за здравето

НАРЕЖДАМ:

I. Утвърждавам Методическо указание за микробиологична диагностика на туберкулозата, съгласно приложението.

II. Отменям Заповед № РД-09-412/25.08.2008 г. за утвърждаване на Методично указание за микробиологична диагностика и лечение на туберкулозата.

III. Методическото указание по т. I. да се публикува на интернет страницата на Министерство на здравеопазването.

Д-Р ПЕТЪР МОСКОВ

Министър на здравеопазването



МЕТОДИЧЕСКО УКАЗАНИЕ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНА ДИАГНОСТИКА НА ТУБЕРКУЛОЗАТА

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Микробиологичното изследване за туберкулоза е ключов компонент в стратегията на лечението на туберкулозата, препоръчан от Световната здравна организация (СЗО). Само чрез микробиологичните методи може да се изолира, идентифицира и определи лекарствената чувствителност на всеки конкретен щам *M. tuberculosis*, т.е. да бъде потвърдена диагнозата „туберкулоза“ и да бъде мониториран отговорът към лечението на всеки пациент.

1.1. Микроскопско изследване

Въпреки новите достижения в микробиологията на туберкулозата, лабораторната диагностика, както и преди, се базира на микроскопското изследване на оцветени препарати на храчка. Тази методика е проста, евтина, бърза и позволява да се открият именно тези болни, които представляват източник на инфекцията, т.е. поддържат епидемичния риск. Към момента не съществува друга методика, която равностойно да замени микроскопското изследване на храчка.

1.1.1. Чувствителност на микроскопското изследване на храчка

Това представлява способността на метода да открие заболяването сред популацията от лица с действителни данни за туберкулоза т.е. „действително положителните“. Той зависи от формата на поражение, типа и количеството на клиничните проби, вида на микобактериите и опитността на лабораторния специалист. Минималното количество киселинно устойчиви микобактерии (КУБ), което трябва да се съдържа в храчката, за да се позитивира резултатът от микроскопското изследване, трябва да бъде между 5 000 до 10 000 микроорганизма в 1 мл. В храчките на болните от белодробна туберкулоза (особено при наличие на каверни) се съдържат значително количество КУБ, което позволява лесно да бъдат открити при микроскопско изследване. Чувствителността може да се увеличи при наблюдение на няколко храчки от един и същ пациент, както е показано на Таблица 1.

Таблица 1: Чувствителност на микроскопското изследване на храчка.

Количество КУБ при бактериоскопия	Приблизителен брой КУБ в 1 мл. хрчка	Вероятност от положителен резултат
0 КУБ на 100 зрителни полета	по-малко от 1000	по-малко от 10%
1-2 КУБ на 300 зрителни полета	5 000 – 10 000	50%
1-9 КУБ на 100 зрителни полета	Около 30 000	80%
1-9 КУБ на 10 зрителни полета	Около 50 000	90%
1-9 КУБ на всяко зрително поле	около 100 000	96,2%
> 10 КУБ на зрителни полета	около 500 000	99,95%

Чувствителността на микроскопското изследване на хрчка е ниска при извънбелодробна локализация на туберкулозния процес, при туберкулоза у децата, както и при заболявания, предизвикани от нетуберкулозни микобактерии.

1.1.2. Специфичност на микроскопското изследване на хрчка

Специфичността на микроскопското изследване се използва за откриване на „истински отрицателните“ индивиди. Тя обикновено превишава 98%. Когато се говори за специфичността на микроскопското изследване, трябва ясно да се разграничат две ситуации:

1.1.2.1. Когато в пробата хрчка КУБ отсъстват, а резултатът е положителен (т.е. получава се „фалшиво положителен резултат“); Много фактори биха могли да доведат до получаването на фалшиво положителен резултат. Например – КУБ могат да попаднат в препарата от инфектирана вода и кристали на боите при приготвяне на оцветителните разтвори, при използване на кювети, както и при контаминация на имерсионното масло или обектива.

1.1.2.2. Когато в пробата хрчка има КУБ, а резултатът е отрицателен при културелното изследване (т.е. получава се фалшиво отрицателен резултат на културелното изследване). Причини за фалшиво отрицателен резултат могат да бъдат:

1.1.2.2.1. Лошото качество при филтрация на оцветителните разтвори или дългото им съхранение;

1.1.2.2.2. Наличието в препаратите на артефакти;

1.1.2.2.3. Недостатъчното обезцветяване.

1.1.2.3. Препоръчва се следната процедура на събиране на хрчките:

1.1.2.3.1. Първата проба се взема по време на посещението на пациента в лечебното заведение (ЛЗ);

1.1.2.3.2. Втората проба – първа сутрешна хрчка (за предпочитане на следващата сутрин).

1.1.2.3.3. Трета проба се взема в ЛЗ, когато пациентът носи за изследване втората си проба.

Световната здравна организация препоръчва при различните категории болни по DOT (Стратегия за пряко наблюдавано лечение на туберкулозата) да се спазва следната схема:

I Категория – по 3 броя храчки за микроскопия и посевка при постъпване, по два броя на 2(3)-я, на 5-я месец от началото на терапията и в края на терапията.

II Категория – по 3 броя храчки при постъпване, по два броя в края на 3-я месец; ако е положителен – по още 2 броя в края на 4-я месец, както и по 2 броя храчки за 5-я и 8-я месеци.

За хроничните случаи – всеки месец се изследват храчки за микроскопия и посеви.

1.2. Културелно изследване

Културелното изследване се смята за „златен стандарт“ в микробиологичното доказване на туберкулозата. Дългото генерационно време при *M. tuberculosis* - от 18 до 24 часа, изключителната високост на микроорганизма, както и присъствието в храчките на съпътстваща неспецифична бактериална флора, налагат някои особености при култивиране на тези микроорганизми. Използват се богати хранителни среди, култивирани от 6-8 седмици след предварителна обработка на храчката, т.нар. „деконтаминация“. В зависимост от вида на хранителните среди и използвания метод на деконтаминация на храчката, *M. tuberculosis* може да бъде изолиран, дори при много ниското му присъствие в материала, напр. 10 жизнеспособни бактерии. Културелното изследване позволява да се увеличи броят на новоизолираните бацилоотделители, нерядко с 30-50%. Методите за деконтаминация и култивиране трябва да бъдат унифицирани и стандартизирани за цялата страна, което да осигури оптимална възможност за по-бързо и надеждно изолиране на причинителя на туберкулозата, както и да се намали броят на контаминирани посеви от съпътстващата неспецифична флора, т.е. да се влезе в рамките между 2-5% контаминация.

Културелно изследване се прилага в следните случаи:

1.2.1. Паралелно с микроскопското изследване на храчката на пациента, суспектен за туберкулоза;

1.2.2. При пациенти с клинични и рентгенологични данни за туберкулоза, при повторно отрицателно микроскопско изследване;

1.2.3. Контролно изследване на болните, неповлияващи се от терапията;

1.2.4. При групите с повишен риск - контактни на болни от туберкулоза, лабораторен и друг медицински персонал, осъществяващи наблюдение на болни с резистентна туберкулоза;

1.2.5. При диагноза на извънбелодробни форми на туберкулоза.

1.3. Определяне на чувствителността към лекарствени продукти

Определянето на чувствителността на конкретните изолирани щамове *M. tuberculosis* към противотуберкулозни лекарствени продукти има съществено значение за решението на много епидемиологични задачи. Тестът за лекарствена чувствителност има решаващо значение и за отделния болен, при лечението на когото се наблюдават незадоволителни резултати, или се отбелязва рецидив на заболяването. Връзката между микробиолога и лекуващия лекар (пневмофтизиатър) трябва да е непрекъсната в хода на провежданото лечение на туберкулозата.

1.3.1 Определяне на чувствителността на туберкулозните щамове се прави при:

1.3.1.1. Новооткрити бацилоотделители;

1.3.1.2. Пациенти, неповлияващи се от терапията;

1.3.1.3. Пациенти с рецидив.

Всеки резистентен щам трябва да се изпраща в Националната референтна лаборатория по туберкулоза (НРЛТБ) за потвърждение.

Основни методи за определяне на чувствителността към противотуберкулозни лекарствени продукти, стандартизирани и широко разпространени в международната практика, препоръчани от СЗО са: метод на абсолютните концентрации; метод на резистентните съотношения; пропорционален метод; автоматично отчитане – чрез нерадиометрична автоматизирана система (Bactec MGIT 960 System); нитрат редуктазен метод; техники за амплификация на нуклеинови киселини: линейно хибридизационни методи (LPA) и Real-Time PCR метод (Xpert/RIF)

1.4. Видова идентификация

Видовата идентификация до *M. tuberculosis complex* трябва да се осъществява по описаните по-нататък методи в лабораториите, осъществяващи културелно изследване. При наличие на NTM шамът се изпраща в Националната референтна лаборатория по туберкулоза за неговата точна идентификация.

2. Организационна структура на лабораторната мрежа

В настоящия момент лабораториите, осъществяващи микробиологичната диагностика на туберкулозата, са към специализираните болници за активно лечение на белодробни болести, многопрофилните болници за активно лечение, и специализираните болници за продължително лечение на белодробните болести.

2.1. Лабораторна мрежа – нива на лабораторно обслужване

Организацията на лабораторната мрежа за целите на микробиологичната диагноза на туберкулозата е структурирана в следните четири нива:

2.1.1. Лаборатории от периферно ниво

2.1.2. Лаборатории от средно ниво

2.1.3. Регионално ниво лаборатории

2.1.4. Национална референтна лаборатория по туберкулоза.

2.2. Функции и задължения на различните нива лаборатории

Критериите за съответствие на различните нива лаборатории, включващи изисквания към оборудването им, квалификация на медицинския персонал и обема им дейност са регламентирани в Наредба № 4 от 2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт “Микробиология”, (обн. ДВ, бр.11 от 09.02.2010 г.).

3. Контрол на качеството, осигуряване на качеството на работа в лабораториите и професионално тестване

Целта на системата за осигуряване на качеството е повишаване на ефективността и надеждността на работата на лабораториите. За да бъде постигнато това високо техническо качество на лабораторната диагностика, трябва да функционира постоянно действаща система за контрол на качеството. Компонентите на тази система по осигуряване на качеството са:

3.1. Контрол на качеството;

3.2. Подобряване на качеството;

3.3. Професионални тествания.

3.1. Контрол на качеството

Контролът на качеството е процес на ефективен и системен мониторинг на цялостната работа на микробиологичната лаборатория, в сравнение с установените стандарти. Контролът на качеството служи за гаранция, че предоставената лабораторна

информация е действително точна, надеждна и възпроизводима, т.е. това е фактически механизъм, с помощта на който лабораторията потвърждава своята компетентност. Отделни аспекти от контрола на качеството по отношение на микроскопското и културелното изследвания са детайлно разгледани в "Микроскопско изследване" и „Културелно изследване”.

3.2. Подобряване на качеството

Подобряване на качеството е процес, с помощта на който различните аспекти от дейността на микробиологичните лаборатории се подлагат на постоянен анализ, с цел да се подобрят достоверността и ефективността на използване на лабораторните данни. Известно е, че най-добре изразено и продължително подобрене може да се постигне, ако се прогнозируют възможните проблеми, а не търсене на тяхното решение след тяхното възникване. Ключов компонент на този процес е събирането на информация и нейният анализ, а също и творческото решение на възникналите проблеми. За това е необходим непрекъснат мониторинг на работата на лабораториите, откриване на наличните несъответствия и незабавни ответни действия, с цел избягване повторно възникване на аналогичен проблем. Най-бързият и най-ефективен метод за подобряване качеството на работа на лабораториите е оценката по време на контролно посещение, т.нар. „супервизия на място”. Тези посещения се осъществяват по предварително уточнен ред, като на място се попълва контролен лист, включващ наблюдение на всички аспекти от рутинната дейност на посетената лаборатория. Копие от попълнения контролен лист, съдържащ констатации и препоръки се предоставя на началника на лабораторията. При личния контакт и на място се разрешават възникналите в лабораторията проблеми. По време на тези визити се осъществяват:

Запознаване със спазването на общите правила на санитарно-хигиенния режим и правилата на техниката на безопасност;

3.2.1. Проверка на налични на достъпно място писмени стандартни оперативни процедури с детайлно описание на всички манипулации и методики;

3.2.2. Проверка на правилното регистриране в съответните журнали на факти от работата на оборудването и неговата сервизна поддръжка;

3.2.3. Оценка на честотата на получените клинични материали в незадоволително състояние – напр. колко често постъпват неправилно транспортирани материали или контейнери с незавинтени капаци и изтичащ материал от тях. Ако това се случва често от едно и също отделение или лечебно заведение, трябва да се анализират причините и да се посочат мерки за разрешаване на проблема;

3.2.5. Проверка за наличие на етикети на всички оцветители, реагенти и хранителни среди с указание за използване и срок на годност; проверка на срока на годност на използваните материали;

3.2.6. Проверка за редовно използване на положителни и отрицателни контроли при микроскопско и културелно изследване, както и при идентификация;

3.2.7. Анализ на процента положителни проби (напр. за всеки месец) с цел откриването на съществени отклонения от средните показатели;

3.2.8. Наличие на колекция от всички положителни микроскопски препарати от цялата предходна и настоящата календарна година;

3.2.9. Ежемесечна оценка на честотата на контаминация при културелното изследване по отношение на общия брой посевки и броя на положителните посевки.

3.3. Професионални тествания

Терминът „професионално тестване”, който в съответствие със стандартите на СЗО се нарича „външен контрол на качеството” или „външна оценка на качеството”,

означава система от ретроспективни и обективни сравнения на резултатите от работата на различните лаборатории в страната.

Съгласно Наредба № 4 от 2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Микробиология" лабораториите провеждат два пъти годишно външен качествен контрол чрез участие в междублабораторни сравнителни изследвания в Националната система за външна оценка на качеството, организирана от отдел „Микробиология“ при Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ). Националната референтна лаборатория по туберкулоза участва в чуждестранна нетърговска система за външна оценка. Главната цел на професионалното тестване е да се оцени качеството на направените изследвания, потвърждавайки съпоставимостта на резултатите на различните лаборатории. Всяка лаборатория има специфичен код, известен само на контролираната и контролиращата лаборатории. Националната референтна лаборатория по туберкулоза изготвя и изпраща комплекти с контролните задачи, т. нар. „панелно тестване“, съгласно заявките на желаещите да вземат участие в контролния цикъл по всички позиции, обявени на сайта на НЦЗПБ или само на част от тях, в зависимост от обхвата на дейност на тези лаборатории. Заедно със заявката за посочената позиция, по която тестваната лаборатория ще участва, началникът ѝ изпраща и подписана от него декларация, в уверение на това, че ръководената от него лаборатория отговаря на условията за осъществяването на микробиологична работа с биологични агенти от група 3 – *M.tuberculosis*, съгласно Наредба № 4 от 2002 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа (обн., ДВ, бр. 105 от 8.11.2002 г.) и, че изследването е извършено от него или неговият екип; в съответстващата на кода микробиологична лаборатория; при условия, отговарящи на посочената наредба и правилата за техника на безопасност при работа, използвайки лични и колективни предпазни средства (съобразно кода на заявления външен контрол: респираторни предпазни маски; ръкавици; предпазни работно облекло и обувки; ламинарен бокс, клас 2; антиаерозолна центрофуга и т.н., **Приложение №1: Декларация за условия на биобезопасност**). Лабораториите, получили задачите, провеждат необходимите изследвания и съобщават резултатите в НРЛ ТБ (в предварително определен срок), попълвайки съответните приложения електронно и на хартия **Приложение: № №2, 3 и 4**).

Националната референтна лаборатория по туберкулоза оповестява оценката от представянето на тестваната лаборатория и на Българския лекарски съюз. При показани резултати от 80% и над 80% НЦЗПБ издава сертификат за конкретната позиция на контролираната лаборатория, с продължителност 6 месеца. При откриване на проблеми в процеса на професионалното тестване се дават препоръки за подобряване на качеството на работа. Националната референтна лаборатория по туберкулоза изпраща до всяка от участващите лаборатории писмен отчет за проведения тест, както и в електронен вариант на сайта на Българската асоциация на микробиолозите (БАМ), което позволява всеки един от участниците да сравни своите резултати с тези на останалите си колеги. Тези данни се изпращат и до Националната програма по туберкулоза (НПТ).

3.3.1. Външна оценка на качеството на микроскопското изследване за киселинно-устойчиви бактерии (КУБ)

При „панелното тестване“ до направили заявката си лаборатории се изпраща специален набор от 5 препарата с известни резултати за НРЛ ТБ – фиксирани, неочветени намазки от деконтаминирани хрочки. Препаратите са изработени съобразно изискванията в Ръководството "External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy" на WHO, SDS, IUATLD, APHL, KNCV, JATA от 2002 г.

Контролът има за цел да провери техниката на оцветяване и микроскопиране, както и правилната качествена и количествена интерпретация на микроскопски препарати за КУБ.

Критериите за оценка са съобразно посочената скала на Таблица 2.

Таблица 2: Критерии за оценка на качеството на микроскопското изследване за КУБ

Резултат на тестваната лаборатория	Резултат на НРЛ ТБ				
	Отрицателен	1-9 КУБ на 100 зрителни полета	(1+) пол.	(2+) пол.	(3+) пол.
Отрицателен	Вярно	LFN	HFN	HFN	HFN
1-9 КУБ на 100 зрителни полета	LFP	Вярно	Вярно	QE	QE
(1+) пол.	HFП	Вярно	Вярно	Вярно	QE
(2+) пол.	HFП	QE	Вярно	Вярно	Вярно
(3+) пол.	HFП	QE	QE	Вярно	Вярно

Правилно разчетен препарат се оценява на 20 точки. При допускане на допусочените грешки се получават по-малък брой точки, както следва:

QE – Количествена грешка (в две степени) – 10 точки

LFP – Ниско фалшиво положителна грешка, когато негативна натривка грешно се разчита като 1-9 КУБ / 100 зрителни полета – 10 точки

LFN – Ниско фалшиво отрицателна грешка, когато натривка с 1-9 КУБ/ 100 зрителни полета, грешно се разчита като негативна – 10 точки

HFП – Високо фалшиво положителна грешка, когато негативна натривка грешно се разчита като позитивна от (1+) до (3+) – 0 точки

HFN – Високо фалшиво отрицателна грешка, когато от (1+) до (3+) позитивна натривка грешно се разчита като негативна – 0 точки

При допуснати т. нар. големи грешки (HFN - високо фалшиво отрицателна грешка и HFП - високо фалшиво положителна грешка), т.е. е направена погрешна микроскопска оценка – положителен препарат се докладва като отрицателен и обратно, работата в контролираната лаборатория се оценява като незадоволителна, тъй като в тези случаи последствията за пациентите са особено тежки.

3.3.1.1. Външна оценка на качеството на микроскопското изследване за КУБ чрез сляпо препрочитане на микроскопски препарати

Освен чрез „панелно тестване” външната оценка на качеството на микроскопското изследване за КУБ се осъществява и чрез т. нар. „сляпо препрочитане” на микроскопски препарати. По предварително определен график от всяка от контролираните лаборатории се набират определена половингодишна извадка от положителните и отрицателните микроскопски препарати, регистрирани в лабораторния журнал на контролираната лаборатория. Оценката се извършва съобразно същите критерии за оценка на качеството на микроскопското изследване за КУБ, представено в Таблица 2. Осъществява се обратна връзка с цел разрешаването на проблемите в контролираната лаборатория.

3.3.2. Външна оценка на качеството на културелното изследване за туберкулоза

До заявите предварително участието си лаборатории се изпращат специален комплект от 5 проби с известни за НРЛ ТБ резултати. Той съдържа набор от *M. tuberculosis complex*, нетуберкулозни микобактерии, както и отрицателни за микобактерии проби. Отговорите се изпращат до НРЛ ТБ, в предварително определени срокове и резултатите се съобщават, както при външната оценка на микроскопското изследване за КУБ. Контролът има за цел да провери техниката на деконтаминация, инокулация, култивиране, интерпретация и даване на окончателен резултат в хода на културелното изследване за туберкулоза.

3.3.3. Външна оценка на качеството на теста за определяне на лекарствената чувствителност на щамове *M. tuberculosis complex*.

Лабораториите, извършващи ТЛЧ на щамове *M. tuberculosis complex*, трябва да определят лекарствената чувствителност на набора от 5 щамове, изпратените от НРЛ ТБ. Те трябва да се тестват към противотуберкулозните лекарства от първи ред – Стрептомицин, Изониазид, Рифампицин, Етамбутол. Тестването на Пиразинамид се осъществява само от лаборатории с автоматизирана система. Отговорите се изпращат до НРЛ по туберкулоза, в предварително уговорени срокове, и резултатите се съобщават както при външната оценка на микроскопското изследване за КУБ.

4. Управление на работата и въвеждане на унифицирани форми за цялата страна

Регистрацията на лабораторните данни и предаването им на клиницистите е всъщност предоставяне на цялата лабораторна информация, която ще позволи подобряване на управлението на НРТ на всички нива.

Регистрацията, обработването и съхранението на лични данни на пациентите се извършва при спазване на Закона за защита на личните данни.

Щателната регистрация на всички получени проби, движението на всяка проба в лабораторията, резултатите от лабораторните изследвания и проби, изпратени в по-високо ниво лаборатория за културелно изследване или антибиограма, се явява важен показател за доброто изпълнение на стратегията за контрол на туберкулозата.

Стандартната регистрация трябва да бъде проста, да има практическо значение и да фиксира само основна информация. При проверка на място контролиращият трябва да оцени: качеството на работата, да провери бланките-направления за изследванията, лабораторния журнал, и резултатите от лабораторните изследвания за пълна и своевременно фиксирана информация. Всички данни трябва да бъдат достоверни и унифицирани.

4.1. Стандартни методи на работа

Лабораторията трябва да разполага с писмени инструкции с правилата на работата и описание на процедурите, както и на санитарната обработка на материали и прибори; документи за профилактично обслужване на лабораторната апаратура. Точното описание на всяка използвана методика трябва да се съхранява на достъпно място. Ако в тези документи се внасят някакви корекции, трябва да се посочи датата на модификацията и основанията за това, с подпис от ръководителя на лабораторията. Всички лабораторни записи трябва да се съхраняват в течение на 5 години.

4.2. Бланки – направления за лабораторно изследване

Тези бланки с точно посочено искане за конкретно микробиологично изследване трябва да съпътстват постъпващата в лабораторията проба. Данните трябва да бъдат пълни и четливо попълнени.

4.3. Лабораторен журнал за микробиологично изследване за туберкулоза.

Този журнал се попълва от лаборанта или друг специалист от лабораторията, провеждащ изследванията. В лабораторния регистър трябва да бъдат записани данните за всеки пациент, суспектен за туберкулоза:

4.3.1. Пореден номер;

4.3.2. Дата на постъпване на клиничния материал;

4.3.3. Вид на получения материал;

4.3.4. Трите имена, пол и възраст на пациента;

4.3.5. Целта за изследване: диагноза, проследяване или контактен;

4.3.6. Резултати от микроскопското и/или културелното изследване;

4.3.7. Резултати от ТЛЧ;

4.3.8. Резултати от тестовете за идентификация на *M. tuberculosis*;

4.3.9. Дата на издаване на резултата от изследването;

4.3.10. Фамилия и подпис на ръководителя на лабораторията, отговорен за проведеното изследване.

4.4. Бланки – резултати от лабораторно изследване

Тези бланки съдържат резултатите от микроскопското, културелното изследване ТЛЧ.

4.5. Журнал за регистрация на извънредни произшествия в лабораторията

Този журнал се води от ръководителя на лабораторията и трябва да съдържа подробна информация за всички извънредни произшествия в лабораторията и описание на предприетите мерки за разрешаването им. В него трябва да се регистрират:

4.5.1. Датата на произшествието;

4.5.2. Фамилията на лабораторния сътрудник, с който е станало произшествието;

4.5.3. Точно описание на произшествието;

4.5.4. Номер на пробата по лабораторния журнал, с която е свързано произшествието;

4.5.5. Проведени мероприятия по ликвидация на последствията.

Всяко съобщение за извънредно произшествие трябва да бъде подписано от ръководителя на лабораторията, както и от сътрудника, отговорен или свидетел на произшествието.

5. Лабораторна хигиена и техника на безопасност, дезинфекционни разтвори, унищожаване на отработените материали

Проучвания на СЗО показват, че рискът от туберкулозна инфекция при работещите в микробиологичните лаборатории е от 3 до 5 пъти по-голям в сравнение с хората в останалата популация. Изключително тежките последствия при заразяване с щамове *M. tuberculosis* с множествена лекарствена резистентност и нарастване на честотата на инфекциите с HIV увеличават опасността за работещите в диагностичните лаборатории. Това налага необходимостта от стриктно спазване на правилата за техника на безопасност в процеса на микробиологичната диагностика.

Наредба № 4 от 2002 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа ги класифицира в 4 рискови групи в зависимост от нивото на риск от инфекция. *M. tuberculosis* се отнася към група 3 – „Биологични агенти, които могат да причинят заболяване у хората и да представляват сериозна опасност за работещите, възможен е риск за разпространяване на

заболяването в обществото, но обикновено има ефективна профилактика или средства за лечение”.

Заразяването на лабораторния персонал може да се осъществи по аерогенен път. Инфекциозните частици попадат във въздуха на лабораторията в резултат на извършваните процедури, водещи до образуване на аерозоли. След изсъхване на влажните капки, намиращи се в аерозола, се образуват малки частици с диаметър 1-5 µm, които могат да се запазят във въздуха в продължение на няколко часа.

5.1. Риск от заразяване, свързан с методиката на работа

5.1.1. Риск при вдишване на инфектирани частици

Аерозоли се образуват при изпълнението на следните процедури:

5.1.1.1. Вземане на храчки от пациенти

Нерядко пациентите, съмнителни за туберкулоза, се изпращат за даване на хранка непосредствено в самата микробиологична лаборатория. Тази практика увеличава риска при контакта на лабораторния персонал с инфекциозния аерозол, образуващ се по време на събирането на материала. Основната препоръка към пациента е да не отхвърча в самото помещение на лабораторията, а в специална стая за даване на хранка или на открито, където концентрацията на туберкулозните микобактерии ще бъде по-ниска и въздействието на преките слънчеви лъчи ще оказват бактерициден ефект

5.1.1.2. При отваряне на контейнера с материал

Рискът е особено голям, ако изтича материал по външната стена на гърлото на контейнера и вътрешната винтова част на капачката или ако непосредствено преди отварянето контейнерът е бил разтърсван при транспортирането.

5.1.1.3. Добавяне на деконтаминант към пробата

Добавянето на деконтаминанта към хранката трябва да бъде изключително внимателно и никога епруветката да не се разклаща без предварително да бъде поставена винтовата капачка. След завършване на процеса по деконтаминация трябва много внимателно да се отсипе съдържанието на контейнера в съд с подходящ дезинфектант. Целта е да се предпази работното пространство от разпръскване на аерозол.

5.1.1.4. Манипулации с йозето

С йозето трябва да се работи също изключително предпазливо, като биомасата се изважда бавно и много внимателно, без да се докосват стените на епруветката. Предпочита се работа с йозета за еднократна употреба. Поставянето на непочистени от остатъчен материал йозета на върха на пламъка на спиртната лампа може също да доведе до разпръскване на аерозол.

5.1.1.5. Работа с пипети

Никога не трябва да се отпипетира с уста. Това е опасно не само, защото може да се аспирира инфекциозен материал, но и поради факта, че при изтегляне и връщане на течността с пипетата се образува аерозол. Този аерозол би могъл да проникне в белите дробове на лаборанта, защото носят му в това време се намира над съда, от който се отпипетира. Пипетирането трябва да осъществява с пипетор.

5.1.1.6. Центрофугиране

Препоръчва се работата само с антиаерозолна центрофуга. Кошниците с антиаерозолни капаци с центрофугирания материал се натоварват и разтоварват само в ламинарния бокс, като капациите се отварят изключително внимателно. При центрофугиране е задължително доброто балансиране на епруветките и тяхното херметично затваряне с винтовата капачка с цел да се избегне счупване или отваряне на епруветка и образуване на невидим за око облак от опасен аерозол.

5.1.2. Риск от поглъщане на инфектирани частици

Това може да се случи при засмукване с пипета (както е отбелязано по-горе) или при облизване на пръсти, докоснали замърсени повърхности. При разгръщане на лабораторни журнaли, лабораторни форми и документация, пръстите не трябва да се наслончват или да се поставят в устата.

5.1.3. Риск от инокулация на инфектирани частици

Случайното убождане с игла на спринцовка е много често произшествие в лабораторията. Поради тази причина СЗО препоръчва да не се използват технологии с употреба на игли и спринцовки, и в никакъв случай те да не се използват като заместители на пипети. Трябва да се внимава за порезни наранявания със счупени предметни стъкла или замърсена лабораторна стъклария.

Дори най-скъпо струващото и съвременно оборудване не може да замени точното изпълнение на правилата за техниката на безопасност и внимателното отношение към всяка процедура, извършвана в микробиологичната лаборатория.

5.2. Основни изисквания към правилата за техниката на безопасност в микробиологичните лаборатории

5.2.1. Свеждане до минимум възможността за образуване и разпространение на аерозоли в лабораторията;

5.2.2. Предотвратяване попадането на аерозоли в дихателните пътища на лабораторните специалисти;

5.2.3. Предотвратяване възникването на инфекция вследствие на случайна инокулация или поглъщане на заразен материал.

5.2.4. Намаляването на риска от заразяване в микробиологичните лаборатории се постига чрез административни мерки, включващи:

5.2.4.1. Ограничаване броя на работещите, които са или могат да бъдат експонирани;

5.2.4.2. Организиране на работните процеси и предприемане на технически мерки, така че да се избегне или сведе до минимум контаминирането на работното място с биологични агенти;

5.2.4.3. Осигуряване на колективни и лични средства за защита;

5.2.4.4. Хигиенни мерки с цел опазване или намаляване възможността от случайно пренасяне или контаминиране на работното място с биологичен агент;

5.2.4.5. Употреба на знак за биологичен риск, съгласно Наредба № РД-07/8 от 2008 г. за минималните изисквания за знаци и сигнали за безопасност и/или здраве при работа, (обн. ДВ, бр. 3 от 13.01.2001 г.);

5.2.4.6. Съставяне на план за действие при аварии, свързани с биологични агенти, който включва и план за спешни действия за опазване на работещите от експозиция на биологичен агент при технически инцидент;

5.2.4.7. Осигуряване на средства за безопасно събиране, съхранение и унищожаване на отпадъци, когато е необходимо, и след съответна обработка, както и употреба на обезопасени и обозначени контейнери;

5.2.4.8. Мероприятия за безопасно боравене и пренасяне на биологични агенти на работното място.

5.3. Изисквания към микробиологична лаборатория, работеща с *M. tuberculosis* – трето ниво на риск

5.3.1. Достъп

5.3.1.1. На вратата на лабораторията се поставя международният знак за биологичен риск.

5.3.1.2. Влизането в работните помещения е разрешено само за пряко ангажирания в работния процес лабораторен персонал;

5.3.1.3. Вратите на лабораторията се държат затворени;

5.3.1.4. Достъпът на странични лица и особено на деца е забранен.

5.3.2. Лични предпазни средства

5.3.1. Работното облекло включва: панталон, работни чехли, туника и престилка с дълъг ръкав със задно закопчаване (завързване). Работните чехли задължително са затворени. Лабораторията не се напуска с работно облекло. Ежеседмично то се носи за пране след предварително автоклавиране. Подсигурява се работно облекло за специални посетители на лабораторията, както и за персонала, отговарящ за техническата поддръжка.

5.3.2.2. Респираторни маски от типа FFP2 и FFP3 се ползват от работещите в лабораториите от второ и трето ниво. Те осигуряват допълнителна защита при извършваните процедури по време на културелното изследване и тестване на чувствителността към туберкулозостатици. Респираторите са леки, с капацитет на филтриране на частици с големина 0,3-0,4µm и прилепват плътно към лицето. Ефективността на филтриране е от 95% до 98% за частици, по-големи от 0,3µm. Необходимо е инструктиране за правилното им използване. Обикновените хирургични маски не осигуряват защита от инхалиране на аерозоли. Те са предназначени за носене само от пациентите с цел задържане на големите влажни капки, които се отделят при издишване.

5.3.2.3. Ръкавиците са задължителни при работа. При съществуващи наранявания на ръцете, след измиването им се поставя водонепроницаем лейкопласт върху нараняването и след това се поставят ръкавиците. Понякога те осигуряват фалшива защита и могат да представляват опасност за останалия персонал. Всеки лабораторен специалист с ръкавици предпазва себе си и в същото време може да е опасен за останалата част от персонала, ако със замърсените ръкавици хваща кранове на чешми, врати, телефони, шкафови и др. Ръкавиците се сменят при всяко прекъсване на извършваната процедура. Тъй като гумените ръкавици не са херметични, след свалянето им е необходимо ръцете да се измият и дезинфекцират. Широко се използват латексови, винилови и нитрилови ръкавици с различни размери. При евентуална алергия към латексовите протеини и талка се осигуряват хипоалергични ръкавици.

5.3.2.4. Работните очила се препоръчват при работа с химикали. Те предпазват очите и лицето от евентуално изпръскване при случаен инцидент. За по-надеждна защита се препоръчват очила, които прилепват плътно към лицето.

5.3.3. Колективни предпазни средства

5.3.3.1. Ламинарни боксове

Ламинарните боксове са най-важното оборудване, осигуряващо безопасна работа в лабораториите, извършващи диагностика на туберкулозата. При правилна употреба те свеждат до минимум риска от заразяване по време на работа, както и възможността за кръстосана контаминация. Високоэффективните HEPA филтри на ламинарните боксове улавят 99,97% от частиците с големина 0,3 µm и 99,99% от тези с по-големи размери, което на практика гарантира, че въздухът преминал през тях, е свободен от инфекциозни агенти. Ламинарните боксове клас 2 осигуряват циркулация на стерилен поток въздух в полето на работа и тяхното ползване е задължително при работа с микробни агенти от група 3, какъвто е *M. tuberculosis*. Всички културелни изследвания и ТЛЧ трябва да се извършват в ламинарни боксове от клас 2. Те биват 4 разновидности – A1, A2, B1 и B2. Разликите между тях са в няколко аспекта:

5.3.3.1.1. Скорост на потока въздух, постъпващ от работното помещение във вътрешността на бокса;

5.3.3.1.2. Количество на циркулиращия въздух над работната площ и този, отведен извън бокса;

5.3.3.1.3. Място на отвеждане на въздуха – в работното помещение или извън него.

5.3.3.2. Изисквания при работа с ламинарен бокс

5.3.3.2.1. Използват се техники за работа, които свеждат до минимум възможността за образуване на аерозоли;

5.3.3.2.2. Чистите материали в бокса се държат на не по-малко от 12 см от местата, където е възможно образуването на аерозоли. Така се намалява рискът от кръстосано контаминиране;

5.3.3.2.3. Не се държат отворени епруветки и флакони във вертикално положение. След извършване на съответната манипулация те се затварят веднага, за да не се допусне кръстосано контаминиране;

5.3.3.2.4. Не се използва открит пламък в бокса, тъй като се изменя посоката на ламинарния поток. За обеззаразяване на йозето се използва електрически нагревател или се работи с йозета за еднократна употреба;

5.3.3.2.5. В контейнера за изхвърляне на отпадъците се поставя оптимално количество дезинфекционен разтвор. Замърсените по време на работа отпадъци се изхвърлят в него внимателно, за да не се разплисква течността;

5.3.3.2.6. Задължително след приключване на работата за деня ламинарният бокс се дезинфекцира с туберкулоциден дезинфектант, боксът се затваря и се включва бактерицидната му лампа с необходимата експозиция, според изискванията на фирмата-производител. На следващия ден преди започване на работа той отново се дезинфекцира и отново се включва бактерицидната лампа;

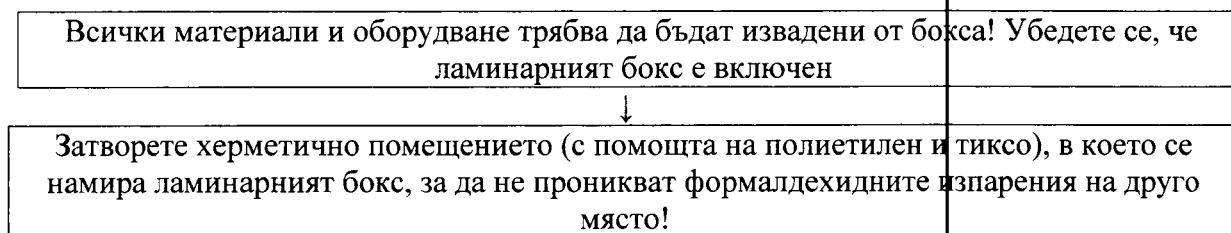
5.3.3.2.7. Боксът не се претрупва с материали. Използват се само материали, необходими за съответната манипулация, извършваща се в момента;

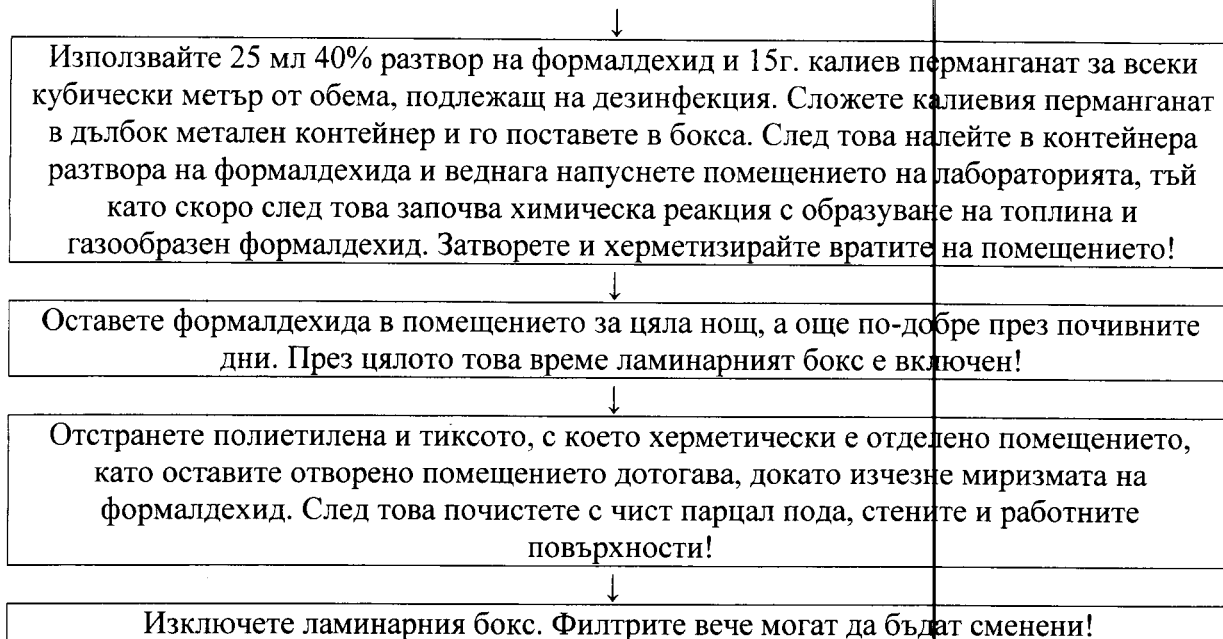
5.3.3.2.8. Всяка лаборатория трябва да има изработена стандартна оперативна процедура за поведение при инцидент в ламинарния бокс;

5.3.3.2.9. Един път годишно е необходим профилактичен преглед от оторизиран сервиз, осъществяващ поддръжката на ламинарния бокс. След замерванията може да се прецени дали НЕРА филтрите се нуждаят от подмяна;

5.3.3.2.10. Преди смяната на филтъра, която се налага по преценка на оторизирания техник от обслужващия сервиз, или при извънредно произшествие, довело до голям разлив на инфекциозен материал с образуването на аерозоли, както е посочено в т. 5.6., се налага дезинфекция на филтрите с формалдехидни пари, т.нар. опушване. Единствено в тези случаи се налагат действия по обеззаразяването на бокса съгласно Диаграма 1, т.е. филтрите след тази обработка не действат и задължително трябва да бъдат подменени.

Диаграма 1: Дезинфекция на ламинарния бокс, ако се налага смяна на филтрите





5.4. Дезинфекциращи средства

Дезинфекцията представлява профилактична дейност, която включва редица мероприятия за унищожаване на болестотворните микроорганизми във външната среда, включително и върху кожата и лигавиците на човешкото тяло. Целта на дезинфекционните мероприятия е да прекъснат механизма на предаване на инфекциите и да намалят микробната контаминация до ниво, безопасно за здравето на човека. Чрез методите на дезинфекция се унищожават всички видове микроорганизми освен споровите им форми. Високостепенната дезинфекция представлява процес, при който се унищожават, включително туберкулозните бактерии и някои бактериални спори.

M. tuberculosis е силно устойчив спрямо дезинфекциращите средства. Тази устойчивост се обяснява с високото съдържание на липиди и наличието на восъчни вещества в клетъчната стена. В хракки на болни и заразносни притежава голяма издръжливост към действието на различни дезинфектанти. В 5% разтвор на фенол и 5% разтвор на хлорамин загива след 6 часа. Парите на формалдехида и пероцетната киселина притежават значително микобактерицидно действие. Туберкулозните бактерии са чувствителни към активираният хлорни препарати – 1% разтвор на хлорамин ги унищожава след няколко минути. Глутаровият алдехид също се счита за дезинфектант с добър туберкулоциден ефект, макар че при него се наблюдава бавно действие. Ефектът на дезинфекциращите средства зависи от: количеството убити микроорганизми, използваната концентрация, времето за контакт и наличието на органичен детрит.

Най-подходящите дезинфектанти за използване в туберкулозните лаборатории са тези, които съдържат хлорни съединения, фенол и производни, алкохоли, алдехиди йодофори, окислителни. Видът на дезинфектанта обикновено се определя от вида на материала, който трябва да се дезинфектира. Изборът не трябва да е насочен непременно към „антисептици“ с приятен аромат. Не трябва да се смята, че дезинфектант, който има общо действие срещу други микроорганизми, е ефективен и срещу туберкулозните бактерии. Четвъртичните амониеви съединения не са ефективни в препоръчаните концентрации. Дезинфекционният разтвор трябва да се приготвя

всеки ден, за да бъде пресен, и не трябва да се съхранява в разтворена форма, защото се намалява активността му.

Основни групи химични препарати с туберкулоцидно действие:

5.4.1. Халогенсъдържащи

5.4.1.1. Хлорсъдържащи – притежават широк спектър на действие: бактерицидно, фунгицидно, вирусцидно, туберкулоцидно и спороцидно. Киселото рН и по-високите температури подпомагат ефекта им. Действат бързо, но се инактивират от органичната материя. Дразнят кожата и лигавиците. Нестабилни са при съхранение, особено работните им разтвори. Притежават корозивно действие и избелващи свойства. *Приложение:* Хлорамини и хипохлорит – за дезинфекция на: повърхности, бельо, съдове за хранене, предмети за обслужване на болните, екскрети и секрети. Хипохлоритът трябва да бъде използван в концентрация 1-5%, а контактното време да е 15-30 минути, в зависимост от вида и количеството на материала за дезинфекциране. Разтворите на хипохлорит (5%) са полезни при дезинфекция на материали, съдържащи органичен детрит, поради смилещото си действие

5.4.1.2. Йодсъдържащи – комплексни съединения на йода с детергенти (йодофори) с широк спектър на действие. Не дразнят кожата и се използват преди всичко като кожни антисептици. Йодофорните препарати трябва да се използват в концентрации 3-5% и контактното време 15-30 минути, в зависимост от обема и вида на материала за дезинфекция. Йодофорите са полезни при тежки разливания и за измиване на ръце.

5.4.2. Фенолни производни

Нарушават клетъчната стена и влизат в реакция с протеините/ензимите на цитоплазмата. Имат широк спектър на действие, включително туберкулоцидно. Характеризират се с добра проникваща способност. Слабо се инактивират от органични материи. Не увреждат текстил, метали и пластмаса. Фенолът трябва да се използва в концентрация 2-5%, а контактното време трябва да бъде 15-30 минути в зависимост от количеството материали, които трябва да се дезинфекцират. Фенолът може да се използва в намокрени кърпи за изтриване на работни повърхности. Това намалява пръските и аерозола при случаи на разливане.

Приложение: Дезинфекция на медицински инструментариум, бельо, текстил, лабораторна стъклария, повърхности.

5.4.3. Алдехиди

Притежават широк спектър на действие, включително туберкулоцидно. Характеризират се с висока токсичност и алергенен потенциал. Не се инактивират от органични материи. Нямат корозивни свойства. Слабо проникват и дразнят кожата и лигавиците.

Приложение: Дезинфекция на инструментариум, медицинска апаратура и термолабилни материали, за дезинфекция на помещения с формалинови пари. Глутаралдехидът няма корозивно действие и мирис. Не уврежда синтетични материали. Разтворите му слабо дразнят кожата и лигавиците. Има по-малка летливост и токсичност от формалдехида. Има широк спектър на бактерицидна активност (20-80 пъти по-голяма от тази на формалдехида), максимално изразена при рН 7.5-8.5. Прилага се за дезинфекция на инструментариум и термолабилни материали.

5.4.4. Алкохоли

Притежават добри туберкулоцидни свойства. Лесно се изпаряват, не миришат, разтварят мазнините и имат почистващо действие. В подходяща концентрация

осигуряват бърза и висока редукция на микрофлората върху кожата. Алкохолите нямат алергичен потенциал. Добре се понасят от кожата. Счита се, че изсушаването на кожата, което предизвикват, е по-слабо, отколкото при миене с вода и сапун. Етиловият алкохол е добре известен. Ефективността му е най-силно изразена при 70% концентрация. Използва се и изопропилов алкохол.

Приложение: Кожни антисептици (най-честа употреба) – самостоятелно, като съчетание от два или три алкохола или комбинирани с активни субстанции от различни химични групи. Дезинфекция на малки повърхности - използват се като концентрат върху сухи, видимо чисти повърхности. За почистване на ламинарни боксове е подходящ 70% етанол. През времето на въздействие обработваната повърхност трябва да се поддържа мокра. Етанол 70% може да се използва вместо вода за балансиране на центрофужните епруветки, с цел намаляване на риска при евентуално счупване.

5.4.5. Окислители

Окисляват жизнено важни протеини, ензими и други клетъчни метаболити и водят до необратими цитоплазмени промени. Към тази група се отнасят водородният прекис и перкиселините. Притежават силно изразени туберкулоцидни свойства. Действат в ниски концентрации при кратки експозиции. По-безвредни са за персонала, не фиксират биологичните материи, почистват и обеззаразяват лабораторната стъклария, без да я замъгляват.

Приложение: дезинфекция на лабораторна стъклария, дезинфекция на медицинска апаратура, инструментариум, повърхности

Внимание! Всички дезинфектанти са токсични и неправилната им употреба води до респираторни проблеми, кожни обриви и конюнктивити! Ако се използват правилно, те са безопасни и ефективни.

Дезинфекционните препарати се съхраняват при подходяща температура и в подходяща складова база, с което се гарантира тяхната стабилност.

Всяка лаборатория, която извършва диагностика на туберкулоза, трябва да има разработен план за дезинфекция на най-важните обекти с епидемиологично значение: ръце и кожа, лабораторна стъклария, повърхности, секрети и екскрети на болния, работно облекло, специална медицинска апаратура.

Дезинфекционните обработки се извършват само с биоциди, за които има издадено разрешение за пускане на пазара от министъра на здравеопазването. При прилагането им следва да се вземат под внимание тяхното предназначение и указанията за работа на производителя.

Обеззаразяването на епидемиологично значимите обекти се организира и ръководи от епидемиолог или определено от ръководителя на лечебното заведение лице.

5.5. Унищожаване на отработените материали

Според Закона за управление на отпадъците и Наредба № 1 от 2015 г. за изискванията към дейностите по събиране и третиране на отпадъците на територията на лечебните и здравните заведения (обн., ДВ, бр. 13 от 17.02.2015 г.), отработените материали от туберкулозните лаборатории се класифицират като опасни отпадъци.

Опасните отпадъци трябва да бъдат разделно събирани в лабораторията, етикирани и „цветно кодирани”. СЗО препоръчва за инфекциозните отпадъци жълт цвят на контейнера.

Инфекциозните отпадъци трябва да бъдат събирани в устойчиви на късане, непроницаеми и добре запечатани контейнери. Те трябва да бъдат транспортирани до

централното складово съоръжение без прехвърляне и сортиране, като не се допуска ненужен контакт с персонала и други лица. Транспортните средства трябва да бъдат конструирани така, че да не позволяват разсипването им и да са изработени от материали, позволяващи обработка с почистващи препарати. Отпадъците трябва да се съхраняват възможно най-кратко време в специални помещения при температура по-ниска от 15°C не повече от 1 седмица.

Основният риск при медицинските отпадъци е свързан с тяхната инфекциозност. Автоклавирането и микровълновото обеззаразяване са основни процеси за предварително третиране на тези отпадъци, в резултат на които се унищожават инфекциозните биологични организми. Автоклавирането може да бъде извършено и в самата лаборатория, като обработените материали задължително подлежат на изгаряне. Изгарянето (в лицензиран инсинератор) е основен метод за обезвреждане на опасните отпадъци. Чрез изгарянето могат да бъдат постигнати: унищожаване на патогенните микроорганизми; намаляване обема и количеството на отпадъците, колкото е възможно по-голямо намаляване на потенциалните опасности, присъщи на отпадъците; привеждане на остатъчните количества във форма, подходяща за депониране.

5.6. Действия при извънредни произшествия в лабораторията

Винаги съществува възможност за настъпване на извънредни произшествия. Най-добрата защита при несчастни случаи в лабораторията е щателно обмисленият план за максимална оперативна и ефективна неутрализация на опасните последствия от произшествието. Нито едно произшествие не бива да се счита за незначително. Всеки път е необходимо правилно да се оценят неговите мащаби и последствия, за да се предприемат необходимите стъпки. В лабораторията винаги трябва да има готовност за възможно произшествие и да са на разположение необходимите средства – достатъчно количество попиваща (филтърна) хартия, дезинфекционен разтвор, респираторни маски.

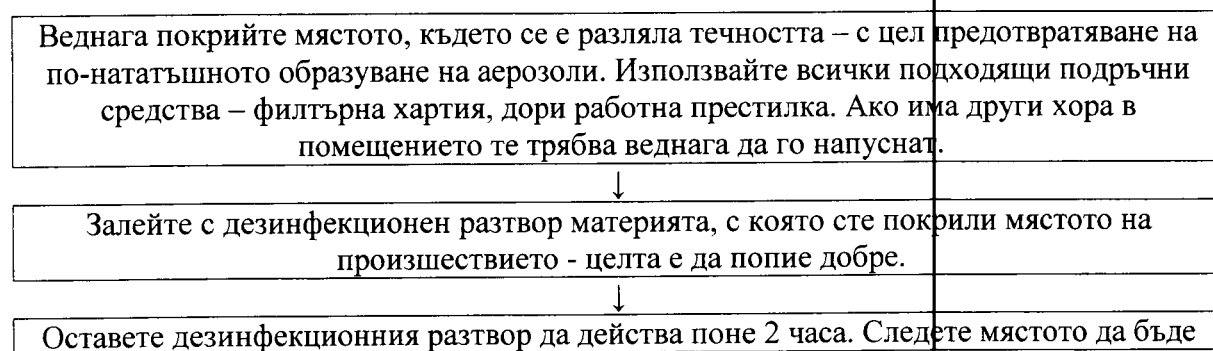
Възможните произшествия в лабораториите могат да бъдат разделени на два типа:

5.6.1. При образуване на опасни аерозоли в ограничен обем.

5.6.2. Когато във въздуха на работното помещение попада голямо количество инфектиран аерозол.

Ограничен обем аерозоли може да се отдели при счупване на епруветка с култура на твърда хранителна среда или при счупване на контейнер с хранка за изследване. В тези случаи твърдата хранителна среда и гъстата консистенция на хранката възпрепятстват попадането в аерозола на туберкулозните микобактерии. Планът на действие в случай на такова произшествие е показан на Диаграма 2.

Диаграма 2: План на действие при образуване на аерозоли в ограничен обем инфектиран аерозол



през цялото време влажно. Включете бактерицидната лампа в помещението и излезте от него.



Съберете всички парчета от счупената епруветка или контейнер, както и материала, който сте обработили, и го поставете в подходящ съд, за да бъде унищожен, т.е. автоклавиран



Обработете пода и работните повърхности с дезинфекционен разтвор

Потенциално замърсяване с голям обем аерозоли може да настъпи при счупване на една или няколко епруветки с течност, в която се съдържа много голямо количество туберкулозни бактерии, например бактериална суспензия, или при лошо уравновесена центрофужна епруветка. Планът на действие в случай на такова произшествие е показан на Диаграма 3.

Диаграма 3: План на действие в случай на образуване на голям обем инфектиран аерозол

Целият персонал веднага трябва да напусне помещението, където се е случило произшествието.



Закрийте всички изходящи вентилационни отвори, ако има такива.



При наличен генератор за диспергиране на дезинфекционен разтвор, го включете и не го изключвайте поне 2 часа. Ако не разполагате с такъв, действайте както в Диаграма 2



Преди да влезете отново в помещението, си сложете респиратор, предпазни очила и още една престилка над работната ви престилка

По същия начин аерозоли биха могли да се образуват и в ламинарния бокс, в 2 варианта – в ограничен и в голям обем, с посочен план на действие в Диаграма 4 и Диаграма 5.

Диаграма 4: План на действие при образуване на аерозоли в ламинарния бокс в ограничен обем

Веднага покрийте мястото, където се е разляла течността – целта е да се предотврати по-нататъшното образуване на аерозоли. Използвайте всички подходящи подръчни средства – филтърна хартия, дори работна престилка. Ако има други хора в помещението те трябва веднага да го напуснат.



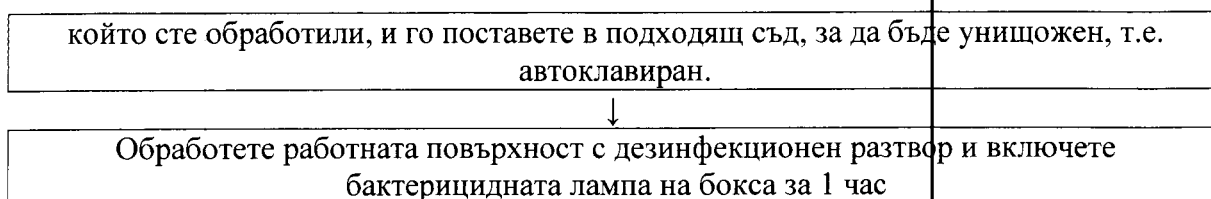
Залейте с дезинфекционен разтвор материята, с която сте покрили мястото на произшествието - целта е да попие добре.



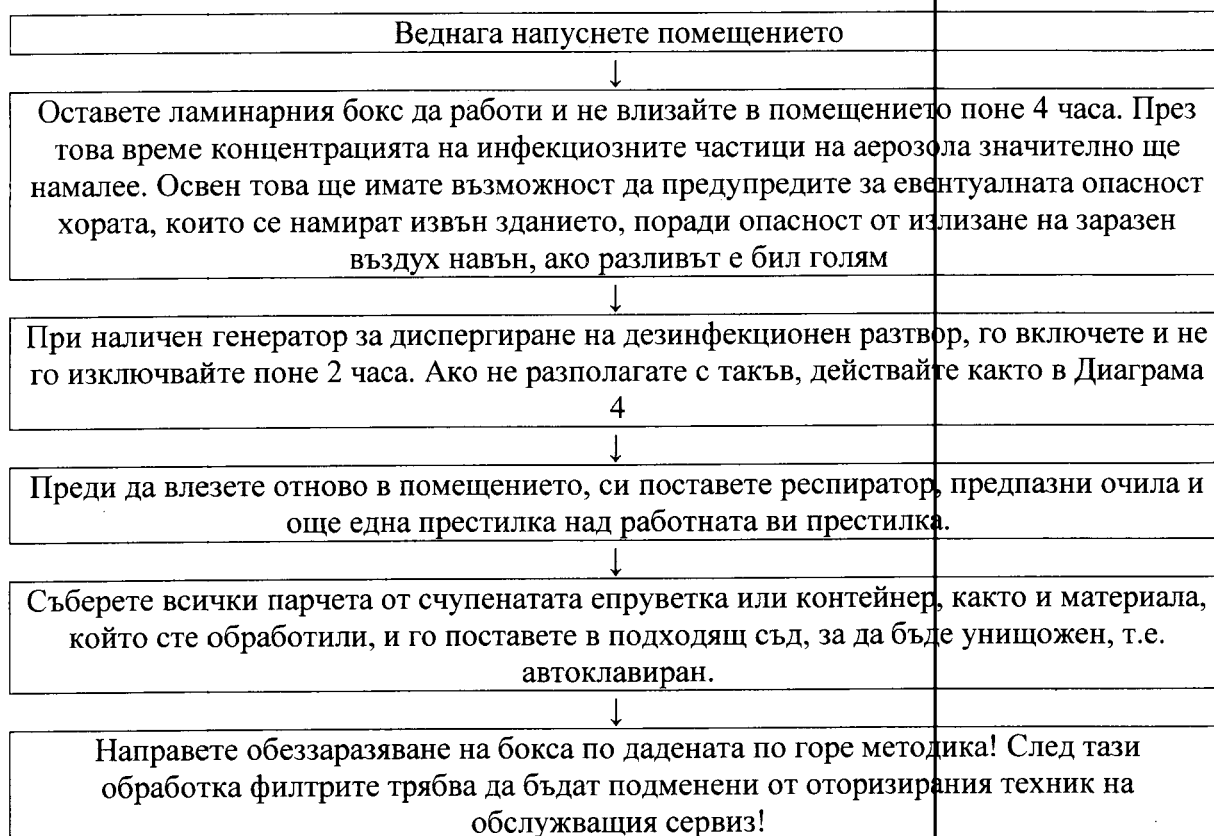
Оставете дезинфекционния разтвор да действа поне 2 часа, за да може значителна част от инфекциозните частици да се поемат от филтъра. Оставете ламинарния бокс да работи и не влизайте в помещението поне 2 часа



Съберете всички парчета от счупената епруветка или контейнер, както и материала,



Диаграма 5: План на действие при образуване на аерозоли в ламинарния бокс в голям обем



6. Мониториране на здравето на лабораторните служители

Заразяването с туберкулоза, включително с нейната мултирезистентна форма, представлява общопризнат риск за лабораторните специалисти. При повечето хора инфектирането с *M. tuberculosis* не преминава в туберкулозно заболяване, тъй като при нормално функционираща имунна система клетъчният имунитет спира репликацията на туберкулозния микобактерий. При редица състояния, (напр. заразяване с ХИВ), се стига до намаляване броя на Т-хелперните лимфоцити, което води до снижаване на имунната защита и по този начин се увеличава рискът от заболяване от туберкулоза.

За да се инфектира човек и за да се развие заболяване от туберкулоза, е необходим тесен и продължителен контакт с причинителя. При това във външната среда трябва да има голямо количество туберкулозни микобактерии, а новозаразилият се трябва да е с намалена имунна защита към тази инфекция.

Подборът на лабораторни сътрудници: лекари, лаборанти и санитари, трябва да е много внимателен. Те не трябва да имат соматични и психични заболявания и да водят относително здравословен начин на живот. Доколкото се спазват определени лабораторни техники за изпълнение на лабораторните процедури и на техниката на

безопасност, следва да се осъществява програма за контрол на здравословното състояние на персонала. Всеки лабораторен сътрудник трябва да има карта за здравословното му състояние, в която да се записват резултатите му от проведените изследвания за туберкулоза, при спазване на принципа за конфиденциалност.

Програмата за мониториране на здравето на лабораторните сътрудници включва следните елементи:

6.1. Здравословно състояние на лабораторния сътрудник до постъпване на работа

Всеки новопостъпил сътрудник трябва да попълни стандартна анкета за здравословното си състояние. В тази анкета трябва да се даде информация за наличие/отсъствие на заболяване от туберкулоза в миналото, за имунизация с БЦЖ, наличие на съпътстващи заболявания, които могат да повишат възприемчивостта към туберкулоза, както и за анамнестични данни за контакти с туберкулозно болни. Примерна схема за анкета за здравословното състояние на лабораторните сътрудници е представена в Приложение № 5.

Преди започване на работа е необходимо да се направят рентгенография на гръден кош и кожна проба на Mantoux. При наличие на положителна реакция – с диаметър на инфилтрат над 15 мм (при БЦЖ-ваксинирани), или на симптоми за туберкулоза, е необходимо да се проведат клинични и микробиологични изследвания (поне на 2 последователни храчки). На всички лабораторни сътрудници трябва да бъде предложен тест за ХИВ. Не се препоръчва провеждане на БЦЖ-ваксинация за профилактика.

6.2. Ежегоден мониторинг на здравословното състояние на лабораторните сътрудници

Всички лабораторни сътрудници трябва да съобщават за ранни признаци на заболяването: кашлица, продължаваща повече от 3 седмици (при изключване на други причини за това), намаляване на телесното тегло, безапетитие, нощни изпотявания, чести простудни заболявания през последните няколко седмици. По време на периодичните прегледи трябва да се следи телесното тегло и при загуба над 10% за последното тримесечие трябва да се направят щателни клинични и микробиологични изследвания за туберкулоза.

6.3. Мониторинг на здравословното състояние след контакт с *M. tuberculosis*

Ако лабораторен сътрудник е станал участник в извънредно произшествие в лабораторията, е необходимо проследяване на неговото здравословно състояние. Осем седмици след произшествието е необходимо да се проведе рентгенография на гръден кош и проба на Mantoux, ако преди постъпването на този служител резултатът от пробата на Mantoux е бил под 10 мм.

7. Материали за микробиологично изследване за туберкулоза. Транспорт на инфекциозен материал

7.1. Изисквания към материалите за изследване на туберкулоза

Правилно взетите материали за изследване и техният транспорт до микробиологичната лаборатория са от изключителна важност за успешното доказване на микобактериите, поради което е необходимо да се спазват следните изисквания:

7.1.1. Материалите да са репрезентативни за туберкулозния процес, т.е. да произхождат от мястото на инфекцията;

7.1.2. За осигуряване на оптимална микробиологична диагноза е задължително да се изследват три последователни проби. Ако биологичният материал е храчка, поне

една от пробите трябва да бъде дадена от пациента сутрин след събуждане, тъй като тази порция материал съдържа най-голямо количество КУБ;

7.1.3. За микроскопско и културелно изследване се използва на една и съща порция материал, т.е. не се дават една хрчка за микроскопско и друга за културелно изследване;

7.1.4. В случаите на изследване с диагностична цел пробите да бъдат взети преди началото на противотуберкулозното лечение;

7.1.5. Да са в достатъчно количество (3-5 мл);

7.1.6. Вземането на материалите се извършва със стерилни инструменти, като се избягва риска от допълнителна контаминация. Телесни течности от стерилни области (ликвор, кръв, синовиална, плеврална, перикардна течност, костен мозък и др.) се вземат при спазване на правилата на асептиката;

7.1.7. Към пунктати, съдържащи фибриноген (перикарден, плеврален, ставен, перитонеален и др.) се добавя антикоагулант – хепарин в количество 0,2 мг/мл;

7.1.8. Взетите материали се транспортират незабавно в микробиологичната лаборатория;

7.1.9. Допустимо е съхранение в хладилник при температура 4-8°C до 72 часа.

7.1.10. Взетите материали се поставят в стерилни контейнери за еднократна употреба.

7.2. Изисквания към контейнерите за събиране на материалите за изследване:

7.2.1. Да са стерилни, с вместимост 20-50 мл;

7.2.2. Да са за еднократна употреба и с винтова капачка;

7.2.3. Да са прозрачни, за да може да се оцени количеството и качеството на материала, без да се отваря капачката;

7.2.4. За удобство на пациента е необходимо да са с широко гърло – с диаметър не по-малко от 35 мм за контейнери за хрчки и урини;

7.2.5. Материалът, от който са изработени контейнерите, да не е лесно чуплив, за да са надеждна защита за транспортираните материали;

7.2.6. Да са от материал, който е удобен за маркиране.

7.3. Видове материали за изследване:

В зависимост от локализацията на туберкулозния процес се изследват следните видове материали:

7.3.1. Материали от дихателната система: хрчка, индуцирана хрчка, бронхоалвеоларен лаваж, трахеален аспират, трансторакална аспирационна биопсия.

7.3.2. Материали от храносмилателната система: стомашни промивни води, фецес.

7.3.3. Материали от отделителната система: урина.

7.3.4. Материали от половата система: еякулат, менструална кръв, интраоперативни аспирати и тъканни проби.

7.3.5. Материали от кожа и меки тъкани: раневи секрети, тъканни частици от порезни рани и биопсия.

7.3.6. Материали от затворени кухини: плеврален пунктат, перикарден пунктат, перитонеален пунктат, ликвор, ставен пунктат, кръв ва хемокултура (само при наличие на подходяща хранителна среда и апаратура).

7.3.7. Други материали: гной от студен абсцес, пунктат от лимфен възел, трупни материали.

7.4. Изисквания към най-често изследваните материали за туберкулоза:

7.4.1. Храчка

В рутинната диагностика на туберкулозата най-широко застъпено е изследването на храчка. За получаване на отличен резултат е необходимо да се спазят следните условия:

7.4.1.1 Медицински служител трябва да обясни на пациента с каква цел се иска отделянето на храчка;

7.4.1.2. Храчката се взема под контрола на медицински служител;

7.4.1.3. Пациентът се информира, че материалът трябва да е от дълбочината на трахео-бронхиалното дърво, дава се след дълбока експекторация, т.е. слюнката не е подходяща за микробиологично изследване;

7.4.1.4. Събира се сутрешна храчка преди закуска, след почистване на зъбите, ако е необходимо, след сваляне на протезите и след щателно изплакване на устата с топла вода;

7.4.1.5. Пациентът допира контейнера до долната си устна и отхрачва внимателно в него, като не трябва да се замърсява контейнера отвън;

7.4.1.6. Оптималният обем на отделената храчка трябва да е 3-5 мл, но всеки обем, колкото и малък да е той, може да бъде изследван;

7.4.1.7. Отхрачването може да се провокира с инхалации с топъл хипертоничен разтвор – индуцирана храчка. Индуцираната храчка по външен вид напомня много на слюнка. За да не бъде сбъркана в лабораторията със слюнка, на съпроводителното писмо ясно и четливо да бъде записано: „индуцирана храчка“;

7.4.1.8. Ако е възможно, процедурата се извършва в специално приспособено за целта помещение;

7.4.1.9. В стаята за вземане на материали влиза само един пациент;

7.4.1.10. При отделяне на слюнка медицинският служител трябва да помоли пациента отново да се опита да отдели храчка;

7.4.1.11. Подходящата за микробиологично изследване храчка съдържа предимно бронхиален секрет и минимални количества секрет от устната кухина. Има мукоиден или мукопурулентен вид и обем 3-5 мл. Не трябва да се изследва слюнка, защото води до фалшиво отрицателни резултати, които могат да имат неблагоприятни последици за правилното поставяне на диагнозата;

7.4.1.12. Културелното изследване се извършва от същата проба, от която е изготвен микроскопският препарат;

7.4.1.13. Храчката е типичен пример за нестерилен материал и се подлага на всички описани по-долу етапи на предварителна обработка в следния ред: хомогенизация, деконтаминация, концентрация.

7.4.2. Плеврален пунктат

Оптимален обем: 5-10 мл., в стерилен контейнер с предварително поставен хепарин (0,2 мг/мл течност). Предварителната обработка включва концентрация на 3000 хг за 30 мин. Ако е взет асептично, не се подлага на деконтаминация и ресуспендираният седимент се инокулира направо в 2 епруветки среда на Lowenstein-Jensen и 1 епруетка с течна хранителна среда. Ако се предполага замърсяване, пробата след първоначалната концентрация се подлага на деконтаминация. По същия начин се обработват ставни и перикардиални пункти.

7.4.3. Бронхоалвеоларен лаваж (БАЛ)

При невъзможност на пациента да отдели храчка бронхиалните промивни води се вземат по време на бронхоскопия в обем 5-10 мл, в стерилен контейнер, без хепарин. При вземане на протектиран БАЛ не е необходима деконтаминация, а само

концентрация. При наличие на неспецифична бактериална флора в БАЛ след първоначално центрофугиране на 3000 xg за 30 мин. се извършва деконтаминация.

7.4.4. Стомашни промивни води (лаваж)

Тази процедура се прилага най-често при деца, тъй като те не могат да отхрочват и гълтат храните. Провежда се сутрин на гладно, преди раздвижване на детето. Материалът се изследва до 4 часа след вземането му. Ако това е невъзможно, на пациента се осигурява стерилен контейнер с 100 mg натриев бикарбонат (сода за хляб). Не е необходимо деконтаминиране, ако материалът е взет асептично в стерилен контейнер.

7.4.5. Урина

Необходими са минимум 40-50 мл от средна порция на първата сутрешна урина. Не се препоръчва 24-часова урина поради високата контаминация, експесивното разреждане и трудностите при концентрацията. Една порция урина не е достатъчна за поставяне на етиологичната диагноза. Препоръчва се изследването на взети в три последователни дни първа сутрешна порция урина. Предварителното изследване за неспецифична бактериална флора е препоръчително. Ако урината е стерилна, тя може да се посее директно, без деконтаминация след центрофугиране на 3000 xg за 30 мин. Желателно е за туберкулоза да се изследва стерилна урина, защото тя е материал с ниско съдържание на туберкулозни бактерии и предварителната обработка трябва да бъде максимално щадяща. Директен микроскопски препарат по Ziehl-Neelsen не се прави (както поради малкия брой туберкулозни бактерии, така и поради това, че при попадане на *M. smegmatis* – нормален обитател на външните полови органи, който също е киселиноустойчив може да подведе специалиста. Ако урината съдържа неспецифична бактериална флора, добре е да се подходи според вида на флората и количеството ѝ. Така може да се прецени кой е най-подходящият, максимално щадящ деконтаминант (2% или 4% NaOH, оксалова киселина при персистирание на *Proteus sp.* или *Pseudomonas sp.*)

7.4.6. Кръв

Хемокултури могат да бъдат направени само при наличие на подходящи среди, както и на автоматизирани системи BacT/ALERT или BacTec за хемокултури. Изискванията за вземане на кръв трябва да са съобразени с указанията на фирмата-производител на хранителните среди. Според препоръките на СЗО се изследва само от болни със СПИН.

7.4.7. Фецес

Според препоръките на СЗО се изследва само при болни със СПИН. Посявка може да бъде направена във всяка лаборатория, осъществяваща културелна диагностика на туберкулозата. В лабораторията материалът се залива с дестилирана вода в стерилен съд (1г изпражнения + 5мл дестилирана вода) и се разбърква добре. Остава се да се утаи и се работи с над-утаечната течност. Деконтаминацията се извършва както при хранка или с оксалова киселина.

7.4.8. Менструална кръв

При индикации, преценени от гинеколог. Взема се в стерилен контейнер, в лабораторията се залива със стерилна дестилирана вода и след хемолизата се подлага на по-нататъшна обработка. Желателно е да се предостави менструална кръв последователно и през следващите 2-3 месеца.

7.4.9. Ликвор

Взема се от специалист в стерилен контейнер в количество 5-10 мл. При достатъчно количество материал той се разделя на две и едната част се оставя за няколко часа на стайна температура. Наблюдава се за образуване на нежна фибринова мрежица по повърхността на материала и от нея се прави микроскопски препарат и посевка. Обикновено ликворът е в много по-малко количество и тогава се препоръчва центрофугиране на 3000 xg за 30 мин. Супернатантата се отделя и седиментът се инокулира в 4 епруветки Löwenstein-Jensen и в 1 епруетка течна хранителна среда без деконтаминация.

Поради склонността на микобактериите към флотирание някои автори препоръчват същия брой хранителни среди да се инокулират и със супернатантата. В случаите, при които се подозира контаминация, е необходимо да се извърши максимално щадяща за микобактериите деконтаминация.

При извънбелодробните форми микобактериите могат да засегнат практически всеки орган, поради което за микробиологично изследване може да бъде изпратен всякакъв вид материал: гной, плеврални, перикардиални и синовиални пунктати, асцитна течност, пунктати от костен мозък, резецирани тъкани при оперативна интервенция, биопсия, гнойно-некротични маси, гранулации, лимфни възли и др. Клинични материали, доставени в лабораторията на тампон, се поставят в стерилна 50мл конична, центрофужна епруетка, съдържаща течна среда Middlebrook 7H9 в съотношение: 1 част материал/5-10 части течна среда (или стерилна дестилирана вода). Разбъркват се на вортекс. Оставя се в покой за 20 минути. Тампонът се изважда и оставащата суспензия се обработва като хрчка.

7.5. Транспортиране на материали за изследване на туберкулоза

7.5.1. Основни изисквания към транспортирането на материал, съдържащ инфекциозен агент

Транспортирането до микробиологичната лаборатория се извършва: в рамките на едно лечебно заведение; от едно лечебно заведение в друго в рамките на един и същи град или различни градове в страната; от лечебно заведение до лаборатория извън страната. Принцип при транспортирането е: материалът да се предпази от контаминация, а околната среда и хората – от заразяване. За целта се спазват следните основни изисквания:

7.5.1.1. Материалите да се предпазват от въздействието на пряка слънчева светлина и топлина;

7.5.1.2. Материалът да е надеждно опакован, за да се предотврати изтичането му. Да се използват контейнери с винтови, плътно затварящи се капаци. Може да се използват найлонови пликове за биологично опасен материал, при които контейнерът с материала е разделен от съпроводителното писмо;

7.5.1.3. Съпроводителното писмо да съдържа трите имена на пациента, възраст, адрес, диагноза, вид на материала, дата на вземане, вид на желаното изследване, болница, отделение, телефон за връзка;

7.5.1.4. Всяко лечебно заведение ползва подходящи (метални или от пресован картон) кутии за транспорт на контейнерите с материали; Броят на контейнерите с материали в транспортната кутия трябва да съответства на броя на съпроводителните писма;

7.5.1.5. Информацията на контейнерите трябва да съответства на тази в съпроводителното писмо;

7.5.1.6. Вземите материали се транспортират възможно най-бързо в микробиологичната лаборатория;

7.5.1.7. Допустимо е съхранение в хладилник при температура 4°C до 72 часа;

7.5.1.8. Ако пробата е опорочена – счупен контейнер, разлят материал, несъответствие на данните върху маркирания контейнер и съпроводителното писмо, неправилно съхранен материал, разложен материал, неправилен взет материал – материалът се унищожава (автоклавира);

7.5.1.9. Когато транспортирането се извършва в рамките на страната или извън страната, то трябва да бъде съобразено с препоръките на Комитета от експерти за транспорт на опасни товари към Съвета на ООН по икономическите и социалните въпроси. Тези препоръки са отразени в международен закон въз основа на типови международни договори. Официалните международни правила са регламентирани от документи, издадени от организациите на превозвачите:

7.5.1.9.1. Въздушен транспорт – Международна организация за гражданско въздухоплаване (ICAO): „Технически инструкции за безопасен транспорт на опасни товари по въздух“, и Международна организация на въздушния транспорт (IATA) – „Инструкция за превоз на опасни товари“;

7.5.1.9.2. Железопътен транспорт – правилата са формулирани в документа „Международен пренос на опасни товари със железопътен транспорт“ и се изпълняват при транспорт между страните в Европа. В държавите-членки на Европейския съюз тези правила се спазват и за транспорт в рамките на страната;

7.5.1.9.3. Автомобилен транспорт – „Европейска договореност за международен транспорт на опасни товари с автомобилен транспорт“;

7.5.1.9.4. Морски превоз – „Международен кодекс за транспорт на опасни товари с морски транспорт“, публикуван от Международната морска организация (IMO). Той е задължителен за всички 155 страни, подписали „Международната конвенция по охрана на човешкия живот по море“;

7.5.1.9.5. Транспорт по пощата – „Ръководството за пощенски връзки“ е публикувано от Световния пощенски съюз. То отразява препоръките на ООН и ICAO за транспорт на опасни товари;

7.5.1.9.5. Когато дадена страна няма детайлно разработени национални законодателни документи, уреждащи транспортирането на биологично опасни товари, тя ползва тези на ООН.

7.5.2. Основни препоръки за транспорт на инфекциозен материал

Тези препоръки са разработени от United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (UNCETDG). СЗО изпълнява роля на консултант към UNCETDG.

7.5.2.1. Създаване на ефективни работни взаимоотношения, включващи точна координация между всички участници в транспортирането – изпращач, куриер и получател, с цел осигуряване на безопасна и бърза доставка на инфекциозния материал;

7.5.2.2. Обучение на всички сътрудници, участващи в транспортирането на инфекциозни материали;

7.5.2.3. Изпращащите инфекциозен материал трябва да гарантират, че опаковките ще осигурят добро състояние на изпратения материал при получаването му и той няма да представлява опасност за хората и околната среда по време на транспорта.

7.5.3. Опаковане и документация при транспорт на инфекциозен материал

В Приложение № 6 е представена тройно пакетираща система, необходима при транспортиране на инфекциозен материал. Да се спазва принципът на тройната опаковка, предвиждаща три нива на защита:

7.5.3.1. Първа – водонепроницаем херметичен контейнер, който съдържа самия материал. Той е стъклен, метален или пластмасов. Има етикет, на който се посочват данни за съдържанието му. Опакова се с достатъчно количество адсорбиращ материал, за да може да се поеме цялата течност, при наличие на такава, ако контейнерът бъде повреден;

7.5.3.2. Втора – здрава водонепроницаема херметична опаковка, в която се слага първата. В една такава опаковка могат да бъдат поставени няколко първични контейнера. Необходима е да се осигури правилно положение на първичната опаковка, ако се ползва охлаждащо вещество при транспорта, тъй като то ще се разтопи или изпари с времето;

7.5.3.2. Трета – в нея се поставят предните две опаковки. Тази опаковка предпазва съдържанието по време на транспортирането от неблагоприятните въздействия на външната среда. Минималните размери на външната опаковка не трябва да са по-малки от 10x10x10 см.

7.5.3.3. Всяка пратка се съпровожда от документация, съдържаща адресите на подателя, получателя, броя на първичните опаковки и количеството на съдържанието им, информация за вида на изпращания материал, подпис на изпращащото лице. Тя се поставя в третата опаковка.

7.5.3.4. Всеки окончателно опакован товар трябва да е маркиран така, че етикетите да се виждат добре и да не се застъпват.

7.5.3.5. На външната опаковка трябва да има следната информация: име и адрес на изпращача; телефон на отговорното лице, което знае какво съдържа пратката; име и адрес на получателя; етикет с кода и точното наименование на товара; биологичен материал категория A-UN 2814 (при изпращане на инфекциозен материал, представляващ опасност за хората); Биологичен материал категория B-UN 3373 (при изпращане на диагностичен материал); етикет, обозначаващ ползването на сух лед или друго охлаждащо вещество, ако се използват при транспортирането; етикет, указващ правилното положение на капака на първата опаковка – две стрелки, насочени нагоре (↑↑). Всяка пратка се съпровожда от две копия декларация за опасен товар, попълнена от изпращача. Необходимо е приемане на стандартна оперативна процедура за обработка при инцидент (нарушаване целостта на опаковка) по време на всички нива от транспортирането.

8. Микроскопско изследване за туберкулоза

Диагностиката на туберкулозата и мониторирането на процеса на лечението ѝ в голяма степен се основават на резултатите от микробиологичното изследване и в частност – на резултатите от микроскопията. Независимо от съвременните достижения в микробиологичната наука, в рутинната диагностика на туберкулозата най-широко приложение намира микроскопското изследване. Основно предимство на метода е неговата бързина. Резултатът може да се съобщи най-късно до 24 часа след приемането на материала в лабораторията.

Микроскопското изследване обаче е ориентировъчен метод, поради ограничените възможности за наблюдение на КУБ под определена критична концентрация в изследвания материал.

8.1. Техника на приготвяне на препаратите.

Натривките се приготвят по два начина:

8.1.1. Директно от самия материал, т.е. преди деконтаминацията и цялостната обработка. Препоръчва се за лаборатории, в които се прави само микроскопско изследване.

8.1.2. От седимента след обработка, т.е. микроскопия и последваща посевка от един и същ материал. Препоръчва се за лаборатории, в които се прави културелно изследване и ТЛЧ

8.2. Приготвяне на препарат от най-често изследвания материал – хрчка

Използват се нови предметни стъкла – гладки, без грапавини и надрасквания, с дебелина 1 мм, двойно матиран край.

Надписват се с черен молив или тънкописец, елмазен писец. Не трябва да се използват пишешци пособия с червен цвят.

8.2.1. Върху матирания край на предметното стъкло се изписват кодът на лабораторията, лабораторният номер, на изследването на пациента, и се означава кое по ред изследване е за този пациент, както е показано в Приложение № 7: „Правилно изготвен микроскопски препарат“;

8.2.2. Избира се гноен участък от материала (ако се приготвя от недеконтаминирана хрчка) и се прехвърля върху предметното стъкло с помощта на йозе или дървения апликатор;

8.2.3. Прави се овална намазка в тънък слой в центъра на предметното стъкло на площ 1,5-2,0 см². През правилно приготвената намазка трябва да може да се чете вестникарски шрифт, разположен на 5-10 см зад предметното стъкло. На едно предметно стъкло се прави само една намазка;

8.2.4. Така приготвената натривка се оставя да изсъхне за 15 минути. Да не се подсушава чрез нагриване;

8.2.5. Трикратно се фиксира над пламъка на спиртна лампа или горелка. Препаратът не трябва да се прегрява. При фиксирането предметните стъкла трябва да се държат с пинцети, а не с ръка.

8.2.6. Преди оцветяването препаратът трябва да бъде охладен.

8.3. Видове оцветителни техники

Всички оцветителни техники, използвани в микробиологичната диагностика на туберкулозата, се основават на високото липидно съдържание на клетъчната стена на микобактериите и тяхната устойчивост към алкохол-киселина, откъдето произлиза и названието им: киселинно-устойчиви бактерии (КУБ). В практиката се използват два типа оцветителни техники: оцветяване по Ziehl-Neelsen – класически и модифицирани варианти, и флуорохромно оцветяване. При всички оцветителни методи могат да се използват разтворите, чиито прескрипции са посочени по-долу. Те се предлагат от различни производители и като готови за работа оцветителни разтвори или като цялостно окомплектовани китове за съответния вид оцветяване, както за мануално, така и за автоматизирано приложение.

8.3.1. Класическо оцветяване по Ziehl-Neelsen

8.3.1.1. Принцип

Загряването на натривката осигурява по-добро проникване на карболфуксина в клетъчната стена на микобактериите. Поетата веднъж боя от миколовите киселини и восъчните комплекси се задържа и не се обезцветява при последваща обработка с алкохол и киселина.

8.3.1.2. Необходими реактиви

8.3.1.2.1. Карболфуксин

Основен фуксин	3 г
Фенол на кристали	50 г
Етилов алкохол 95%	100 мл
Дестилирана вода	до 1000 мл

В еднолитрова стъкленица се поставя фенолът и към него се прибавя алкохолът. Смесват се добре и се прибавя основният фуксин. Размесва се до пълно разтваряне на фуксина. Ако има затруднения, се добавя около 50 мл вода и се бърка отново. Следи се да не останат кристали фенол на дъното на съда. При затруднено разтваряне разтворът може леко да се загрее. След пълното разтваряне на фуксина се долива с дестилирана вода до обем 1 литър. Добре е при наличие на магнитна бъркалка разтворът да се остави на нея за няколко часа.

Реактивът се съхранява в тъмна стъкленица с надпис „0,3% карболфуксин” и се отбелязва датата на приготвянето му. Срокът на съхранението е 12 месеца.

8.3.1.2.2. Обезцветител

8.3.1.2.2.1. Първи вариант:

Етилов алкохол 95%	970 мл
Концентрирана солна киселина	30 мл

Солната киселина се прибавя бавно по стените на съда към спирта при непрекъснато разклащане, никога обратно!

Стъкленицата с разтвора се надписва „3% киселина-алкохол” и се отбелязва датата на приготвянето му. Срокът за съхранение е неограничен.

8.3.1.2.2.2. Втори вариант:

Дестилирана вода	750 мл
Концентрирана сярна киселина	250 мл

В стъкленица се поставя водата колкото е възможно по-студена! Никога не се добавя вода в киселината! При такава ситуация разтворът ще заври веднага и може да настъпи пръскане извън съда.

При работа със силни киселини винаги се работи с работно облекло, ръкавици и предпазни очила. Сярната киселина се добавя много внимателно по стената на съда към водата. Реакцията е екзотермична. Ако разтворът се затопли много, се спира за малко прибавянето на киселината и стените на съда се охлаждат на течаща вода от чешмата, като се внимава да не пръсне вода в съда.

Стъкленицата с разтвора се надписва „25% сярна киселина” и се отбелязва датата на приготвянето му. Срокът за съхранение е неограничен.

8.3.1.3. Контрастно оцветяване

Метиленово синьо	3 г
Дестилирана вода	1000 мл

Метиленовото синьо се прибавя към 0,5 мл дестилирана вода. Разбърква се добре, за да се разтвори багрилото и след това се добавя и останалото количество вода с последващо разбъркване. Реактивът се съхранява в тъмна стъкленица с надпис: „0,3%

метиленово синьо” и се отбелязва датата на приготвянето му. Срокът на съхранение е 12 месеца.

За далтонисти се препоръчва контрастното оцветяване да се извършва с 0,7% пикринова киселина:

Пикринова киселина	7 г
Дестилирана вода	1000 мл

8.3.1.4. Техника на процедурата

8.3.1.4.1. Натривките се фиксират трикратно на пламък или върху гореща повърхност - +85°C за 15 мин;

8.3.1.4.2. Подреждат се на разстояние 1 см една от друга над ваната за оцветяване. Предметните стъкла не трябва да се допират. Да не се оцветяват повече от 12 препарата наведнъж.

8.3.1.4.3. Заливат се с филтриран карболфуксин и се загряват внимателно с напоен в спирт памучен тампон до появата на пари. Оцветителният разтвор не трябва да завира или да изсъхва на стъклото;

8.3.1.4.4. Препаратите престояват 5 минути с горещия карболфуксинов разтвор;

8.3.1.4.5. Обилно промиване с дестилирана вода;

8.3.1.4.6. Препаратите се заливат с обезцветителя за около 2-3 минути. Следи се кога ще спре да се отделя червеното багрило. Прибавя се още обезцветител, ако натривката е по-дебела и се отделя все още карболфуксин;

8.3.1.4.7. Промива се обилно с дестилирана вода;

8.3.1.4.8. Оцветяват се с метиленово синьо за 1 минута;

8.3.1.4.9. Промиват се с дестилирана вода и се изсушават на стайна температура;

8.3.1.4.10. Наблюдават се минимум 100 зрителни полета с имерсионен обектив 100x.

8.3.1.5. Качествен контрол на процедурата

Всеки ден, успоредно с изследваните материали, се прави задължително:

8.3.1.5.1. Положителна контрола със суспензия *M. tuberculosis* H₃₇ R_v. Тя се използва за контрол на качеството на реактивите и методиката на оцветяване.

8.3.1.5.2. Отрицателна контрола със суспензия *S. aureus* ATCC 25923. Тя се използва за потвърждение, че оцветителните разтвори не са контаминирани с киселинно-устойчиви бактерии.

8.3.1.6. Техника на микроскопиране

За получаване на отличен резултат при микроскопирането е необходимо:

8.3.1.6.1. Наличието на добър и добре поддържан микроскоп;

8.3.1.6.2. Удобно работно място;

8.3.1.6.3. Опитен лабораторен специалист.

8.3.1.6.4. Гледането на препарата трябва да бъде систематизирано и стандартизирано. Това ще осигури изследването на достатъчно голяма част от препарата. За да не се наблюдават едни и същи полета по няколко пъти, е необходимо разглеждането на препарата да се извършва в определен ред;

8.3.1.6.5. Винаги да се използва имерсионен обектив с увеличение 100x. Имерсионното масло трябва да е синтетично, с рефрактерен индекс > 1,5. Да не се използва кедрово масло, защото бързо изсъхва и уврежда обектива на микроскопа;

8.3.1.6.6. Методично да се разглеждат зрителните полета по протежение на препарата. След прегледа на началното зрително поле препаратът трябва да се придвижи така, че да се изследва съседното поле, намиращо се в дясно;

8.3.1.6.7. Всяко зрително поле да бъде разгледано внимателно;

8.3.1.6.8. Преди да се даде отрицателен резултат, е необходимо да се разгледат минимум 100 зрителни полета. При опитен микробиолог това ще отнеме около 5 минути. В намазка с площ 1,5-2,0 см² броят на зрителните полета по дължината на препарата е около 100;

8.3.1.6.9. Ако в препарата има голямо количество КУБ, положителният резултат може да се даде и след преглед на по-малко от 100 полета – 50, 20;

8.3.1.6.10. След приключване на микроскопирането обективът се почиства с почистваща течност, препоръчана от фирмата-производител на микроскопа, или с почистваща смес от 80 части етилов етер и 20 части алкохол. Да не се използва ксилол или друг органичен разтворител;

8.3.1.6.11. Почистените от имерсията препарати се съхраняват в кутии за препарати от настоящата и предходната календарни години;

8.3.1.6.12. Резултатите от микроскопирането трябва да се анализират ежеседмично или ежемесечно, за да се следи честотата на положителните препарати. Ако има значително отклонение от нормата, трябва да се отстранят причините за това. Ориентировъчно на един положителен препарат се падат приблизително 10 отрицателни.

8.3.1.7. Морфологична характеристика на киселинно-устойчивите бактерии

8.3.1.7.1. Киселинно-устойчивите бактерии представляват тънки пръчици, прави или извити, единични или в купчинка, палисадно разположени или под формата на буквата V. Много често те са гранулирани с приблизителни размери от 0,2-0,6 µm до 1,0-10 µm.

8.3.1.7.2. При оцветяване по Ziehl–Neelsen киселинно-устойчивите бактерии са червени пръчици с изразен полиморфизъм на син фон, а при използване на пикринова киселина фонът е жълт.

8.3.1.7.3. Различна степен на киселинна устойчивост могат да проявяват не само микобактериите, но и други видове: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, а също и цисти на *Cryptosporidium*, *Isospora*.

8.3.1.7.4. При бързо растящите микобактерии се наблюдава вариабилност в степента на поглъщане на оцветителните разтвори.

8.3.1.7.5. Микроскопското изследване не може да разграничи туберкулозните от сапрофитните микобактерии.

8.3.1.8. Регистрация на резултатите

8.3.1.8.1. Отрицателен резултат

Отбелязва се методът, по който е оцветен препаратът. Отговорът „КУБ не се установяват” или „КУБ не се наблюдават” се дава, когато в 100 зрителни полета не са открити киселинноустойчиви бактерии.

8.3.1.8.2. Положителен резултат. Количествена оценка на резултатите.

Отбелязва се методът, по който е оцветен препаратът. Количеството на киселинно-устойчивите бактерии свидетелства както за степента на опасност, която представлява болния за обкръжаващите го, така и за тежестта на туберкулозното поражение. При положителен резултат е необходимо да се даде количествена оценка. Полуколичествената оценка на препаратите, изготвени по Ziehl–Neelsen, е представена в Таблица 3.

Таблица 3: Полуколичествена оценка на препаратите, изготвени по Ziehl–Neelsen

Количество КУБ	Брой имерсионни зрителни полета	Отговор
КУБ отсъстват	100	В 100 зрителни полета КУБ не се установиха
1 – 9 КУБ	100	Да се запише точният брой КУБ. <i>Например: 5 КУБ на 100 зрителни полета</i>
10 – 99 КУБ	100	(1+) или 10-99 КУБ на 100 зрителни полета
1 – 10 КУБ	1	(2+) или 1-10 КУБ на 1 зрително поле
Над 10 КУБ	1	(3+) или над 10 КУБ на 1 зрително поле

8.3.1.9. Предимства на оцветяването по Ziehl–Neelsen

- 8.3.1.9.1. По- висока специфичност в сравнение с флуорохромните оцветявания;
- 8.3.1.9.2. Добра корелация с резултатите от културелното изследване;
- 8.3.1.9.3. Добра възпроизводимост на резултатите;
- 8.3.1.9.4. Висока чувствителност при микроскопия на храчки от болни с отворени форми на белодробна туберкулоза, което го прави средство на избор;
- 8.3.1.9.5. Използва се като потвърдителен тест за флуорохромното оцветяване;
- 8.3.1.9.6. Лесно достъпен и евтин метод.

8.3.1.10. Причини за грешки при микроскопско изследване по Ziehl–Neelsen

- 8.3.1.10.1. Фалшиво положителни резултати
 - 8.3.1.10.1.1. Използване на контейнери за многократна употреба;
 - 8.3.1.10.1.2. Повторно използване на положителните предметни стъкла;
 - 8.3.1.10.1.3. Дебели предметни стъкла, с драскотини, надписани с червен молив;
 - 8.3.1.10.1.4. Недостатъчно обгорено йозе;
 - 8.3.1.10.1.5. Използване на нефилтриран карболфуксин с утайка;
 - 8.3.1.10.1.6. Неадекватно обезцветяване;
 - 8.3.1.10.1.7. Непочистен имерсионен обектив;
 - 8.3.1.10.1.8. Контаминирано имерсионно масло;
 - 8.3.1.10.1.9. Непознаване морфологичната характеристика на киселинно-устойчивите бактерии;
 - 8.3.1.10.1.10. Разминаване в маркировката на контейнера и предметното стъкло.
- 8.3.1.10.2. Фалшиво отрицателни резултати
 - 8.3.1.10.2.1. Лошо качество на материала;
 - 8.3.1.10.2.2. Недостатъчно количество на материала;
 - 8.3.1.10.2.3. Оставен на слънчево място материал;
 - 8.3.1.10.2.4. По-дълго съхранение при по-високи температури;
 - 8.3.1.10.2.5. Неправилно избрана част от храчката при директна микроскопия от недеконтаминирана храчка;
 - 8.3.1.10.2.6. Твърде дебела или твърде тънка намазка;
 - 8.3.1.10.2.7. По-продължителна и груба деконтаминация;
 - 8.3.1.10.2.8. Лоша фиксация;

8.3.1.10.2.9. Лошо качество на оцветителите и реактивите;
 8.3.1.10.2.10. Недостатъчно загряване на карболфуксина;
 8.3.1.10.2.11. Малък брой разгледани зрителни полета;
 8.3.1.10.2.12. Липса на опит – непознаване на морфологията на киселинно-устойчивите бактерии.

8.4. Оцветяване по Kinyoun – модификация на класическото оцветяване по Ziehl-Neelsen

8.4.1. Принцип

По-високата концентрация на основен фуксин и фенол при оцветяването по Kinyoun, в сравнение с оцветителната техника по Ziehl-Neelsen, подпомага проникването в клетъчната стена на микобактериите и премахва необходимостта от загряване. Тази техника щади персонала от токсичните фенолови пари.

8.4.1.1. Необходими реактиви

8.4.1.1.1. Карболфуксин

Основен фуксин	4 гр
Етилов алкохол 95%	20 мл
Фенол на кристали	8 гр
Дестилирана вода	100 мл

8.4.1.1.2. Обезцветител

Концентрирана солна киселина	3 мл
Етилов алкохол 95%	97 мл

8.4.1.2. Контрастно оцветяване

Метиленово синьо	0,3 гр
Дестилирана вода	100 мл

8.4.1.3. Техника на процедурата

8.4.1.3.1. Изсъхналите натривки се фиксират трикратно на пламък или върху гореща плоча на +85° C за 15 минути;

8.4.1.3.2. Подреждат се на разстояние 1 см една от друга над ваната за оцветяване. Предметните стъкла не трябва да се допират. Да не се оцветяват повече от 12 препарата наведнъж;

8.4.1.3.3. Натривките се заливат с карболфуксина и се оставят за 5 минути;

8.4.1.3.4. Промиват се обилно с дестилирана вода;

8.4.1.3.5. Препаратите се обезцветяват, докато се отмие багрилото;

8.4.1.3.6. Промиват се обилно с дестилирана вода;

8.4.1.3.7. Оцветяват се с метиленово синьо за 1 минута;

8.4.1.3.8. Промиват се с дестилирана вода и се изсушават на стайна температура;

8.4.1.3.9. Наблюдават се минимум 100 зрителни полета с имерсионен обектив 100х.

8.4.1.4. Качествен контрол на процедурата

Всеки ден успоредно с изследваните материали се прави задължително:

8.4.1.4.1. Положителна контрола със суспензия *M. tuberculosis* H₃₇R_v. Тя се използва за контрол на качеството на реактивите и методиката на оцветяване;

8.4.1.4.2. Отрицателна контрола със суспензия *S. aureus* ATCC 25923. Тя се използва за потвърждение, че оцветителните разтвори не са контаминирани с киселинно-устойчиви бактерии.

8.5. Флуорохромно оцветяване

8.5.1. Принцип

Флуоресцентните багрила се свързват с миколовите киселини в клетъчната стена на микобактериите. Те поглъщат ултравиолетовите лъчи и започват да излъчват светлина с определена дължина на вълната. Флуорохромно оцветените бактерии се наблюдават като ярко оцветени светещи петна на тъмен фон.

8.5.2. Необходими реактиви

8.5.2.1. Флуорохромен разтвор:

8.5.2.1.1. Разтвор А

Аурамин	0,1 гр
---------	--------

Етилов алкохол 95%	10 мл
--------------------	-------

8.5.2.1.2. Разтвор Б

Фенол на кристали	30 гр
-------------------	-------

Дестилирана вода	87 мл
------------------	-------

Аураминът има изразена канцерогенна активност и трябва да се работи много внимателно с него, за да се предотврати попадането на прах или разтвор от него върху кожата.

Разтвор А и разтвор Б се смесват.

8.5.2.2. Обезцветител

Концентрирана солна киселина	0,5 гр
------------------------------	--------

Етилов алкохол	100 мл
----------------	--------

Никога не се добавя алкохол в киселината. Солната киселина се добавя много внимателно по стената на съда към алкохола.

8.5.2.3. Дооцветяващ разтвор

За допълнително оцветяване на фона може да се използва разтвор на калиев перманганат или акридин – оранж.

8.5.2.3.1. Разтвор на калиев перманганат

Калиев перманганат	0,5 гр
--------------------	--------

Дестилирана вода	100 мл
------------------	--------

Калиевият перманганат се разтваря в дестилираната вода

8.5.2.3.2. Разтвор на акридин – оранж

Динатриев хидроген фосфат	0,01 гр
---------------------------	---------

Акридин-оранж	0,01 гр
---------------	---------

Дестилирана вода	100 мл
------------------	--------

Динатриевият хидроген фосфат се разтваря в дестилираната вода и се добавя акридин-оранж.

Всички реактиви подлежат на качествен контрол. Те се съхраняват до 3 месеца при стайна температура далече от източници на топлина и светлина в тъмни стъкленици, на които ясно е написано името на реактива и датата на приготвянето му.

8.5.2.4. Техника на процедурата

8.5.2.4.1. Натривките се фиксират трикратно на пламък или върху гореща повърхност - +85°C за 15 минути;

Препаратите не трябва да се нагряват и не се използва филтърна хартия.

8.5.2.4.2. Подреждат се на разстояние 1 см една от друга над ваната за оцветяване. Предметните стъкла не трябва да се допират. Да не се оцветяват повече от 12 препарата наведнъж;

8.5.2.4.3. Заливат се с флуорохромното багрило за 15 минути;

8.5.2.4.4. Промиват се обилно с дестилирана вода, тъй като водата от водопроводната мрежа съдържа хлор и това може да повлияе на интензивността на флуоресценцията;

8.5.2.4.5. Обезцветяват се с алкохол – киселина за 2 минути;

8.5.2.4.6. Промиват се с дестилирана вода;

8.5.2.4.7. Заливат се с разтвор на калиев перманганат или акридин-оранж за 2 минути. При използване на калиев перманганат точността на експозицията е от решаващо значение, защото по-дългото му въздействие намалява интензивността на флуоресценцията на микобактериите;

8.5.2.4.8. Промиват се с дестилирана вода и се изсушават на стайна температура;

8.5.2.4.9. Наблюдават се веднага след оцветяването с обектив 20х, 40х, 60х. При невъзможност за непосредствено наблюдаване препаратите се съхраняват в хладилник, увити в черна хартия, за да се избегне отслабването на интензивността на флуоресценцията.

8.5.2.5. Качествен контрол на процедурата

Всеки ден успоредно с изследваните материали се прави задължително:

8.5.2.5.1. Положителна контрола със суспензия *M. tuberculosis* H₃₇R_v. Тя се използва за контрол на качеството на реактивите и методиката на оцветяване;

8.5.2.5.2. Отрицателна контрола със суспензия *S. aureus* ATCC 25923. Тя се използва за потвърждение, че оцветителните разтвори не са контаминирани с киселинно-устойчиви бактерии.

8.5.2.6. Предимства на флуорохромната микроскопия:

8.5.2.6.1. Висока чувствителност;

8.5.2.6.2. Добър контраст;

8.5.2.6.3. Възможност за преглеждане на по-голям брой зрителни полета за по-кратко време, тъй като се работи с малки увеличения;

8.5.2.6.4. Метод на избор при скрининг – напр. при натовареност повече от 20 препарата дневно.

8.5.2.7. Недостатъци на флуорохромната микроскопия:

8.5.2.7.1. Необходимост от флуоресцентен микроскоп с подходящи филтри;

8.5.2.7.2. Изисква се опит от страна на микроскопиращия;

8.5.2.7.3. По-ниска специфичност в сравнение с карболфуксиновите оцветявания, тъй като не се визуализират някои бързо растящи микобактерии;

8.5.2.7.4. Вероятността от фалшиво положителни резултати е висока, поради използването на малки увеличения. Това налага винаги последващо оцветяване по Ziehl-Neelsen;

8.5.2.7.5. Флуорохромно оцветените препарати са нетрайни. Интензивността на флуоресценцията намалява бързо.

8.5.2.8. Количествена оценка на резултатите

Флуорохромно оцветените препарати се наблюдават при по-малки увеличения в сравнение с препаратите, оцветени по Ziehl-Neelsen и неговите модификации. В резултат на това всяко зрително поле, изследвано с флуоресцентен микроскоп, има

значително по-голяма площ от зрителното поле, изследвано със светлинен микроскоп, което означава, че количеството КУБ при флуорохромното оцветяване при увеличение 200x ще бъде значително по-голямо, отколкото при наблюдение на същия препарат със светлинен микроскоп при увеличение 100x. За да се избегне погрешната интерпретация, е необходимо броят на наблюдаваните флуорохромно-оцветени КУБ да се раздели на коефициент, посочен в Таблица 4. Така полученият резултат съответства на количеството КУБ в същия препарат, оцветен по Ziehl–Neelsen.

Таблица 4: Оценъчна скала при флуорохромно оцветяване за КУБ

Брой КУБ по Ziehl-Neelsen (увеличение 100 x)	Резултат	Брой КУБ при флуоресцентно оцветяване		
		Увеличения на флуоресцентния микроскоп		
		200 x	400 x	600 x
0	КУБ, не се установиха	0	0	0
1-9 КУБ на 100 зрителни полета	Да се впише точният брой на установените КУБ	Разделете получения резултат на 10	Разделете получения резултат на 4	Разделете получения резултат на 2
10-99 КУБ на 100 зрителни полета	(1+)			
1-10 КУБ на 1 зрително поле	(2+)			
Над 10 КУБ на 1 зрително поле	(3+)			

Всички използвани реактиви за оцветяване на КУБ се предлагат в готов вид от фирми-производители на реактиви и диагностикуми за медицинската практика.

Стандартните оперативни процедури за посочените по-горе оцветителни методи се отнасят за мануално оцветяване. В лабораториите, оцветяващи по-голям брой микроскопски препарати, напр. над 15-20 препарата дневно и разполагащи с апарати за автоматизирано оцветяване трябва да се спазват посочените от производителя стандартни оперативни процедури за конкретната автоматизирана система.

8.6. Изисквания към издаваните резултати от микроскопското изследване

8.6.1. Резултатите трябва да се отразяват в два документа:

8.6.1.1. Върху бланката за съобщаване на резултата;

8.6.1.2. В лабораторния журнал.

8.6.2. Положителните резултати да се отразяват с червен химикал както в журнала, така и върху бланката за съобщаване на резултата.

8.6.3. Отговорът от микроскопското изследване да се даде не по-късно от 24 часа от постъпване на материала в лабораторията.

8.6.4. При нанасяне на резултата да се упомене методът на оцветяване.

8.6.5. При положителен резултат да се отрази количеството на КУБ.

8.6.6. Информация за резултата не се дава по телефона на пациента.

8.6.7. Всеки положителен резултат се изпраща на съответното лечебно заведение и се придружава с устно съобщение по телефона на лекуващия лекар.

Да се избягва даването на положителен резултат директно на пациента, преди да е уведомен лекуващият лекар.

8.7. При изготвянето на голям брой микроскопски препарати, напр. по над 12 препаратите дневно могат да бъдат използвани автоматизирани оцветителни системи. Те предпазват персонала от алергизиращите карбол-фуксиновите изпарения, които се отделят при загряване, за разлика от мануалното оцветяване по Ziehl-Neelsen. При използването на автоматизирани оцветителни системи се спазват инструкциите на производителя.

9. Културелно изследване за туберкулоза

9.1. Принципи

Културелното изследване е основен, високочувствителен и специфичен метод за микробиологична диагноза на туберкулозата:

9.1.1. Потвърждава диагнозата, като изолира етиологичния агент;

9.1.2. Определя степента на бацилоотделяне, като дава количествена информация за КОЕ;

9.1.3. Най-сигурният микробиологичен критерий за ефективността на лечението;

9.1.4. Дава възможност за определяне на чувствителността на изолирания щам към противотуберкулозни лекарства;

9.1.5. Културелното изследване е задължителен момент от микробиологичната диагноза на туберкулозата в лабораториите от средно ниво. В сравнение с микроскопското изследване методът е скъп, тъй като изисква специално оборудване и консумативи, посочени по-горе.

9.2. Хранителни среди за култивиране. Видове хранителни среди:

9.2.1. При избора на хранителна среда за изолиране на туберкулозни бактерии трябва да се имат предвид следните особености:

9.2.1.1. Бавен растеж на *M. tuberculosis* (генерационно време 18-24 часа);

9.2.1.2. *M. tuberculosis* е възникващ микроорганизъм;

9.2.1.3. Голяма част от клиничните материали, които се изследват за туберкулоза, съдържат различно количество бързо растяща неспецифична бактериална флора;

9.2.1.4. Тези особености поставят някои специфични изисквания пред хранителните среди за първично изолиране:

9.2.1.4.1. Да бъдат достатъчно богати, за да осигуряват оптимален растеж при малък инокулум;

9.2.1.4.2. Да бъдат във вид, който осигурява достатъчно дълга инкубация;

9.2.1.4.3. Да потискат растежа на съпътстващата неспецифична бактериална флора;

9.2.1.4.4. Да бъдат евтини и да се приготвят лесно.

9.2.2. Най-често използваните в лабораторната практика са следните видове хранителни среди, представени на Таблица 5.

9.2.2.1. Твърди хранителни среди

9.2.2.1.1. Яйчни среди

9.2.2.1.2. Агарови среди

9.2.2.2. Течни хранителни среди

9.2.2.3. Бифазни хранителни среди

Таблица 5: Видове хранителни среди за културелно изследване за туберкулоза

Хранителни среди	Предимства	Недостатъци
Твърди хранителни среди		
1. Яйчни Löwenstein-Jensen Coletsos Petragnani Ogawa Stonebrink Wallenstein	✓ Най-достъпни; ✓ Дълъг полуживот – 1 година в хладилник; ✓ Показват характерна, повторяема колониална морфология; ✓ Добър растеж при малък инокулум; ✓ Ниско ниво на контаминация.	✓ Бавен растеж; ✓ Контаминацията често обхваща цялата повърхност, а понякога втечнява средата; ✓ Недостатъчно добри за ТЛЧ.
2. Агарови Middlebrook7H10 Middlebrook7H11	✓ Голяма повърхност за изследване; ✓ Лесна възможност за откриване на ранен растеж на микроколонии; ✓ Подходящи за ТЛЧ	✓ По-къс полуживот – 1 месец; ✓ Могат да освободят формалдехид, токсичен за микобактериите.
Течни хранителни среди		
Middlebrook 7H9	✓ Подходяща за изготвяне на инокулуми за идентификация и ТЛЧ	✓ Високо ниво на контаминация; ✓ Подходяща среда за първично изолиране само при стерилни материали.
MGIT мануална и автоматизирана система, BacT/ALERT MP	✓ Бърз растеж; ✓ Култивиране на материали с по-висока контаминация; ✓ Подходяща за ТЛЧ.	✓ Невъзможност да се наблюдава морфологията на колониите.
Бифазни хранителни среди		
Septi-Check AFB	✓ По-късо време за детекция; ✓ Добро отчитане на контаминацията; ✓ Добра преценка на морфологията; ✓ Готова бульонна култура.	✓ Изисква по-голямо обслужване.

9.2.3. Твърдите и течните хранителни среди могат да бъдат неселективни и селективни в зависимост от това, дали съдържат допълнителни вещества за потискане на контаминиращите бактерии и гъби. Най-често използвани селектиращи суплементи са:

- 9.2.3.1. Cycloheximide;
- 9.2.3.2. Nalidixic acid;
- 9.2.3.3. Amphotericin B;
- 9.2.3.4. Polymixin B;
- 9.2.3.5. Lincomycin;
- 9.2.3.6. Azlocillin;

9.2.3.7. Malachite green (малахитово зелено, малахитгрюн) в по-високи концентрации.

Световната здравна организация препоръчва за първично изолиране на микобактериите да се използват поне два вида различни хранителни среди: твърда и течна; или яйчна и агарова.

Основна твърда яйчна среда за първично изолиране на микобактерии е средата на Löwenstein-Jensen. Останалите твърди яйчни хранителни среди по принцип съдържат основните компоненти на средата на Löwenstein-Jensen. Чрез отнемане или прибавяне на минерални съставки при тях се постига стимулиране или потискане на растежа на различни микобактерии. Например средата Coletsos съдържа повече микроелементи и хранителни компоненти. Наличието на натриев пируват позволява изолирането на *M. bovis*.

9.2.4. Твърда хранителна среда на Löwenstein-Jensen

Състои се от минерална и яйчна съставка. Минералната съставка се предлага като фирмен продукт в готов вид: дехидратирана среда Löwenstein-Jensen база на прах. Средата може да бъде приготвена в лабораторията по дадената по-долу рецепта. Яйчната съставка винаги се приготвя в лабораторията и се прибавя към минералната съставка. Среда на Löwenstein-Jensen, разлята в епруветки, се предлага като фирмен продукт, готов за работа, а също и модифицирана с добавка на: 5% NaCl, на антибиотична смес (пеницилин и налидиксова киселина) без глицерол, но с пируват и т.н.

9.2.4.1. Състав на средата

9.2.4.1.1. Минерално-солеви разтвор:

Аспаргин	3,60 г
Монокалиев фосфат	2,40 г
Магнезиев сулфат	0,24 г
Магнезиев цитрат	0,60 г
Картофено брашно	30,0 г
Глицерин	12 мл
Дестилирана вода	600 мл

Ингредиентите се смесват в стерилна плоскодънна колба с перли и се поставят на вряща водна баня при постоянно разклащане, докато желира нишестето (картофеното брашно). Стерилизира се чрез автоклавиране на 121°C за 15 мин. или двукратно на Кохов стерилизатор за 30 мин. Съхранява се в хладилник.

9.2.4.1.2. Яйчна смес:

В зависимост от големината им се използват: цели яйца – 16 броя, и яйчен жълтък – 6 броя – до 1000 мл.

Яйцата задължително трябва да са пресни < 7 дни. Измиват с топла вода с четка и сапун. Изплакват се на течаща вода и се поставят в 70% етанол за 15 мин. Счупват се внимателно и се изливат в стерилна плоскодънна колба от 2000 мл с повече перли. Разбъркват се с кръгови движения (внимава се да не се образува пяна), докато се получи хомогенна маса.

9.2.4.1.3. Разтвор на малахитгрюн 2%

Малахитгрюн суха субстанция	2 г
Стерилна дестилирана вода	100 мл

Багрилото се разтваря в стерилна колба със стерилна дестилирана вода. Хомогенизира се чрез инкубиране на 37°C за 1-2 часа. Разтворът е нетраен и се приготвя *ex tempore*. Малахитгрюнът потиска растежа на контаминантите.

9.2.4.2. Начин на приготвяне

Минерално-солевият разтвор и разтворът на малахитгрюн се прибавят към колбата с яйчна смес. Хомогенизират се чрез разклащане. Сместа се филтрира през телена цедка или стерилна марля и се разлива в стерилни епруветки, с капачки на винт, не по-малко 5 -6 мл, в зависимост от обема на епруветката. Епруветките се поставят в предварително загрят до 80°C коагулатор, полегнали под наклон, с оглед на формирането на голям полегат слой. Коагулират се на 80-85°C за 45 мин. Температурата и времето за коагулиране трябва стриктно да се спазват. Увеличаването на температурата и времето, повторното коагулиране, както и температурните различия в отделните участъци на коагулатора могат да бъде причина за лошото качество на средата: обезцветяване, поява на малки дупчици или мехурчета. Температура от 80-85°C само коагулира средата, без да я стерилизира. Цялата стъклария, телените цедки и марли трябва да бъдат стерилни. След приключване на процедурата по изпичане се отстраняват епруветките с лошо качество. Средата в епруветките трябва да е с бледо млечно зелен цвят с хомогенна структура.

9.2.4.3. Контрол за стерилност на средата. Съхранение

Готовата среда се инкубира на 37°C за 24-48 часа с цел проверка на стерилността. Препоръчва се проба от средата да се остави в термостат за по-дълго време (1-2 седмици) за изключване на контаминация с плесени или микотични агенти. Готовата среда се съхранява на тъмно, в хладилник за 4-6 седмици.

Качествен контрол: с *M. tuberculosis* H₃₇ R_v

За материали като хрчка средата на Löwenstein-Jensen трябва да бъде първи избор за култивиране, защото: е евтина и проста за приготвяне; стимулира растежа на малки количества туберкулозни бактерии; инхибира растежа на контаминантите; позволява предварителна диференциация на изолатите на базата на морфологията на колонииите.

9.2.5. Течни хранителни среди. Видове

Течните хранителни среди подобряват диагностиката при материали, отрицателни на микроскопското изследване. Употребата им е препоръчителна паралелно с твърдите яйчни хранителни среди. Цената им обаче е много по-висока от тази на твърдите хранителни среди.

9.2.5.1. Течна среда Middlebrook 7H9. Състав

Средата е предназначена за провеждане на тестове за идентификация и изготвяне на инокулум за ТЛЧ. Самостоятелно тя не е подходяща за първично изолиране на микобактерии поради високото ниво на контаминация. За култивиране на клинични материали се използват модифицираните ѝ варианти: MGIT - мануален и за автоматизирана система с флуоресцентна детекция; и Bac/ALERT MP - за автоматизирана система с колориметрична детекция.

Състав за 900 ml дестилирана вода:

Двунатриев фосфат	2,5 г
Монокалиев фосфат	1,0 г
Натриев глутамат	0,5 г
Натриев цитрат	0,1 г
Амониев сулфат	0,5 г

Пиридоксин	0,001 г
Железен амониев цитрат	0,04 г
Магнезиев сулфат	0,05 г
Цинков сулфат	0,001 г
Меден сулфат	0,001 г
Биотин	0,5мг
Калциев двухлорид	0,5 г
pH	6,6 ±0,2

9.2.5.1.1. Начин на приготвяне

4,7 г от сухата субстанция се суспендират в 900 мл дестилирана вода, в която предварително са разтворени 2 мл глицерол и 2 г декстроза. Стерилизира се в автоклав при 121°C за 15 минути. Охлажда се. Разлива се по 5 мл в епруветки с капачки на винт.

9.2.5.1.2. Качествен контрол

Тест микроорганизъм – *M. tuberculosis* H₃₇ R_v

9.2.5.2. Модификации на Middlebrook 7H9 – MGIT

Течната хранителна среда MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) представлява модифициран Middlebrook 7H9 бульон. Тя е готова хранителна среда, в баркодирана епруветка, 7 мл среда, с вграден флуоресцентен сензор на дъното на всяка епруветка и е предназначена за бързо изолиране на микобактерии от всякакъв вид белодробни и извънбелодробни материали (с изключение на кръв и урина). След инокулация на деконтаминирания материал, MGIT епруветката се култивира и отчита в напълно автоматизираната система BACTEC® MGIT 960 (или 320) System. Предлага се и в мануален вариант, но с обем 4 мл, които се отчитат с мини MGIT ридер.

9.2.5.2.1. Принцип

Средата съдържа необходимите есенциални субстанции за растежа на микобактериите. Олеиновата киселина служи като растежен фактор, декстрозата – като източник на енергия, албуминът свързва свободните мастни киселини, каталазата разгражда токсичните пероксиди. При растежа си, микобактериите метаболизират хранителни вещества и кислорода в MGIT епруветката. Флуоресцентният сензор на дъното на епруветката реагира на кислородната концентрация в средата с култура. Фотодетекторите на апарата измерват нивото на флуоресценция, което съответства на количеството кислород, консумирано от микобактериите, т.е. благодарение на тези флуоресцентни измервания, апаратът открива наличието на микобактерии, развиващи се в култивираната среда. Апаратът автоматично тества епруветките в непрекъснат режим. Поредица от светло излъчващи диоди (Light Emitting Diodes, LED) под епруветките започват да светят, като така активират техните флуоресцентни сензори. След това фото детекторите на апарата правят отчитанията. Един тест-цикъл на всички отделения се изпълнява за 60 минути. Положителните култури незабавно се сигнализируют с индикаторна светлина отпред на отделението, със звукова аларма и се показват на LCD екран. Когато положителните епруветки са идентифицирани, те се изваждат от апарата за изготвяне на препарати по Цил-Нилсен и тест за видова идентификация (Приложение № 8) Принцип на култивиране на микобактерии в автоматизирана система BACTEC MGIT)

9.2.5.2.2. Състав на средата MGIT

Една епруветка MGIT съдържа: 110 мкл флуоресцентен индикатор и 7 мл модифициран Middlebrook 7H9 бульон. Приблизителен състав на средата (г/л):

Модифицирана Middlebrook 7H9 база 5,90г

Казеин пептон

1,25г

Индикаторът съдържа: Трис 4,7-дифенил-; 10-фенантролин рутениум хлорид пентахидрат в силиконова мембрана. Епруветките съдържат 10% CO₂ и са затворени с полипропиленови винтови капачки.

Към MGIT се добавя суплемент, който стимулира растежа на микобактериите и същевременно подтиска растежа на евентуално останалата след деконтаминацията неспецифична флора, т.е. суплементът превръща MGIT в селективна среда. Суплементът представлява смес от Middlebrook OADC обогатител (15мл) и PANTA (лиофилизирани антибиотици), опаковани фабрично поотделно, които се смесват и разтварят преди добавянето им в средата. Готовата смес се съхранява в хладилник (2°C до 8°C) и може да се използва в рамките на 5 дни.

Съставът суплемента е, както следва:

Middlebrook OADC обогатител, за 1 литър вода:

Олеинова киселина	0,1 г
Албумин (говежди)	50,0 г
Декстроза	20,0 г
Каталаза	0,03 г
Полиоксетилен стеарат (POES)	1,1г

MGIT PANTA, състав на едно шише лиофилизат:

Polymyxin B	6000 E
Amphotericin B	600 мкг
Nalidixic acid	2400 мкг
Trimethoprim	600 мкг
Azlocillin	600 мкг

9.2.5.2.3. Начин на приготвяне на средата за инокулация

Към всяка епруетка с MGIT преди инокулацията се добавя 0,8 мл от предварително приготвения суплемент. Клиничният материал се деконтаминира с 1% NALC-NaOH, съгласно инструкцията на производителя.

9.2.5.2.4 Качествен контрол

Тест-микроорганизми	Ден на позитивиране
M. tuberculosis ATCC 27294	6-10
M. kansasii ATCC 12478	7-11
M. fortuitum ATCC 6841	2-3

Процедурата е описана подробно в инструкцията на производителя. MGIT средата се използва в мануална и автоматизирана системи.

9.3. Ход на културелното изследване

9.3.1. Оглед и етикиране на пробите

Работата с клиничния материал трябва да започне с макроскопски оглед на пробата, който включва:

9.3.1.1. Вид на материала:

9.3.1.1.1. Не се допускат проби, при които има външно замърсяване на контейнера с клиничен материал;

9.3.1.1.2. Не се допускат проби, които са в неподходящи контейнери (напр. без винтова капачка, нестерилни съдове и др.);

9.3.1.1.3. Не се допускат проби с ненадписани контейнери;

9.3.1.1.4. Не се допускат счупени контейнери;

9.3.1.1.5. Не се допускат сухи тампони;

9.3.1.1.6. Не се допуска слюнка;

9.3.1.2. Обем на материала:

9.3.1.2.1. Оптималният обем е 3-5 мл;

9.3.1.2.2. При материали, взети с инвазивни методи, са допустими и по-малки обеми. За някои материали има специфични изисквания за обем (урина);

9.3.1.3. Етикиране

9.3.1.3.1. Вписване в лабораторния журнал и поставяне на лабораторен номер на контейнера с клиничен материал.

9.3.2. Хомогенизация и деконтаминация

Голяма част от клиничните материали съдържат муцин, органичен детрит, серум, тъкани и други протеинни материи, които са контаминирани с неспецифична бактериална флора. При тях контаминиращите бактерии трябва да бъдат убити или значително редуцирани, а микобактериите – освободени от мукуса и клетките. Ако това не стане, асоциираната флора ще порасне много преди микобактериите да имат шанс да образуват видими колонии. Това налага употребата на процедури, осигуряващи хомогенизация и деконтаминация на клиничните материали. Чрез хомогенизацията се цели да се освободят бактериите от мукуса, клетките или тъканите, в които са инфилтрирани. Колкото по-лека е хомогенизацията, толкова по-добър е резултатът. За втечняване на материалите се използват N-ацетил L-цистеин, спутолизин, ензими. Това са агенти, които не инхибират бактериалните клетки. Процесът на втечняване може да се усили чрез миксиране във вортекс в затворени контейнери. След миксиране контейнерите трябва да се оставят в покой 15 мин., за да се избегне разпространението на фини аерозоли. Деконтаминацията се базира на високата резистентност на туберкулозния бактерия към киселини и основи. Много важно при нея е процедурата да е щадяща, което се определя не само от крайната концентрация на киселината или основата, но също от времето на въздействие и температурата по време на центрофугиране.

9.3.2.1. Основни изисквания към деконтаминанта:

9.3.2.1.1. Максимално да унищожава съпътстващата неспецифична бактериална флора;

9.3.2.1.2. Да бъде максимално щадящ за микобактериите;

9.3.2.1.3. Да е евтин;

9.3.2.1.4. Да е лесен за приготвяне.

И най-щадящият деконтаминант унищожава 10-20% от микобактериите. Критерий за ефикасността на метода за деконтаминация трябва да бъде процентът на контаминирани проби в лабораторията. Оптималният резултат е 2-5%. Над 5% контаминацията е висока и трябва да се обърне внимание както на деконтаминанта, така и на целия процес по събиране, транспорт и съхранение на материалите. Под 2% деконтаминацията е твърде груба.

9.3.2.2. Метод с 4% NaOH (Метод на Петров)

9.3.2.2.1. Реактиви:

4% натриева основа

NaOH кристали 4 г

Дестилирана вода 100 мл

Така приготвеният разтвор се стерилизира на 121°C за 15 мин. в автоклав.

3% солна киселина

HCl киселина кристали 3 г

Стерилна дестилирана вода 100 мл

Бромтимолблау

9.3.2.2.2. Процедура

9.3.2.2.2.1. Към всеки материал се прибавя равен обем 4% NaOH;

9.3.2.2.2.2. Капачката на съда се завинтва плътно.

9.3.2.2.2.3. Материалът се хомогенизира чрез разклащане;

9.3.2.2.2.4. Престоява 15-20 мин. на стайна температура;

9.3.2.2.2.5. Центрофугира се на 3000 x g за 15 мин;

Общото време за контакт с основата не трябва да превишава 30 мин. NaOH е токсична както за контаминантите, така и за туберкулозните бактерии, и затова времето трябва стриктно да се спазва.

9.3.2.2.2.6. Супернатантата се отлива.

9.3.2.2.2.7. Седиментът се неутрализира с прибавянето на няколко капки 3% HCl, съдържаща индикатор бромтимолблау. Неутрализирането трябва да се извършва много внимателно, с непрекъснато разклащане и да спре при първата капка, която промени цвета на индикатора в жълт. При неправилна процедура цветът на средата на Löwenstein-Jensen става син;

9.3.2.2.2.8. С така приготвения седимент се инокулират две епруветки среда на Löwenstein-Jensen. Методът не е подходящ при инкулиране на MGIT. .

9.3.2.3. Модифициран метод на Петров

9.3.2.3.1. Реактиви

4% натриева основа

NaOH кристали 4г

Дестилирана вода 100мл

Така приготвеният разтвор се стерилизира на 121°C за 15 мин. в автоклав.

Стерилен физиологичен разтвор (банка)

9.3.2.3.2. Процедура

9.3.2.3.2.1. Към всеки материал се прибавя 2 пъти по-голям обем 4% NaOH;

9.3.2.3.2.2. Капачката на съда се завинтва плътно;

9.3.2.3.2.3. Материалът се хомогенизира чрез разклащане;

9.3.2.3.2.4. Престоява 15 мин. на стайна температура;

9.3.2.3.2.5. Центрофугира се на 3000 x g за 15 мин;

9.3.2.3.2.6. Супернатантата се отлива;

9.3.2.3.2.7. Седиментът се ресуспендира с 15 мл.стерилен физиологичен разтвор;

9.3.2.3.2.8. Центрофугира се на 3000 x g за 15 мин.

9.3.2.3.2.9. Супернатантата се отлива, а със седимента се инокулират две епруветки среда на Löwenstein-Jensen. Методът не е подходящ при инкулиране на MGIT.

9.3.2.4. Метод с N-ацетил-L-цистеин-NaOH (NALC)

Този метод е най-широко разпространен и може да се възприеме като „златен стандарт“. NALC е муколитичен агент, осигуряващ бързо втечняване на храчката и даващ възможност на деконтаминиращия агент NaOH да се използва и в по-ниска

крайна концентрация – 1%. NALC, обаче, губи активността си бързо в разтвор, затова е необходимо деконтаминантът NALC-NaOH да се приготвя в готов вид само за деня.

9.3.2.4.1. Реактиви за приготвяне на деконтаминант NALC-NaOH

Предлага се и като готов за употреба продукт. Представлява прозрачна пластмасова бутилка със сепариран в ампула NALC, плуваща в NaOH. Преди работа се счупва ампулата, смесва се добре с NaOH и е готов за употреба. Трайността на разтвора е 24 часа и не трябва да се използва след това.

Когато не се използва готов за употреба продукт, деконтаминантът и фосфатният буфер могат да бъде приготвени и по следната рецепта:

9.3.2.4.2. Необходими консумативи:

9.3.2.4.2.1. Банки от 500 мл и 1000 мл – стерилни;

9.3.2.4.2.2. Стъклени шишета – 100 мл – стерилни;

9.3.2.4.2.3. NaOH;

9.3.2.4.2.4. Натриев цитрат (Na citras);

9.3.2.4.2.5. NALC;

9.3.2.4.2.6. Монокалиев фосфат;

9.3.2.4.2.7. Двунатриев фосфат;

9.3.2.4.2.8. Дестилирана вода;

9.3.2.4.2.9. Ленти за измерване на pH;

9.3.2.4.3. Преди приготвянето на деконтаминанта:

9.3.2.4.3.1. Надписват се всички банки и шишета върху стъклената част, а не върху капачката така, че ясно да се вижда коя банка е с NaOH, коя – с фосфатен буфер;

9.3.2.4.3.2. Претегля се необходимото количество – 0,5г NALC и се поставя в стерилно шише. Върху него се поставя надпис: вид, количество, дата;

9.3.2.4.3.3. Преди работа се приготвя деконтаминант *ex tempore* в стъклено шише, като се надписват: вид на съдържанието, дата на приготвянето му;

Приготвеният деконтаминант (NALC-NaOH) след внимателно разклащане се употребява само в работния ден (в който е приготвен) – 100мл След работа шишето се измива и се автоклавира. При необходимост количествата могат да се преизчислят за по-малък или по-голям обем деконтаминат.

9.3.2.4.4. Процедура по приготвяне на деконтаминанта

9.3.2.4.4.1. В предварително приготвен стъклен цилиндър се поставят 40г NaOH и се заливат с 1000мл дестилирана вода;

9.3.2.4.4.2. Добавят се 29 гр. натриев цитрат и се разбърква до изчезване на утайката. Така в 1 литър се съдържат 4% NaOH и 2,9% натриев цитрат;

9.3.2.4.4.3. Разлива се в 500 мл плоскодънни колби и се автоклавира на 121°C за 15-20 мин. Автоклавираните колби след изстиване се поставят в шкафове за съхранение, надписани върху стъклената част (не върху капачката);

9.3.2.4.4.4. Преди започване на работа (половин час по-рано) в предварително стерилизираните шишета от 100мл се поставя 0,5 г NALC и се залива с 100мл 4% NaOH, приготвена по гореописания начин (от 500мл колба). Разклаща се внимателно до разтваряне на субстанцията. Деконтаминантът е готов за работа. Крайната концентрация е 2% NaOH. Той може да бъде направен и във вариант 1% NaOH, за по-щадяща обработка.

9.3.2.4.5. Приготвяне на фосфатен буфер с pH 6,8:

9.3.2.4.5.1. В колба от 1л се поставят 4,54 г. KH_2PO_4 и 4,74 г. Na_2HPO_4 . Заливат се с 1000мл дестилирана вода;

9.3.2.4.5.2. Автоклавира се за 30 мин. на 121°C;

9.3.2.4.5.3. Надписват се самите колби (не тапите им);

9.3.2.4.5.4. След изстиване се поставят в шкаф за съхранение, готови за работа.

9.3.2.4.5.5. Преди употреба ежедневно се проверява всяка разпечатана колба с фосфатен буфер - рН трябва да е 6,8-7,0.

9.3.3. Процедура по деконтаминация

Процедурите по деконтаминацията и посявката се осъществяват задължително в ламинарен бокс клас 2. Поради това всички необходими реактиви и консумативи се поставят предварително в ламинарния бокс. Единствено антиаерозолната охлаждаща центрофуга се намира извън ламинарния бокс.

9.3.3.1. В конична центрофужна епруетка тип Falcon (50 мл, градуирана, с винтова капачка) се поставят не повече от 10 мл от материала;

9.3.3.2. Прибавят се NALC-NaOH в еквивалентно количество (напр. ако материалът е 5 мл, се прибавят 5 мл NALC-NaOH). При прибавяне на деконтаминанта се внимава да не се докосва ръба на епруетката, за да не се допусне кръстосана контаминация;

9.3.3.3. Сместа се хомогенизира на вортекс на бавни обороти за 20-30 сек. Това ще разруши мукуса. Епруетката се обръща няколко пъти, за да се осигури втечняване и деконтаминация на целия материал. При наличие на флокули да се сложи отново във вортекс до окончателно хомогенизиране. При някои материали може да е необходимо допълнително добавяне на кристали NALC за пълно втечняване;

Епруетките да са с плътно затворени капачки. Ползването на вортекс да е внимателно, за да не се образува пяна. Разпенването може да инактивира NALC.

9.3.3.4. Епруетките се инкубират на стайна температура за 15 мин. Да се използва таймер;

9.3.3.5. Отваря се внимателно капачката и материалът се разрежда до 40мл със стерилен фосфатен буфер. Фосфатният буфер спира процеса на деконтаминация и подобрява седиментацията на туберкулозните бактерии. При добавянето на фосфатен буфер се внимава да не се допуска кръстосана контаминация;

9.3.3.6. Разбърква се добре чрез обръщане на епруетката, за да се осигури неутрализиране на NaOH по цялата епруетка. Епруетките се поставят в антиаерозолните кошници, свалени от центрофугата, затварят се антиаерозолните капаци на съответните кошници и едва тогава се изнасят една след друга от ламинарния бокс и се поставят в антиаерозолната центрофуга. Центрофугира се на 3000 x g за 15 мин;

9.3.3.7. След приключване на центрофугирането антиаерозолните кошници се свалят от центрофугата, отнасят се в ламинарния бокс, където се отварят капациите им. Епруетките се изваждат внимателно, без да се разклащат. Кошниците се затварят и се изнасят от ламинарния бокс. Супернатантата се отлива внимателно, за да не се отлее седимента. При някои материали с биден седимент може да се използва стерилна пипета. За отливане е желателно да се използват еднократни съдове за инфекциозни отпадаци, с добре затварящи се капаци, които след като се напълнят, да се автоклавира. След приключване на процедурата ръбът на епруетката се изтрива с индивидуален памучен тампон, напоен с дезинфектант или 70% етилов алкохол, като се внимава да не попада вътре в епруетката с материала;

9.3.3.8. Утайката се ресуспендира с 1-2 мл фосфатен буфер;

9.3.3.9. От ресуспендираната утайка със стерилна Пастъорова пипета (еднократна) се взема материал за микроскопски препарат и посявка (в 2 епруетки твърда и 1 епруетка течна хранителна среда). Първо се отпипетира материал за посявката и едва след това за микроскопския препарат. Процедурата никога не се

извършва в обратен ред, за да не се замърси материала за посевка. Пастъровите пипети да не се заместват със спринцовки с игли или с пипети със засмукване с уста.

9.3.4. Концентрация

Задължителен етап от предварителната обработка на материалите. Следва деконтаминацията и има за цел да ускори седиментирането на туберкулозните бактерии и по този начин да увеличи концентрацията им в единица обем. При течни материали в голям обем или при материали с ниско съдържание на туберкулозни бактерии концентрация се извършва двукратно (преди и след деконтаминацията). Тя може да бъде единствен етап при предварителната обработка на асептично взети материали от стерилни области. Осъществява се чрез центрофугиране. Основните изисквания за центрофугата са: да е антиаерозолна, охлаждаща, и да е с гнезда, побиращи конични епруветки тип Фалкон. От съществено значение при микобактериите са стойностите на относителната центрофугираща сила (RCF) и времето за центрофугиране. Те трябва да бъдат стриктно спазвани. Ниска центрофугираща сила или недостатъчно време могат да доведат до значима загуба на микобактерии.

Смята се, че относителната центрофугираща сила трябва да бъде $3000 \times g$ за 15 мин. $RCF = 3000 \times g$ осигурява седиментация на 95% от микобактериите в материала. Относителната центрофугираща сила е мярка за ефективността на седиментацията, а не скоростта. Скоростта трябва да бъде изчислена за всяка отделна центрофуга по формулата:

$$RCF = 1,12 \times R \text{ (mm)} \times (\text{rpm} / 1000)^2,$$

където R е разстоянието от центъра на ротора до дъното на гнездото на центрофугата.

Друг важен показател е температурата по време на центрофугиране. В зависимост от типа на ротора и броя на оборотите при нехладилните центрофуги температурата в епруветката с материал може да се увеличи с $4-18^{\circ}\text{C}$ и да достигне стойности до $38-40^{\circ}\text{C}$. Това намалява ефекта на центрофугиране и може да убие до 30% от туберкулозните бактерии. Увеличаването на времето на центрофугиране също води до повишаване на температурата.

Центрофужните епруветки трябва да бъдат добре балансирани при центрофугиране! Препоръчително е това да става със 70° спирт, а не с дестилирана вода.

9.3.4.1. Основни правила, които строго трябва да се спазват при предварителната обработка на материалите:

9.3.4.1.1. Да се работи асептично, за да не се допусне контаминация;

9.3.4.1.2. Времето на смилане и деконтаминация да бъде строго контролирано;

9.3.4.1.3. Пробите да се работят в комплект според броя на гнездата на центрофугата;

9.3.4.1.4. Да не се държат отворени контейнери и центрофужни епруветки в ламинарния бокс;

9.3.4.1.5. Да се обработва само 1 материал (само 1 контейнер и съдът за деконтаминация да са отворени едновременно);

9.3.4.1.6. Стъклата за микроскопиране да се приготвят след като всички среди са били инокулирани;

9.3.5. Инокулация

Преди инокулация епруветките с хранителна среда трябва да бъдат внимателно прегледани. Кондензната течност трябва да бъде премахната.

От всеки клиничен материал трябва да се инокулират по 2 епруветки твърда и по 1 епруветка течна хранителна среда. Ако се подозира *M. bovis*, трябва да се прибави и епруветка твърда хранителна среда с пируват.

Посявката върху среда на Löwenstein-Jensen се прави от неутрализирания или ресуспендиран след деконтаминацията седимент (виж т. 9.3.3.). Инокулацията може да се извърши с стерилна Пастъорова пипета (еднократна) по 0,2-0,4 мл. или еднократно стерилно йозе с диаметър 5 мм (2-4 капки) или

Посявката в течна MGIT среда се прави с ресуспендиран седимент. Предварително към епруветката с течна среда се прибавя 0,8 мл суплемент (виж т. 9.2.5.2.3.) Инокулацията се извършва със същата стерилна еднократна Пастъорова пипета в обем 0,5 мл. На всяка епруветка се записва с перманентен маркер или се залепва стикер с ясно изписани:

9.3.5.1 Лабораторен номер, съответстващ на вписаната проба в лабораторния журнал.

9.3.5.2. Датата на извършване на посявката.

9.3.5.3. Инициалите на пациента.

При всяка посявка внимателно се проследява да има съответствие между лабораторния номер на контейнера с деконтаминиран материал и епруветките с хранителната среда (2 епруветки със среда на Löwenstein-Jensen и посявката върху течната хранителна среда). Епруветките се подреждат на стативи, като за всеки ден е предвиден отделен статив.

9.3.6. Инкубиране

Препоръчително е използването на термостат или термостатна стая с няколко стелажа, тъй като така посетите среди се култивират 8 седмици. Необходимо е да се поддържа температура в интервала 35-37°C, като ежедневно се проследява, дали тя е в посочените рамки. В термостатната стая се поставя съд с вода за поддържане на влажността. Да се внимава, да не пострадат културите от продължителен престой при много по-ниска или много по-висока температура. При материали от кожни лезии, суспектни за *M. marinum*/*M. ulcerans*, допълнително 2 епруветки се култивират на 25-30°C. Препоръчително е епруветките да се инкубират в наклонено положение поне в продължение на 24 часа, за да се осигури добро разпределение на инокулума по повърхността на наклонения стълбец. Препоръчва се в началото на инкубационния период капачките на епруветките да не се затварят плътно, за да се осигури добра аерация. Агаровите среди изискват 5-10% CO₂.

9.3.7. Оценка на растежа

При престояването си в термостат в продължение на 8 седмици (56 дни), културите трябва да се преглеждат периодично. Всички култури трябва да се прегледат 72 часа след инокулацията, за да се установи, че течността е напълно изпарена, че капачките са затворени плътно с цел да не се изсушават средите, и да се открият контаминантите. Ако контаминацията засяга повече от 5% от посявките за деня, да се анализират всички етапи на работата и да се провери за евентуални грешки при деконтаминацията. Целта е да се открие източника на грешка, за да не се замърсяват посявки и през следващите дни. При този преглед първично контаминираниите посявки се отстраняват. Препоръчва се преди отстраняването на замърсените епруветки (и тяхното автоклавиране), да се направи препарат по Ziehl-Neelsen, ако морфологията на прораслите колонии наподобява морфологично coloniите на микобактериите. Обикновено контаминираниите епруветки са: потъмнели (цветът на средата от бледозелен се променя в син); с наличие на неспецифичен бактериален растеж; средата се втечнява (понякога се обезцветява до жълта).

Проверката на културите продължава всяка седмица с цел да се открият навреме бързо растящите микобактерии. *M. tuberculosis* образува видими колонии най-рано след седмица, а добре оформени колонии с характерна морфология – след 2-3 седмици. Ако резултатът е отрицателен, той се съобщава след 56-я ден. Понякога *M. bovis* може да

даде много фин растеж на 8-та седмица в обикновена среда на Löwenstein-Jensen. При положителен резултат (след положителен препарат за КУБ и идентификационни тестове за определяне до *M. tuberculosis complex* или NTM) той се оценя по количествената скала (Таблица 6) и се съобщава на клинициста.

9.3.7.1. Количествена оценка на културите на твърда хранителна среда

Количествената оценка на културите може да бъде направена само твърда хранителна среда, съгласно Таблица 6.

Таблица 6: Количествена оценка на културите

Наличие на растеж	Формулировка на отговора
Няма растеж	(-) отрицателен резултат
Под 10 колонии	Записва се точният брой на колонииите
10-100 колонии	(1+) положителен резултат
Над 100 колонии	(2+) положителен резултат
Неизброими или конфлуиращ растеж	(3+) положителен резултат

Ако степента на растеж в двете епруветки Löwenstein-Jensen е различна, се съобщава по-високата.

9.3.7.2. Морфологична характеристика на туберкулозните бактерии

Морфологията на колоните на *M. tuberculosis* е характерна. Те са сухи, грапави, набръчкани колонии (R-форма) и изглеждат като трохи хляб или цветно зеле, с белезникав, бледо сламено жълт до кремав цвят. Те обикновено силно проминират над нивото на средата, трудно се отделят от нея и респ. трудно се суспендират в дестилирана вода (за това обикновено са необходими стерилни перли и вортекс). Понякога прорастват по стената на епруветката. За разлика от тях колонииите на NTM са обикновено пигментирани от наситено бяло до жълто, интензивно оранжево или керемидено-червено, в зависимост от вида им; лесно се отделят от хранителната среда; с мека кремообразна, понякога лигава консистенция, като лесно се суспендират в дестилирана вода (образуващи равномерна мътна).

9.3.7.3. Отчитане на растежа в течна MGIT среда

Отчитането се осъществява автоматично, като се следват инструкциите на производителя (виж т. 9.2.5.2.). Ако не се отчете флуоресценция, пробите се изписват като отрицателни. При положителни проби – задължително се прави препарат за КУБ и прави видова идентификация до *M. tuberculosis complex*, посочена в т.10.

9.3.7.4. Изисквания към готовите резултати от културелното изследване:

9.3.7.4.1. Наличието на бактериален растеж в твърдите и течните хранителни среди не е достатъчно условие за даването на положителен резултат. Освен характерната морфологична характеристика, трябва да се установи наличието на КУБ чрез препарат от културата, с последващи идентификационни тестове за *M. tuberculosis complex*, посочени в т.10;

9.3.7.4.2. Положителният резултат да бъде записан с червен химикал, ясно и отчетливо в бланката-резултат и в лабораторния журнал, като качествен и количествен резултат;

9.3.7.4.3. Информация за резултатите от микробиологичното изследване за туберкулоза не се съобщават на пациентите по телефона;

9.3.7.4.4. Всички положителни резултати се съобщават не само писмено, а и устно (по телефона) на лекаря от съответното лечебно заведение, изпратил материала, или на личния лекар

9.3.7.4.5. Всички положителни резултати се съобщават в РЗИ с бързо известие, съгласно Наредба № 21 от 2005г. за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести;

9.3.7.4.6. Да не се допуска предаването на положителен резултат директно на пациента преди да е уведомен лекарят, изпратил материала.

9.3.7.4.7. Да НЕ се отбелязват еднакво резултатите от микроскопското изследване и посаяката като: БК (+) положителен (остаряло понятие, което не отговаря на съвременната таксономия и класификация на микроорганизмите)

9.3.7.4.8. Всички положителни резултати задължително трябва да бъдат подписани от завеждащия лабораторията и да бъде поставена датата на отчитане на посаяката

9.3.7.5. Източници на грешки при културелно изследване за туберкулоза. Фалшиво положителни резултати:

9.3.7.5.1. Кръстосана контаминация – от медицински инструменти (бронхоскоп);

9.3.7.5.2. Лабораторна кръстосана контаминация;

9.3.7.5.3. Грешки в етикирането или надписването;

9.3.7.5.4. Пациенти, които имат само една позитивна култура (особено ако растежът е само в една от 2-те епруветки), трябва да се проследят за фалшиво положителен резултат.

9.3.7.6. Източници на грешки при културелно изследване за туберкулоза. Фалшиво отрицателни резултати:

9.3.7.6.1. Лошо качество на материала;

9.3.7.6.2. Неправилно съхранение на материала;

9.3.7.6.3. По-продължителна и груба деконтаминация;

9.3.7.6.4. Лошо качество на хранителните среди.

9.3.7.7. Съхранение на шамове

Всички изолирани шамове в лабораторията трябва да се съхраняват в лабораторията за период от две календарни години – предходната и настоящата.

9.3.7.7.1. Краткотрайно съхранение

В хладилник, при температура от 2 до 8°C, на твърда яйчна среда културата се запазва жизнеспособна за 1 година.

9.3.7.7.2. Дълготрайно съхранение

Взема се колкото е възможно по-голяма маса от яйчната среда и се суспендират в 2 мл криоепруветка, съдържаща 1,5 мл Middlebrook 7H9, 10% skim milk (автоклавирани на 110°C за 10 мин.) или 5% глицерол в 0,85% NaCl (автоклавиран на 121 °C за 15-20 мин.);

9.3.7.7.2.1. Във фризер при температура: -18°C се съхраняват до няколко години.;

9.3.7.7.2.1. Във фризер при температура: -70°C се съхраняват до няколко десетилетия.

10. Видова идентификация на микобактериите

Род *Mycobacterium* е единственият род в семейство *Mycobacteriaceae*; подразред *Corynebacterinae*; разред *Actinomycetales*; подклас *Actinobacteridae*; клас *Actinobacteria*; раздел *Actinobacteria*. Видовете микобактерии от рода са над 180 вида и могат да бъдат категоризирани в следните три големи групи (за практическите цели на диагностика): *M. tuberculosis complex* (MTC); *M. leprae* и нетуберкулозни микобактерии (NTM).

МТС включва видовете: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG – ваксинален щам, *M. canettii*, *M. microti* и *M. pinnipedi*. С изключение на *M. bovis* BCG (ваксинален щам), всички те са патогенни за хората, като най-честите причинители на туберкулоза са първите три вида от МТС. Останалите видове са изолирани при случаи, свързани с Африка (*M. canettii*) и при имunosупресирани пациенти (*M. microti*).

Микобактериите са широко разпространени в околната среда: почва, скали, вода, а способността им да образуват биофим им позволява да персистират в тръби и системи с топла и студена вода, медицинско оборудване и инструментариум и др., Фенотипните характеристики, като растежно ниво и пигментообразуване, са в основата на класификацията на Runyon, която разделя NTM на четири групи:

I група: Фотохромогенни бавнорастящи – продуцират жълт до оранжев пигмент при експозиция на светлина и изискват повече от 7 дни, за да се появи растеж на твърда среда.

II група: Скотохромогенни бавнорастящи – продуцират пигментирани колонии в отсъствие на светлина и изискват повече от 7 дни, за да се появи растеж на твърда среда.

III група: Нефотохромогенни бавнорастящи – продуцират непигментирани колонии на тъмно, които остават непигментирани и след излагане на светлина и изискват повече от 7 дни, за да се появи растеж на твърда хранителна среда.

IV група: Бързорастящи – образуват колонии на твърда среда за по-малко от 7 дни.

Могат да бъдат хромогенни и нехромогенни.

Микробиологичните лаборатории, осъществяващи културелно изследване за туберкулоза, трябва да отдиференцират МТС от NTM, тъй като това има определящо значение при избора на подходяща терапия. Точното определяне до вид вътре в комплекса има по-скоро епидемиологично значение и в рутинната практика не се налага. При необходимост тази идентификация се осъществява в НРЛ ТБ, НЦЗПБ.

Идентификацията до група NTM трябва да се извършва в културелните лаборатории, базирайки се на фенотипната характеристика на колонии, препаратите за КУБ и някои биохимични и физични отнасяния. За конкретна видова идентификация следва щамовете NTM да се изпращат в НРЛ ТБ, където освен посочените по-горе методи се използва и линейно хибридационен анализ (Приложение № 9: Форма на съпроводително писмо изпращане на материал (щам) за микробиологично изследване за туберкулоза в НРЛ ТБ и Приложение № 10: Форма за изпращане на отговор на НРЛ ТБ с резултат от молекулярно-генетично изследване за туберкулоза/микобактерии). Идентификацията на izolата до МТС и разграничаването му от NTM трябва да се извърши преди да се осъществи ТЛЧ, тъй като стандартната оперативна процедура за определяне на лекарствената чувствителност се отнася само за *M. tuberculosis*.

Примерна схема за идентификация на микобактериите е представена в Таблица 10. Тестове за отдиференциране на МТС и NTM от положителна култура ЛЙ и/или MGIT.

Таблица 10. Тестове за отдиференциране на МТС и NTM от положителна култура ЛЙ и/или MGIT

Метод	Резултат	МТС	NTM
	Нежни червени пръчки; гранулирани или хомогенни; образуващи	ДА	НЕ

1.	Препарат по Ziehl-Neelsen за КУБ от положителни ЛЙ и/или MGIT	конгломерати от бактерии или групирани в корд-фактор; V-образни; с изразен полиморфизъм		
		Къси или дълги, груби и дебели червени пръчки; равномерно разпръснати по цялото зрително поле	НЕ	ДА
2.	Растежна характеристика	Бавно растящи > 7 дни	ДА	ДА
		Бързо растящи < 7 дни	НЕ	ДА
3.	Пигментообразуване	Белезникав, бледо сламено жълт до кремав цвят	ДА	ДА
		Наситено бяло до ярко жълто, интензивно оранжево или керемидено-червено	НЕ	ДА
4.	Морфологията на колоните на ЛЙ	Сухи, грапави, набръчкани колонии (R-форма) с вид на трохи хляб или цветно зеле. Силно проминиращи над нивото на средата, срастнали с нея, трошливи. Прорастват по стената на епруветката.	ДА	НЕ ¹
		Гладки, плоски колонии (S-форма). Лесно се отделят от хранителната среда. С мека кремообразна, понякога лигава консистенция.	НЕ	ДА/НЕ
5.	Растеж в MGIT	Позитивиралата среда е бистра, с разпръснати бели флокули с вид на снежинки.	ДА	НЕ
		Позитивиралата среда е равномерно мътна.	НЕ	ДА
6.	Изготвяне на суспензия в дестилирана вода	Колониите трудно се отделят от ЛЙ и много трудно се суспендират в дестилирана вода. Образуват флокули, които трудно се разбиват.	ДА	НЕ
		Колониите лесно се суспендират в дестилирана вода и образуват равномерна мътна	НЕ	ДА
7.	Чувствителност на културата към пара	Чувствителност	ДА	НЕ

	нитро бензоена киселина	Резистентност	НЕ	ДА ²
8.	Имунохроматографски тест	Положителен	ДА	НЕ
9.	Ниацинов тест	Положителен	ДА	НЕ ³
10.	Растеж в среда с натриев салицилат	Има растеж	НЕ	ДА
11.	Редукция на нитрати в нитрити	Редуцира нитратите в нитрити	ДА ⁴	ДА
12.	Амплификационни ⁵ методи за видова идентификация	LPA, Real Time PCR	ДА	ДА

¹ Някои NTM могат да образуват колонии в R-форма и SR-форма

² с изключение на *M. gastrii*

³ с изключение на *M. simiae, M. marinum, M. chelonae*

⁴ с изключение на *M. bovis*

⁵ Амплификационните методи са посочени в глава Амплификационни методи за диагностика на туберкулозата

10.1. Препарат по Ziehl-Neelsen за КУБ от положителна култура на твърда и/или течна среда

10.1.1. КУБ положителните бактерии, суспектни за МТС изглеждат като нежни червени пръчки; гранулирани или хомогенни; образуващи конгломерати от бактерии или са групирани в характерни струпвания, т. нар. корд-фактор; V-образни; с изразен полиморфизъм. При определени условия някои NTM, като *M. kansasii, M. marinum, M. fallax, M. chelonae* и др. също могат да образуват корд-фактор. *M. avium* не образува.

10.1.2. КУБ положителните бактерии, суспектни за NTM най-често са: къси или дълги, груби и дебели червени пръчки; равномерно разпръснати по цялото зрително поле, с изразена полихромазия.

10.1.3. Само чрез микроскопски препарат за КУБ не могат да бъдат разграничени МТС от NTM.

10.2. Минимални изисквания за идентификация

10.2.1. Чиста култура;

10.2.2. Култура поне с 20 колонии. При по-малък брой колонии трябва да се субкултивира.

До скоро идентификацията на микобактериите се осъществяваше предимно с конвенционални методи, базирани на растежните характеристики, като: бързина на растеж; пигментообразуване; морфология на колонии; оптимална температура на растеж и биохимични тестове. Днес към тези тестове се прибават и имунохроматографските и молекулярно-генетични тестове.

10.3. Растежни характеристики

10.3.1. Бързина на бактериален растеж. Принцип и отчитане

Всички микобактерии, показали растеж до 7-ия ден от началото на култивирането трябва да се квалифицират като бързо растящи. Това налага преглеждане на растежа след 24-я час, ежедневно до 7-я ден и препарат за КУБ, т.е. растежа не следва да се третира като контаминант, без това да е доказано чрез препарат.

10.3.2. Образуване на пигмент и фотореактивност

Продукцията или липсата на пигментообразуване на тъмно и при интензивна дневна светлина при различните видове микобактерии определя цвета на колонииите, който варира: от наситено бял, белезникав, бледо сламено жълт, кремав, ярко жълт, интензивно оранжев или керемидено-червен. Пигментообразуването е в основата на посочената по-горе класификация на Runyon.

10.3.3. Морфология на колонииите

10.3.3.1. Морфологията на колонииите върху твърда хранителна среда

10.3.3.1.1. При МТС колонииите са най-често: сухи, грапави, набръчкани колонии (R-форма) с вид на трохи хляб или цветно зеле. Силно проминират над нивото на средата, срастнали са с нея и при опит да се отделят са силно трошливи. Обикновено прорастват по стената на епруветката;

10.3.3.1.2. При NTM колонииите често са гладки, плоски (S-форма), дребни или поедри, лесно се отделят от хранителната среда и са с мека кремообразна, понякога лигава консистенция. Някои NTM, обаче, образуват колонии в R и SR-форма;

10.3.3.2. Растеж в течна хранителна среда (MGIT)

10.3.3.2.1. При МТС: позитивиралата среда е бистра, с разпръснати бели флокули с вид на снежинки;

10.3.3.2.2. При NTM: позитивиралата среда е равномерно мътна, наподобяваща например мътнината на *E.coli*.

10.3.3.3. Изготвяне на суспензия в дестилирана вода.

10.3.3.3.1. При МТС: колонииите трудно се отделят от твърдата среда и много трудно се суспендират в дестилирана вода. Образуват се флокули, които трудно се разбиват.

10.3.3.3.2. При NTM: колонииите, обикновено лесно се суспендират в дестилирана вода и образуват равномерна мътнина.

10.3.4. Оптимална температура на растеж

10.3.4.1. *M. tuberculosis* расте при 35-37°C;

10.3.4.2. Някои NTM могат да растат в широк температурен диапазон: 25-42°C;

10.3.4.4. При изолати от кожни лезии се инокулират 2 двойки епруветки, които се инкубират паралелно на 25-30°C и на 37°C във връзка с температурните изисквания на *M. marinum* (ев. *M. mageritense*).

10.4. Биохимични тестове

10.4.1. Ниацинов тест

10.4.1.1. Принцип

Ниацинът е метаболитен продукт на микобактерииите. Поради ензимен дефицит *M. tuberculosis* и малка част от другите микобактерии не трансформират свободния ниацин в ниацин-рибонуклеотид. Водноразтворимият ниацин акумулира в яйчни среди и при взаимодействие с цианогенбромид формира цветен продукт. Културелният растеж на средата на Löwenstein-Jensen дава най-добри резултати и затова тя се препоръчва за провеждане на теста. Културата трябва да бъде поне на 3-4 седмици и да има обилен растеж. Поради токсичността на реактивите се използват само комерсиални тестове с предварително импрегнирани филтърни ивици, като процедурата трябва да бъде съобразена с изискванията на производителя.

10.4.1.2. Процедура:

10.4.1.2.1. Добавя се 1 ml стерилен физиологичен разтвор към епруетка със свежа бактериална култура. При наличие на конфлуентен растеж средата трябва да се пунктира с Пастъророва пипета с цел осъществяване на контакт между повърхността на средата и физиологичния разтвор.

10.4.1.2.2. Епруветката се поставя хоризонтално, така че течността да покрива цялата повърхност на средата;

10.4.1.2.3. Престоява 30 минути, за да се екстрахира ниацина, като при бедни култури времето на екстракция се удължава;

10.4.1.2.4. Епруветката се изправя за 5 минути, за да може течността да се оттече на дъното и 0,5 ml от течността се прехвърля в чиста епруветка с винтова капачка;

10.4.1.2.5. С всяка серия тестове трябва да се пускат положителна и отрицателна контроли.

10.4.1.2.5.1. Положителна контрола: поставя се 0,6 мл стерилна дест. вода или физ.р-р в епруветка, като се добавя готовата контрола (най-често диск) и се разклаща леко 3 пъти в продължение на 15 мин. Епруветката се оставя на стайна температура.

10.4.1.2.5.2. Отрицателна контрола: поставя се 0,6 мл стерилна дест. вода или физ.р-р в епруветка в мястото на екстракта.

10.4.1.2.6. Тестовата лента (импрегнирана филтърната ивица) се поставя със стрелката надолу в епруветките с пробата и контролите, като се използва фламбирана пинсета.

10.4.1.2.7. След поставянето на тестовата лента епруветките незабавно се затварят плътно и се държат в изправено положение. След това епруветките се разклащат леко, така че да се размеси течността с реагента в края на лентата, без да се накланя, като това се повтаря след 5-10 мин. Епруветката се оставя за 15- 20 мин. на стайна температура, но не повече от 30 мин. Цветът на течността в епруветките се сравняват на бял фон

10.4.1.3. Отчитане на резултата

10.4.1.3.1. При положителен тест се появява жълт цвят на течността в тестовата култура еднакъв с този в позитивната контрола

10.4.1.3.2. При отрицателен тест течността в тестовата култура остава без цвят както и отрицателната контрола.

Да не се обръща внимание на цвета на хартиената лента. Той може да се дължи на оксидация на химичните вещества, особено на върха на лентата. След отчитане на теста хартиената лента трябва да се неутрализира с 10% натриева основа или да се изхвърли в алкален дезинфектант.

10.4.2. Нитрат редуктазен тест

10.4.2.1. Принцип: *M. tuberculosis*, както и някои NTM, притежават ензима нитрат-редуктаза, който редуцира нитратите до нитрити, чието присъствие се доказва посредством колориметрична реакция, вследствие добавянето на определени реактиви. От всички микобактерии нитрат-редуктазната активност е най-силно изразена при *M. tuberculosis*. Това позволява използването на този тест заедно с ниациновия за видова идентификация на *M. tuberculosis*.

Културите, които ще бъдат тествани, трябва да бъдат на 4 седмици и с достатъчен растеж. Съществуват няколко метода: класически тест по Bönicke, метод върху Löwenstein-Jensen (по Калфин), и метод с тест ленти (готови комерсиални или приготвени в лабораторията). В България се използват предимно нитрат редуктазния тест по Калфин и метода с тест ленти.

10.4.2.2. Нитрат редуктазен тест по Калфин

Преди коагулирането средата на Löwenstein-Jensen се добавя калиев нитрат с крайна концентрация 0,1% и отчитането става с реактив на Грис, като при наличие на редукция на нитрати в нитрити се наблюдава колориметрична реакция – ярко малиново оцветяване. Този тест е в основата на ТЛЧ по Калфин и е подробно описан там.

10.4.2.3 Нитратен тест с хартиени ленти

Напълно сравним с тестовете с химични реактиви, но по-лесен за изпълнение.

Лентите могат да се приготвят в лабораторията или да се използват като готов фирмен продукт.

10.4.2.3.1. Процедура

10.4.2.3.1.2. В стерилна епруветка с винтова капачка се поставя 1 мл. стерилен физиологичен разтвор.

10.4.2.3.1.3. С 2 пълни йозета 4-седмична култура се прави емулсия.

10.4.2.3.1.4. Със стерилна пинцета се поставя хартиената лента със стрелката надолу. Лентата да не се мокри с течност от стените на епруветката

10.4.2.3.1.5. Епруветката се затваря плътно и се инкубира във вертикална позиция на 37°C в продължение на два часа.

10.4.2.3.1.6. Един час след инкубацията епруветката се разклаща внимателно, а след 2 часа епруветката се обръща неколkokратно, за да се намокри цялата тестова лента.

10.4.2.3.1.7. Епруветката се оставя наклонена за 10 мин., така че течността да покрие тестовата лента.

10.4.2.3.2. Отчитане на резултата

Наблюдава се горната част на лентата за промяна в цвета към светло- до тъмносин.

10.4.2.3.2.1. Положителен резултат – светло- до тъмносин цвят в горната част на лентата.

10.4.2.3.2.2. Отрицателен резултат – без промяна в цвета.

При провеждане на теста стриктно трябва да се спазват инструкциите на производителя.

10.4.3. Тест за изпитване на чувствителност към пара-нитробензоена киселина (p-NBA) в среда на Löwenstein-Jensen и в MGIT среда

10.4.3.1. Тест с pNBA в среда на Löwenstein-Jensen

10.4.3.1.1. Принцип

Паранитробензоената киселина инхибира растежа на представителите на *M. tuberculosis complex* почти напълно, докато другите микобактерии показват слабо или никакво подтискане.

10.4.3.1.2. Реактиви

p-NBA 50 мг

NaOH 4% разтвор

HCl 6% разтвор

Дестилирана вода

10.4.3.1.3 Процедура

Разтварят се 50 мг паранитробензоена киселина, като се добавят 5 мл дестилирана вода и 1 мл 4% натриева основа до pH=8. След пълното разтваряне на p-NBA се добавят 2-3 капки 6% HCl до pH=7. Полученият разтвор се прибавя към 95 мл предварително филтрирана яйчна среда. Крайната концентрация на паранитробензоената киселина в средата е 500 мкг/мл. Средата се разлива в епруветки и се коагулира на 85°C за 45 мин.

10.4.3.1.4. Приготвяне на инокулума: От растеж върху твърда хранителна среда със стерилна дестилирана вода се изготвя суспензия, стандартизирана с 1 Mc Farland. От суспензията се приготвя разреждане 10^{-2} ; и средата се инокулира с 0,2 мл от разреждането.

10.4.3.1.5. Отчитане на резултата:

В процеса на инкубация при 37°C посявките се преглеждат за наличие на растеж на 3-ия, 7-ия, 14-ия и 21-ия ден. Като контрола се използва среда на Löwenstein-Jensen без p-NBA.

10.4.3.2. Тест с pNBA в MGIT среда

Тестът е модифициран в MGIT среда, където p-NBA подтиска растежа на *M. tuberculosis complex*, в резултат на което намалява кислородната продукция. Тестът се провежда и отчита в автоматизирана система BACTEC.

10.4.3.2.1.1. Принцип на метода:

Тестът се осъществява в течна MGIT среда, където pNBA потиска растежа на *M. tuberculosis complex*, в резултат на което намалява кислородната продукция. За разлика от *M. tuberculosis complex*, NTM са резистентни към pNBA и растат в нейно присъствие.

10.4.3.2.1.2. Необходими реактиви:

Пара-нитро-бензоена киселина (pNBA), OADC/PANTA суплемент, течна хранителна среда MGIT и стерилен физиологичен разтвор. За провеждането на теста се изискват 2 броя MGIT епруветки: контролна GC епруветка (Growth Control) и работна епруветка – инокулирана с инокулум (получен от течна или 14 дневна твърда култура). Инокулумът следва да бъде чиста култура. В двете епруветки се добавя 500 мкл OADC/PANTA суплемент. В тест епруветката се добавя 100 мкл пара-нитро-бензоена киселина. Изготвянето на пара-нитро-бензоена киселина с работна концентрация 500 мкл/мл става по следния начин: 4 г. от pNBA се поставя в 80 мл стерилна вода и се добавя 1г. NaOH. Разбърква се до разтваряне. Добавят се няколко капки фенолфталеин като рН индикатор. Прибавя се капка по капка 1N HCl киселина, като се разклаща продължително до получаване на неутрален разтвор (до жълто оцветяване на разтвора). Добавя се дестилирана вода до 100 ml. Разделя се на аликвотни части по 0,5 мл. Автоклавира се на 120°C за 20 минути. Съхранява се 3 месеца на 2-8°C.

10.4.3.2.3. Процедура

Разрежданията, стандартизирането на бактериалните суспензии и инокулирането се извършва в ламинарен бокс, клас 2. Независимо от произхода на инокулума (от течна или твърда хранителна среда), етикираните 2 MGIT епруветки, за провеждането на теста, съдържат: GC епруветка: 0,5мл OADC/PANTA + 0,5 мл 1:100 стандартизирана суспензия от изследвания шам (разредена или не, в зависимост от деня на позитивиране) и Работна епруветка: 0,5 мл. OADC/PANTA + 100мкл pNBA + 0,5 мл стандартизирана суспензия (разредена или не, в зависимост от деня на позитивиране).

10.4.3.2.3.1. Приготвяне на инокулум от позитивна MGIT епруветка. По 500 мкл от позитивната MGIT епруветка (един или два дни след позитивирането ѝ) директно се инокулираха в работната епруветка без разреждане. На трети, четвърти или пети ден след позитивирането на MGIT епруветка се прави разреждане 1:5 във физиологичен разтвор с последващо иноулиране на 500 мкл в работната епруветка. Инокулумът за контролната епруветка се разрежда 1:100, в същия обем – по 500 мкл.

10.4.3.2.3.2. Приготвяне на инокулум от колонии върху твърда хранителна среда. Приготвя се суспензия, стандартизирана по 1 McFarland във физиологичен разтвор. Чрез вортексиране за 2-3 минути се разбиват твърдите колонии (прибавени са 8-10 стерилни стъклени перли с d=3 мм). Епруветката се оставя в покой за 20 минути, за да се утаят големите флокули. Супернатантата се отлива в друга стерилна епруветка и се оставя в покой за 15 минути. От нея се взема супернатантата и се прехвърля в следваща стерилна епруветка. Стандартизира се 0,5 McFarland, използвайки стерилен физиологичен разтвор. От финалната суспензия се изготвя разреждане 1:5 с физиологичен разтвор, което се използва за инокулиране на работната епруветката в обем 500мкл. Инокулумът за контролната епруветка се разрежда 1:100, в същия обем – по 500мкл.

10.4.3.2.4. Отчитане

Работната епруветка с изпитвания щам се отчита след позитивиране на GC т.е. когато тя достигне до 400 растежни единици. Ако работната епруветката с изследвания щам покаже по-малко или равно на 10 растежни единици, това означава, че този щам е чувствителен и растежът му е подтиснат от pNBA т.е. той е *M. tuberculosis complex*. Ако тествания щам покаже повече от 10 растежни единици, то той е резистентен към pNBA и расте в нейно присъствие т.е. е NTM.

10.4.4 Растеж в среда с натриев салицилат

Натриевият салицилат потиска растежа на *M. tuberculosis complex*. В среда на Löwenstein-Jensen, съдържаща натриев салицилат в концентрация 1000 мкг/мл, NTM дават богат растеж, а *M. tuberculosis complex* не растат.

10.4.4.1. Приготвяне на инокулума

От растеж върху твърда хранителна среда със стерилна дестилирана вода се изготвя суспензия, стандартизирана с 1 Mc Farland. Средата се инокулира с 0,2 мл от разреждането.

10.4.4.2. Отчитане на резултата

В процеса на инкубация при 37°C посявките се преглеждат на 3-я, 7-я, 14-я и 21-я ден за наличие на растеж. Като контрола се използва среда на Löwenstein-Jensen без натриев салицилат.

В България този тест е част от ТЛЧ по Калфин и е подробно описан там.

10.4.5. Видова идентификация чрез имунохроматографски тест

10.4.5.1. Принцип

Имунохроматографският тест е предназначен експресно качествено определяне на антиген от МТС от положителни MGIT епруветки, дали положително оцветяване за КУБ в микроскопски препарат. Препоръчаните от СЗО тестове са: BD MGIT TBc Identification Test, BD (Becton, Dickinson and Company) Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA и Capilia TB-neo, TAUNS Laboratories Co, Numazu, Japan са представени в Приложение № 11: Видове имунохроматографски тестове за МТС, препоръчани от СЗО.

Тестът открива MPT64, микобактериална белтъчна фракция, която се секретира от МТС клетките по време на култивирането им. При прибавяне на пробите към тестващото изделие MPT64 антигенът се свързва с анти-MPT64 антителата, които са конюгирани с визуализиращите частици върху тестовата лента. Ако в пробата има MPT64 антиген се получава цветна реакция с участието на белязаните златни колоидни частици и се вижда като розова до червена на цвят линия. Тестът е предназначен да идентифицира МТС от епруветки MGIT (4 мл и 7 мл), дали положително КУБ оцветяване в натривка. Наличието на КУБ в положителни епруветки MGIT трябва да се потвърди, като преди извършване на теста се направи КУБ оцветяване в натривка. Спазват се всички изисквания на производителя.

10.4.5.2. Процедура

Тестването на течната култура се извършва в ламинарен бокс, клас 2. Опаковката на теста се отстранява непосредствено преди употреба и теста се поставя на равна повърхност. Надписва се по един тест за всяка проба със съответния номер. Епруветката се разклаща внимателно или се вортексира. Използвайки стерилна пипета, 100мкл от бульонната култура се поставя обозначената за целта ямка. Изчакват се 15 мин и се отчита теста.

10.4.5.2. Интерпретация на резултатите.

10.4.5.2.1. Положителен тест – при наличие на MPT64 антиген се появява цветна розово-виолетова до червена линия на позиция „Т” и на контролната позиция „С”. Интензитета на линиите „С” и „Т” може да варира. Фонът следва да е бял или светлорозов. Резултатът се отчита като положителен за МТС

10.4.5.2.2. Отрицателен тест – при отсъствие на МРТ64 антиген отсъства розово-виолетова или червена линия на позиция „Т” и има наличие на линия само на контролната позиция „С”. Фонът следва да е бял или светлорозов. Резултат е – NTM.

10.4.5.2.3. Невалиден тест – при отсъствие на видима розово-виолетова до червена линия на контролната позиция „С”, независимо от наличието или отсъствието на линия на позиция „Т” или когато фонът на теста е по-интезивен и го прави нечетлив. Резултат не се докладва.

Амплификационни методи за видова идентификация

Методите са подробно описани в т. 12 Амплификационни методи в диагностиката на туберкулозата/микобактериите

11. Определяне на лекарствената чувствителност на *M. tuberculosis complex*

11.1. Значение на ТЛЧ

Тестът за лекарствена чувствителност на МТС към противотуберкулозни лекарства има важно значение при: определяне или коригиране на курса на лечение на конкретния болен с туберкулоза; контрола на ефективността на лечението; определяне прогнозата на заболяването; провеждането на епидемиологичен мониторинг на лекарствената устойчивост на МТС на територията на цялата страна, за Европейския регион и в световен мащаб. СЗО препоръчва няколко основни метода за ТЛЧ – стандартизирани и широко разпространени в международната практика: пропорционален метод; метод на абсолютните концентрации; метод на резистентните съотношения; чрез автоматично отчитане – Bactec Bactec MGIT; LPA – линейно хибридизационен анализ; нитрат редуктазен метод и Real Time PCR. Изборът на един или друг метод се определя от традициите в страната. В мащабите на една страна обикновено се използва един от препоръчаните от СЗО унифицирани методи с цел осигуряване на: ефективен епидемиологичен надзор над лекарствената устойчивост на туберкулозните щамове, съпоставимост на резултатите и оценка на ефективността на лечението.

В България досега традиционно се използваше само т.нар. нитратредуктазен метод. Базира се на факта, че 97% от микобактериите редуцират нитратите в нитрити (т.е. индиректен метод за определяне на резистентността на микобактериите чрез тяхната биохимична характеристика).

По-долу ще бъдат разгледани подробно: пропорционален метод – като основен метод, метод с автоматично отчитане, и нитратредуктазен метод.

11.2. Основни понятия при определяне на резистентността на МТС

При отчитане на ТЛЧ на *M.tuberculosis* се използват следните основни микробиологични понятия:

11.2.1. Чувствителност на щам към противотуберкулозно лекарство: определя се като неспособността на даден ТБ щам да расте на среда, съдържаща това противотуберкулозно лекарство при стандартни условия.

11.2.2. Резистентност (устойчивост) на ТБ щам към противотуберкулозно лекарство: снижение на чувствителността до такава степен, че даденият щам е способен да се размножава при въздействието на това противотуберкулозно лекарство в критична или по-висока концентрация. Това означава, че даден щам *M.tuberculosis* е развил определена/и генна/и мутация/и, което е довело до неефективност на дадено/и противотуберкулозно/и лекарство/а към този щам. Резистентността може да бъде към едно или няколко противотуберкулозни лекарства (в различни комбинации):

11.2.2.1. Монорезистентен щам: изолат на *M.tuberculosis complex* с доказана *in vitro* резистентност към едно противотуберкулозно лекарство от първи ред.

11.2.2.2. Полирезистентен щам: изолат на *M.tuberculosis complex* с доказана *in vitro* резистентност към две или повече противотуберкулозни лекарства, различни от Изониазид и Рифампицин, едновременно.

11.2.2.3. MDR-TB щам: изолат на *M.tuberculosis complex* с доказана *in vitro* резистентност към Изониазид и Рифампицин едновременно, със или без наличие на резистентност към другите противотуберкулозни лекарства от първи ред. Много от тези щамове имат повишена способност на разпространение (трансмисивност); предизвикват тежки прогресиращи форми на туберкулоза, нерядко с неблагоприятен изход.

Към настоящия момент, преди насочване на болните с MDR-TB за лечение в СБАЛББ, Габрово, тези щамове следва да бъдат потвърдени в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ. (съгласно Наредба № 21). ТЛЧ за втори ред противотуберкулозни лекарствени продукти, се извършва за Рифампицин резистентни щамове, само в НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ.

11.2.2.4. Рифампицин резистентен щам (RR): изолат на *M.tuberculosis complex* с доказана *in vitro* резистентност към Рифампицин (чрез фенотипни или молекулярно генетични методи), с или без наличие на резистентност към други противотуберкулозни лекарства, т.е. към тази категория резистентност се отнасят не само моно-Рифампициновата резистентност, но и MDR-TB и полирезистентност.

11.2.2.5. XDR-TB щам: изолат на *M.tuberculosis complex*, с допълнителна *in vitro* резистентност към Флуорохинолони и към един или повече от следните инжекционни препарати: Канамицин, Амикацин, Капреомицин.

11.2.2.6. Pre-XDR-TB щам: изолат на *M.tuberculosis complex*, с доказана *in vitro* резистентност или към Флуорохинолони или към инжекционно противотуберкулозно лекарство от втори ред, но не и към двете едновременно: Терминът "Pre-XDR", не е приет официално от СЗО или световната ТБ общност.

11.2.2.7. TDR-TB щам: изолат на *M.tuberculosis complex*, с доказана *in vitro* резистентност към всички тествани противотуберкулозни лекарства. Подобно на термина Pre-XDR-TB, този термин също не е приет официално от СЗО или световната ТБ общност и няма консенсус, относно точността на дефиницията.

11.2.2.8. Първична лекарствена резистентност

Това понятие днес е заменено с „лекарствена резистентност при нов болен“. Представлява устойчивост на туберкулозен щам, отделен от пациент, който никога не е приемал противотуберкулозна терапия или е приемал, но не повече от един месец, т.е. болният се е заразил с лекарствено-устойчив щам. Лекарствена резистентност при нов болен характеризира състоянието на микобактериалната популация, циркулираща на дадена територия, и нейните показатели са важни за оценка на епидемиологичната ситуация.

11.2.2.9. Придобита (вторична) резистентност

Това понятие днес е заменено с „лекарствена резистентност при пациенти с предшестващо лечение“. Устойчивост, развиваща се в процеса на лечение. Тя е косвен показател за ефективността на противотуберкулозното лечение.

Таблица 11: Критични концентрации на противотуберкулозни лекарства от I-ви ред при различни методи ТЛЧ в мкг/мл

S	Пропорционал	Метод на	Нитрат	Автоматизирани системи
---	--------------	----------	--------	------------------------

I R E	ен метод	абсолютните концентрации	редуктазен метод	BACTEC MGIT
STR	4 / 10	10	10	0,1
INH	0,2 / 1	1	0,2	0,1
RMP	20 / 40	40	40	1,0
EMB	2 / 3	2	4	5,0

11.2.3. Първи ред противотуберкулозни лекарства: Isoniazid (H, INH); Rifampicin (R, RMP); Pyrazinamide (Z, PZA); Streptomycin (S, STR); Ethambutol (E, EMB).

11.2.4. Втори ред противотуберкулозни лекарства: Аминогликозиди – Amikacin Kanamycin; Полипептиди – Capreomycin; Флуорохинолони – Ofloxacin, Levofloxacin Moxifloxacin; Тиоамиди – Ethionamide, Prothionamide; Серинови аналози – Cycloserine; PAS (парааминосалицилова киселина).

Класификацията на тези две групи противотуберкулозни лекарства като първи и втори ред има по-скоро практическа стойност, с която си служим в рутинната практика. Официално приетата класификация ги разглежда в 5 големи групи, посочени в Таблица 12;

Таблица 12: Основни групи противотуберкулозни лекарства

Група	Описание	Лекарствен продукт	Съкращение
1	Перорални противотуберкулозни лекарства от първи ред	Изониазид Рифампицин Етамбутол Пиразинамид Рифабутин	H (INH) R (RIF, RMP) E (EMB) Z (PZA) Rfb (RFB)
2	Инжекционни противотуберкулозни лекарства	Канамицин Амикацин Капреомицин Стрептомицин	Km (KAN) Amk (AMK) Cm (CM) S (STR)
3	Флуорохинолони	Левофлоксацин Моксифлоксацин Офлоксацин	Lfx (LFX) Mfx (MFX) Ofx (OFX)
4	Бактериостатични перорални противотуберкулозни лекарства от втори ред	Етионамид Протионамид Циклозерин Теризидон Пара-аминосалицилова киселина (ПАСК)	Eto Pto Cs Trd PAS
5	Противотуберкулозни лекарства с неясна ефикасност или неясна роля при лечението на MDR-TB (не се препоръчват от СЗО за рутинно прилагане при пациенти с MDR-TB)	Клофазимин Линезолид Амоксицилин/ Клавуланова киселина Тиоацетазон Кларитромицин Имипенем	Cfz Lzd (LZD) Amx/Clv Thz Clr Ipm

6	Нови противотуберкулозни лекарства	Бедаквилин Деламанид	
---	------------------------------------	-------------------------	--

11.2.5. Директен метод за ТЛЧ, т.е. ТЛЧ се прави директно от деконтаминираната хранка. Този метод е осъществим само при резултат от микроскопското изследване: (3+)пол. КУБ. Трудно се стандартизира и не се използва често по света.

11.2.6. Индиректен метод – рутинно използван. Работи се с чиста микобактериална култура, от която може да бъде приготвен стандартен инокулум. Всички описаните по-долу методи са индиректни. При изготвянето на ТЛЧ, винаги се акцентира върху три основни компонента: инокулум, хранителна среда и противотуберкулозно лекарство.

11.3. Пропорционален метод

За първи път методът е представен от Middelbrook и Cohn, а после усъвършенстван от Canetti в Института „Пастьор” в Париж, Франция. Днес той е известен и като метод на Canetti. Счита се за класически метод с най-добро съвпадение in vivo и in vitro.

11.3.1. Принцип:

Определя се процентното съотношение между броя на понижените колонии *M. tuberculosis* в средите с антибиотици и броя на колонии в контролите, умножени по съответното разреждане. Това процентно съотношение се сравнява с критичното съотношение. Използва се следната формула:

$$\frac{\text{бр. колонии в епруветки с лек. препарат} \times \text{съответно разреждане}}{\text{бр. колонии в контролните епруветки} \times \text{съответно разреждане (резистентност)}} \times 100 = \% \text{ съотношение}$$

Ако това процентно съотношение е по-голямо или равно на критичното съотношение, изпитваният щам е резистентен (R).

Ако това процентно съотношение е по-малко от критичното съотношение, изпитваният щам е чувствителен (S).

11.3.2. Приготвяне на инокулум

Взема се пълно йозе от изследваната култура от среда на Löwenstein-Jensen. Материалът се пренася в стерилна епруветка с винтова капачка с 8-12 стерилни перли с диаметър до 3 мм и 2 мл. дестилирана вода. Многократно се разбърква на Vortex до побеляване на суспензията. От тази изходна суспензия се взема надутаечната течност, като се внимава да се избягват едрите частици и се прехвърля в друга епруветка. Разрежда се с дестилирана вода, докато се достигне мътнина 1,0 по McFarland.

Тази процедура може да се осъществи по два начина:

11.3.2.1. Чрез дензимат;

11.3.2.2. Чрез сравняване с предварително готов оптичен стандарт. Този стандарт може да е комерсиален продукт или може да бъде приготвен в лабораторията.

Стандартът представлява химически разтвор на бариев хлорид 1% - 0,1 мл., и H₂SO₄ 1% - 9,9 мл., (Таблица 13)

Таблица 13: Приготвяне на оптически стандарт 1,0 по McFarland

McF	Бариев хлорид (мл.) (1% разтвор)	H ₂ SO ₄ (мл.) (1% разтвор)	Съответстваща бактериална суспензия / мл.
1,0	0,1	9,9	3,0 x 10 ⁸

Всеки път преди употреба епруетката със стандарта трябва енергично да се разклати. От така приготвената суспензия (1,0 McFarland) се приготвят падащи разреждания: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ (9 мл. дестилирана вода + 1 мл. от стандартната суспензия). Работи се с разреждания 10⁻³ и 10⁻⁵.

11.3.3. Хранителни среди

Пропорционалният метод на Canetti се работи върху среди на Löwenstein-Jensen, инокулирани със съответното количество противотуберкулозни субстанции. Предлагат се в готов за употреба вид от различни фирми като комерсиален продукт. Те могат да бъдат приготвени и в лабораторията, като прескрипцията за средата на Löwenstein-Jensen е оригиналната рецепта, но към нея се добавят много прецизно съответните противотуберкулозни субстанции, преди коагулирането на средата (еднократно за 30 мин. на 85°C). Епруетките са годни до един месец, съхранени в хладилник (4-8°C).

Един комплект трябва да съдържа минимум 18 епруетки:

- 11.3.3.1. 2 бр. контроли без антибиотик (1 бр. за 10⁻³ и 1 бр. за 10⁻⁵ инокулум);
- 11.3.3.2. 4 бр. епруетки с INH 2 бр. (0,2 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
2 бр. (1,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
- 11.3.3.3. 4 бр. епруетки с RMP 2 бр. (20,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
2 бр. (40,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
- 11.3.3.4. 4 бр. епруетки със STR 2 бр. (с 4,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
2 бр. (10,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
- 11.3.3.5. 4 бр. епруетки с EMB 2 бр. (2,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵)
2 бр. (3,0 мкг/мл. за 10⁻³ и 10⁻⁵).

11.3.4. Противотуберкулозни лекарства

Работи се само с чисти лекарствени субстанции и в никакъв случай не трябва да се използват ампулирани или таблетни форми. При приготвянето на основните разреждания (съобразени с активното вещество във всяка лекарствена субстанция) необходимото количество в милиграми от съответната субстанция се претегля с аналитична везна.

11.3.4.1. Isoniazid (INH)

Активно вещество: 1000мг. в 1,0 г.

11.3.4.1.1. Разтваряме 20,0 мг. INH в 40,0 мл. стерилна дестилирана вода. Това е разтвор 1 с 500 мкг/мл INH с

11.3.4.1.2. От разтвор 1 се вземат 2 мл. + 48 мл. стерилна дестилирана вода. Това е основното разреждане с 20,0 мкг/мл

11.3.4.2. Rifampicin (RMP)

Активно вещество > 980 мкг/мл

- 11.3.4.2.1. Разтваряме 80 мг. RMP + 5 мл. метанол и това е разтвор 1;
 11.3.4.2.2. Разтвор 1 + 5 мл. 95% етанол. Това е основното разреждане със съдържание 8000 мкг/мл.
 11.3.4.3. Streptomycin (STR)
 Активното вещество варира от 667 мкг/мг до 800 мкг/мг.
 11.3.4.3.1. 40 мг от STR + 40 мл. стерилна дестилирана вода = 1000 мкг/мл основен разтвор.
 11.3.4.4. Ethambutol (EMB)
 Активното вещество е 1,0 г. в 1,0 г субстанция.
 11.3.4.4.1. 20 мг. от EMB + 100 мл. стерилна дестилирана вода. Това е основното разреждане – със съдържание 200 мкг/мл.

Таблица 14: Приготвяне на среда Löwenstein-Jensen със съответните концентрации на противотуберкулозните лекарства

Противо ТБ лекарство	Критична концентрация	Обем на среда Löwenstein- Jensen	Добавяне на основен разтвор	Стойности на основния разтвор
INH	0,2 мкг/мл	1000 мл	10,0 мл	20 мкг/мл
RMP	40,0 мкг/мл	1000 мл	5,0 мл	8000 мкг/мл
STR	10,0 мкг/мл	1000 мл	10,0 мл	1000 мкг/мл
EMB	2,0 мкг/мл	1000 мл	5,0 мл	200 мкг/мл

Основните разреждания могат да се съхраняват при -20°C във фризер, (една снежинка, обозначена на вратата на фризера, отговаря на -6°C) за 6 месеца. Не е необходимо всеки път, когато се разливат хранителни среди, да се размразява цялото количество наведнъж и после да се замразяват отново. Препоръчва се основното разреждане да бъде разлято в обеми, съответно необходими за един антибиотик, т.е. 10, 5, 10, 5 мл. съответно за INH, RMP, STR, EMB. Ако се съхранява в обикновен хладилник, годността е само една седмица. Предвид цената на субстанциите този вариант не е удачен.

11.3.4.5. Инокулиране

По 0,2 мл. от разреждане 10^{-3} и 10^{-5} на инокулума се посяват както в контролата, така и в антибиотик-съдържащите епруветки (с по две концентрации на антибиотика). Епруветките се поставят под наклон 3-4 дни, така че течността да е в допир с полегатия стълбец на средата. След това епруветките се инкубират на 37°C за 21 дни (до 28 дни, ако няма растеж) в изправено положение с леко разхлабени капачки.

11.3.4.6. Интерпретиране на резултатите

Възможността от по две концентрации на антибиотик и в две разреждания на инокулума дава възможност за правилна интерпретация на резултатите от ТЛЧ. Епруветките се отчитат на 21-я ден. Колониите трябва да се броят внимателно, независимо от големината им. За всеки противотуберкулозен лекарствен препарат за всяка негова концентрация има определена критична пропорция в проценти (Таблица 15).

Таблица 15: Критични концентрации и критични пропорции на основните противотуберкулозни препарати

Антибиотик	Концентрация в мкг/мл	Критична пропорция в %
STR	4	1,0 %
	10	0,1 %
INH	0,2	1,0 %
	1,0	0,1 %
RMP	20,0	2,0 %
	40,0	1,0%
EMB	2,0	1 %
	3,0	1 %

Резистентни са тези щамове, чието процентно съотношение между броя на колонии в средата с антибиотик и броя на колонии в контролната епруветка, съответно умножени по съответното разреждане, е по-високо или равно на критичното съотношение (пропорция), както е показано в Таблица 15.

Чувствителни са тези щамове, чието процентно съотношение е по-малко от дадената критична пропорция (съотношение) за съответната концентрация на антибиотик в средата, както е показано в Таблица 5.

При отчитането съществуват три възможности:

11.3.4.6.1. Когато щамът е чувствителен и към двете концентрации на даден антибиотик (Таблица 16);

11.3.4.6.2. Когато щамът е резистентен и към двете концентрации на дадения антибиотик (Таблица 17);

11.3.4.6.3. Когато щамът е резистентен към по-ниската концентрация и чувствителен към по-високата концентрация на антибиотика. Това е едно от най-важните предимства на този метод-прецизността Таблица 18

Таблица 16: Примери за възможност 1: за INH

Разреждане	Контролни епруветки	Епруветки с антибиотик 0,2 мкг/мл	Епруветки с антибиотик 1,0 мкг/мл
10^{-3}	Конфлуентен растеж - не могат да се преброят	10 колонии	0 колонии
10^{-5}	100 колонии	0 колонии	0 колонии

$$R_{INH \text{ 2 мкг/мл}} = \frac{10 \times 10^3}{100 \times 10^5} \times 100 = 0,1 \%$$

- 0,1 % е по-ниска от 1,0 % за 2,0 мкг/мл, затова тестваният щам е чувствителен (S) към INH с концентрация 0,2 мкг/мл.

- В по-високата концентрация 1 мкг/мл въобще няма растеж.

Таблица 17: Пример за възможност 2: за RMP

Разреждане	Контролни епруветки	Епруветки с антибиотик 20,0	Епруветки с антибиотик 40,0
------------	---------------------	-----------------------------	-----------------------------

		мкг/мл	мкг/мл
10^{-3}	Не могат да се преброят	Не могат да се преброят	50 колонии
10^{-5}	50 колонии	20 колонии	0 колонии

$$R_{RMP\ 20\ \text{мкг/мл}} = \frac{20 \times 10^5}{50 \times 10^5} \times 100 = 40\%$$

$$R_{RMP\ 40\ \text{мкг/мл}} = \frac{50 \times 10^3}{50 \times 10^5} \times 100 = 1,0\%$$

$$R_{EMB\ 2\ \text{мкг/мл}} = \frac{100 \times 10^5}{200 \times 10^5} \times 100 = 50,0\%$$

$$R_{EMB\ 3\ \text{мкг/мл}} = \frac{20 \times 10^3}{200 \times 10^5} \times 100 = 0,1\%$$

И при двете концентрации на RMP, шамът е резистентен (с по-голям или равен процент).

Таблица 18: Пример за възможност 3: за EMB

Разреждане	Контролни епруветки	Епруветки с антибиотик 2,0 мкг/мл	Епруветки с антибиотик 3,0 мкг/мл
10^{-3}	Не могат да се преброят	Не могат да се преброят	20 колонии
10^{-5}	200 колонии	100 колонии	0 колонии

При $R_{EMB\ 2\ \text{мкг/мл}} = 50\% >$ от критичната пропорция 1%, т.е. шамът е резистентен (R).
 При $R_{EMB\ 3\ \text{мкг/мл}} <$ от критичната пропорция 1%, т.е. шамът е чувствителен (S).

11.4. Нитрат-редуктазен метод (метод на Калфин)

Методът е оригинален и до скоро беше малко познат в чужбина. Публикуван е за първи път в сборник „Инструктивни материали по микробиологична диагностика на бактериални инфекции”, 1989, том I, МЗСГ, стр. 125, с автори Е Калфин и А.Енгиларов. Методът е евтин, бърз, лесен за изпълнение и надежден.

11.4.1. Принцип

Индиректен метод, базиращ се на биохимичното свойство на 97% от микобактериите да редуцират нитратите до нитрити. В среда на Löwenstein-Jensen със съответната концентрация на антибиотик и 0,1 % KNO_3 се инокулира съответният шам. След 10-дневно култивиране на 37°C се отчита редукцията на нитратите в нитрити с помощта на реактив на Грис (сравнявайки с контролната епруетка без антибиотик). Освен това има и допълнителна епруетка с Na-салицилат, ограничаващи МТС от NTM. Тестът не е подходящ за *M. bovis*, тъй като той не редуцира нитратите в нитрити.

11.4.2. Приготвяне на хранителна среда с противотуберкулозни лекарства

11.4.2.1. Използва се среда на Löwenstein-Jensen, преди коагулирането на която се добавят KNO_3 и противотуберкулозните лекарства в следните концентрации:

11.4.2.1.1. STR 10 мкг/мл;

11.4.2.1.2. INH 0,2 мкг/мл;

11.4.2.1.3. RMP 40 мкг/мл;

11.4.2.1.4. EMB 4 мкг/мл.

11.4.2.2. Редицата от епруветки се подрежда в следния ред:

11.4.2.2.1. Контрола (без антибиотик);

11.4.2.2.2. Контрола (без антибиотик);

11.4.2.2.3. STR;

11.4.2.2.4. INH;

11.4.2.2.5. RMP;

11.4.2.2.6. EMB;

11.4.2.2.7. Контрола с Na салицилат.

Във всяка една от епруветките има добавен 0,1 % KNO_3 (в крайна концентрация)

Задължително се използват чисти субстанции от горепосочените лекарствени продукти. Претеглянето им се извършва с аналитична везна, като се взема пред вид съдържанието на активното вещество в 1г от това лекарствено средство.

11.4.2.3. Streptomycin (STR)

Съдържанието на активно вещество е 800 мг в 1г. Разтворител – стерилна дестилирана вода. 12,5 г. Streptomycin sulfas съответстват на 10 г чист STR.

1-во разреждане: 12,5 мг. от препарата + 10 мл. стерилна дестилирана вода = 1000 мкг/мл $\mu\text{g/ml}$.

Работен разтвор: 1 мл. от 1-во разреждане + 99 мл. среда на Löwenstein-Jensen – в стерилна колба. Добавя се 1 мл. 10% воден разтвор на KNO_3 (т.е. 0,1 % KNO_3 като крайна концентрация за всяка епруветка). Последваща коагулация (еднократна на 85°C, за 30 мин. в наклонено положение, с полегат стълбец около 8 см.) = 10 мкг/мл.

11.4.2.4. Isoniazid (INH)

Съдържание на активно вещество е 1000 мг. в 1 г. Разтворител – дестилирана вода.

1-во разреждане: 10мг. от препарата + 10 мл. дестилирана вода = 1000 мкг/мл.

2-ро разреждане: 1 мл. от 1-во разреждане + 9 мл. дестилирана вода = 100 мкг/мл.

Работен разтвор: 0,2 мл. от 2-ро разреждане + 99,8 мл. среда, както е описана преди, с последваща коагулация) = 0,2 мкг/мл.

11.4.2.5. Rifampicin (RMP)

Съдържанието на активно вещество е 1000 мг. в 1 г. Рифампицин не се разтваря във вода. Използва се метанол.

1-во разреждане: 20 мг. от препарата + 5 мл. метанол. Разбърква се до разтварянето на цялото количество. След това се добавя още 5 мл. стерилна дестилирана вода, т.е. 2000 мкг/мл.

Работен разтвор: 2 мл. от 1-во разреждане + 98 мл. среда с Löwenstein-Jensen и KNO_3 , с последваща коагулация = мкг/мл.

11.4.2.6. Ethambutol (EMB)

Съдържанието на активно вещество е 1000 мг. в 1 г. разтворител – стерилна дестилирана вода.

1-во разреждане: 10 мг. + 10 мл. стерилна дестилирана вода = 1000 мкг/мл.

2-ро разреждане: 1 мл. от 1 разреждане + 4 мл. дестилирана вода = 200 мкг/мл.

Работен разтвор: 2 мл. от 2-ро разреждане + 98 мл. среда на Löwenstein-Jensen и KNO_3 с последваща коагулация = 4 мкг/мл.

Тъй като активността на различните лекарствени субстанции е различна при различните партии, винаги трябва да се изисква сертификат от фирмата производител и разрежданията трябва да се приготвят съобразно активното вещество в дадената субстанция.

Всяка епруветка с Löwenstein-Jensen от ТЛЧ съдържа 0,1 % KNO_3 (в крайна концентрация), т.е. 2-те контроли без лекарство; 1-та контрола с Na салицилат (0,1 г. на 100 мл. среда = 0,1% разтвор); 4-те епруветки с противотуберкулозни лекарства

11.4.2.7. Начин на приготвяне:

Приготвят се 4 стерилни колби за ТЛЧ + толкова колби, колкото контроли желаем. Маркират се. Всяка колба съдържа:

Хранителна среда + съответното количество INH, RMP, EMB, STR + 1мл. 10% KNO_3 – за епруветките с противотуберкулозно лекарство.

Хранителна среда + 1мл 10% KNO_3 , но без противотуберкулозно лекарство – за контролните епруветки.

От 100 мл. среда се разливат 20 епруветки.

Реактив на Грис

Реактив А: Сулфанилова киселина 8 г.
Оцетна киселина 5 N 1000 мл.

Реактив Б: α -нафтиламин 5 г.
Оцетна киселина 5 N 1000 мл.

Приготвянето на 5 N Оцетна киселина (CH_3COOH) се осъществява по следния начин: 5 N CH_3COOH = в 300 мл. CH_3COOH се долива дестилирана вода до 1000 мл. За нашите нужди се използва една четвърт от горепосочения обем (250 мл.), т.е. 75 мл концентрирана CH_3COOH се долива до 250 мл. с дестилирана вода. Практически се използва мерителна колба от 250 мл. На дъното се поставя 150 мл. вода и бавно се добавя по стената на съда 75 мл. CH_3COOH . Разбърква се и се долива до 250 мл. вода. Смесват се *ex tempore* преди отчитането на всяка ТЛЧ в еквивалентни количества. Реактив А и Реактив Б се съхраняват в тъмни шишета, в хладилник (4-8°C).

11.4.3. Инокулум

От едно пълно йозе с чиста култура се прави суспензия в 2-3 мл. дестилирана вода със стерилни перли от 2-3 мм (около 10 броя). Разбърква се на Вортекс до побеляване (няколко минути). От тази суспензия след утаяване се взема от надутаечната течност в такова количество, че след разреждане с дестилирана вода да се получи мътна, равна на оптически стандарт 1 по McFarland. Стандарта 1 по McFarland може да се изработи по описания по-горе начин. Стандартизирането на суспензията може да стане и с Дензимат.

Първоначалната суспензия, от която се взема надутаечната течност, се приготвя в дебелостенни епруветки с винтови капачки. Не трябва да се бърза с отварянето на епруветката, след като се разбърка на вортекс - необходимо е да се изчака да се утаи 10-15 минути.

11.4.4. Процедура

11.4.4.1. Подредените в посочения ред 7 епруветки за ТЛЧ, надписани четливо, се поставят на стативи.

11.4.4.2. Всяка епруветка се закапва с приготвения инокулум по 0,2 мл;

11.4.4.3. Оставят се полегнали 24-48 часа в термостат на 37°C, така че целият полегат стълбец да контактува с инокулума;

11.4.4.4. Изправят се и се култивират до 10-ия ден;

11.4.4.5. Броят на двете контроли без лекарство може да бъде увеличен. Целта е след 8-ия ден да може да бъде закапвана по една контрола. При позитивиране на контролата може да бъде отчетен цялия ТЛЧ. Понякога контролата позитивира на 8-9-ия ден, а понякога – на 11-12-ия ден.

11.4.5. Интерпретация на резултатите

При резистентност към съответното противотуберкулозно лекарство има наличие на растеж в епруветката и след закапване по 2-3 капки с реактива на Грис се получава от малиновочервено до тъмнокафяво оцветяване, т.е. нитратите са редуцирани в нитрити.

При чувствителност към съответните противотуберкулони лекарства - няма растеж, няма редукция на нитратите в нитрити, т.е. не се наблюдава цветна реакция. Контролните среди (без антибиотици) се оцветяват в червено. При отрицателната контрола – реакцията може да е преминала твърде бързо, поради което се налага да се прибави цинк на прах.

Този тест може да се използва като биохимичен тест за идентификация.

Контролите с Na салицилат не трябва да променят цвета си (за разлика от другите контроли). При цветна реакция (червено до кафяво оцветяване) има растеж на средата и нитратите са се редуцирали до нитрити. Това е характерно за NTM. Те обикновено са резистентни и на всички противотуберкулозни лекарства от I ред.

11.5. Метод за определяне на лекарствената чувствителност с автоматизирана система

Автоматизираният тест за ТЛЧ с Bactec 460 TB беше определен от СЗО като един от референтните методи. С навлизането на новото поколение нерадиометрични автоматизирани системи беше предпочетен Bactec MGIT 960 System. Принципът на работа с тази автоматизирана система е описан в т. 9.2.5.2.1. и в *Приложение 9*. Подробно и детайлно описание на работата с автоматизираната система е представено от производителя в съответния наръчник за работа.

11.5.1. Подготовка на необходимата концентрация на противотуберкулозните лекарства от първи ред

Разтварянето на лиофилизираните лекарствените субстанции от SIRE kit се осъществява, съгласно инструкциите на производителя: към всеки флакон се добавя 4 ml стерилна дестилирана вода. След пълното разтваряне на субстанцията, антибиотичния разтвор се разпределя в аликвотни части, с концентрация, посочена в колона 3 на Таблица 19, в стерилни епруветки тип Епендорф (с цел да се избегне многократно замразяване/размразяване). Те се съхраняват при температура минус 20°C не по-дълго от 6 месеца след разтварянето им.

От тези концентрации във всяка MGIT епруветка (без контролната) се прибавя по 100 мл от съответното противотуберкулозно лекарство. Крайната концентрация, която се получава в съответните MGIT епруветките е посочена в колона 4 на **Таблица 19**.

Таблица 19: Лекарствени субстанции от първи ред в SIRE kit, с концентрации за флакон, като чисти субстанции; след разтваряне и като крайна концентрация в MGIT епруветка

Противотуберкулозно лекарство от първи ред, SIRE kit	Концентрация на лиофилизираното лекарство за флакон	Концентрация на лекарството след разтваряне, за флакон	Крайна (критична) концентрация на лекарството MGIT епруветка
1	2	3	4
Streptomycin	332 мг	83 мкг/мл	1,0 мкг/мл
Isoniazid	33,2 мг	8,3 мкг/мл	0,1 мкг/мл
Rifampicin	332 мг	83 мкг/мл	1,0 мкг/мл
Ethambutol	660 мг	415 мкг/мл	5,0 мкг/мл

11.5.2. Подготовка на необходимата концентрация на противотуберкулозните лекарства от втори ред. Процедура по изготвяне на антибиотичните разтвори.

Антибиотиците Офлоксацин, Амикацин, Канамицин и Капреомицин представляват сухи субстанции, с концентрации, посочена в Таблица 20.

Таблица 20: Лекарствени субстанции от втори ред използвани за изготвяне на ТЛЧ

Наименование на чистата лекарствена субстанция	Концентрация на лиофилизат за флакон	Разтворител	Концентрация на крайното разреждане, мкг/мл	Крайна концентрация в MGIT, мкг/мл
1	2	3	4	5
Ofloxacin	99,1%	0,1N NaOH	168,0	2,0
Amikacin disulfate salt	740 мкг/мл	Стерилна вода	84,0	1,0
Kanamycin sulfate	94,5%	Стерилна вода	420,0	5,0
Capreomycin sulfate	844 мкг/мл	Стерилна вода	210,0	2,5

Първоначално се изчислява т.нар. коригиращ фактор (КФ) за антибиотиците: Амикацин, Канамицин и Капреомицин (колона 2, Таблица 20), чиято концентрация на активното вещество (потенцията) е по-ниска от 98%.

$KF = 1 \text{ мг} / \text{потенцията на антибиотика (активното вещество) в мкг/мл.}$

Количество антибиотик, необходим за приготвяне на основния разтвор (g) = Теоретичното количество от антибиотика (0,10g) x КФ

Напр. при активното вещество в субстанцията е 740 мкг/мл, $KF = 1000/740 = 1,35$

Количество антибиотик, необходим за приготвяне на основния разтвор = $0,10 \times 1,35 = 0,135 \text{ g}$

- 11.5.2.1. Амикацин (изходна субстанция - 740 мкг/мл)
- 11.5.2.1.1. Разтвор А: 0,14 г от Amikacin disulfate salt се разтваря в 10 мл стерилна вода = 10000 мкг/мл
- 11.5.2.1.2. Разтвор В: 1 мл Разтвор А + 9 мл стерилна вода = 1000 мкг/мл
- 11.5.2.1.3. Разтвор С: 4 мл Разтвор В + 1 мл стерилна вода = 800 мкг/мл
- 11.5.2.1.4. Крайно разреждане: 1,05 мл Разтвор С + 8,95 мл стерилна вода = 84 мкг/мл
- 11.5.2.2. Канамицин (изходна субстанция – 94,5%)
- 11.5.2.2.1. Разтвор А: 0,13 г от Kanamycin sulfate се разтваря в 10 мл стерилна вода = 10000 мкг/мл
- 11.5.2.2.2. Разтвор В: 5 мл Разтвор А + 5 мл стерилна вода = 5000 мкг/мл
- 11.5.2.2.3. Разтвор С: 1 мл Разтвор В + 9 мл стерилна вода = 500 мкг/мл
- 11.5.2.2.4. Крайно разреждане: 4,16 мл Разтвор С + 0,84 мл стерилна вода = 420 мкг/мл
- 11.5.2.3. Капреомицин (изходна субстанция - 844 µg/ml)
- 11.5.2.3.1. Разтвор А: 0,12 г от Capreomycin sulfate се разтваря в 10 мл стерилна вода = 10000 мкг/мл
- 11.5.2.3.2. Разтвор В: 1 мл Разтвор А + 9 мл стерилна вода = 1000 мкг/мл
- 11.5.2.3.3. Крайно разреждане: 2,1 мл Разтвор С + 7,9 мл стерилна вода = 210 мкг/мл
- 11.5.2.4. Офлоксацин (изходна субстанция – 99,1%)
- 11.5.2.4.1. Взема се 0,10 г от Ofloxacin се разтваря в 2,5 мл 0,1N NaOH и се разбърква внимателно до пълно разтваряне на веществото
- 11.5.2.4.2. Разтвор А: добавя се стерилна вода до краен обем 10 мл = 10000 мкг/мл
- 11.5.2.4.3. Разтвор В: 1 мл Разтвор А + 9 мл стерилна вода = 1000 мкг/мл
- 11.5.2.4.4. Крайно разреждане: 1,7 мл Разтвор В + 8,3 мл стерилна вода = 168 мкг/мл

След пълното разтваряне на посочените чисти субстанции, съответните антибиотични разтвори се разпределят в аликвотни части, с концентрация посочена в колона 4 на Таблица 20, в стерилни епруветки тип Епендорф (с винтова капачка), които се съхраняват при температура минус 80°C не по-дълго от 6 месеца след приготвянето им.

От тези концентрации от съответното противотуберкулозно лекарство от втори ред се прибавя по 100 мкл във всяка работна MGIT епруетка (без контролната). Крайната концентрация, която се получава в съответните MGIT епруетки е посочена в колона 5 на Таблица 20.

11.5.3. Процедура по провеждане на теста:

След приготвяне на лекарствата от първи и втори ред, с цел избягване на евентуална контаминация, процедурата продължава в строго определена последователност: подготовка на епруетките 7 ml MGIT преди инокулиране с противотуберкулозни лекарства; приготвяне на инокулум за ТПЧ от положителна твърда/течна хранителна среда; инокулиране на епруетка 7 ml MGIT с туберкулозния щам; култивиране и отчитане

11.5.3.1. Подготовка на епруетките MGIT, преди инокулацията с тествания щам

11.5.3.1.1. Баркодираните епруетки MGIT се означават като контрола и съответно с надписа на лекарството, което ще бъде прибавено във всяка една от епруетки за първи и втори ред следвайки точно този определен ред;

11.5.3.1.2. Стерилно се накапва по 0,8 мл MGIT 960 SIRE суплемент във всяка епруветка;

11.5.3.1.3. Стерилно се накапва по 100 мкл от съответната концентрация на противотуберкулозните лекарства в съответно надписаната епруветка MGIT за изследвания щам.

11.5.3.2. Приготвяне на инокулум за ТЛЧ от положителна твърда хранителна среда (Льовенщайн-Йенсен)

11.5.3.2.1. В стерилна епруветка, съдържаща 8 – 10 стъклени перли с диаметър 2-3 мм се поставят се 4 мл стерилен физиологичен разтвор;

11.5.3.2.2. Взема се пълно йозе от изследваната чиста култура *M. tuberculosis complex*, не по-стара от 14 дни и се суспендира във физиологичен разтвор;

11.5.3.2.3. Разбъркване на Вортекс за 2 – 3 мин. до побеляване на суспензията;

11.5.3.2.4. Епруветката престоява 20 мин. за утаяване на едрите частици;

11.5.3.2.5. Суспензията се прехвърля в друга епруветка и се оставя още 15 мин. за допълнително утаяване;

11.5.3.2.6. Взема се надутаечната течност и се прехвърля в друга стерилна епруветка;

11.5.3.2.7. Суспензията се довежда до мътнина 0,5 по McFarland;

11.5.3.2.8. От така приготвената суспензия се прави разреждане 1:5 със стерилен физиологичен разтвор. Разредената суспензия се използва за инокулация в работните епруветки

11.5.3.2.9. От разреждането 1:5 се приготвя разреждане 1:100 със стерилен физиологичен разтвор, за инокулация на контролната епруветка;

11.5.3.3. Приготвяне на инокулум за ТЛЧ от положителна течна хранителна среда (MGIT)

11.5.3.3.1. Ако епруветката е положителна през ден 1-и или ден 2-ри, инокулирането се извършва с 0,5 мл. от течната култура без разреждане.

11.5.3.3.2. Ако епруветката е положителна ден 3-и, ден 4-и или ден 5-и, разбърква се добре, взема се 1мл от положителната суспензия и се разрежда в 4 мл стерилен физиологичен разтвор (в съотношение 1:5). Разредената суспензия се използва за инокулация в работните епруветки.

11.5.3.3.3. От разреждането 1:5 се приготвя разреждане 1:100 със стерилен физиологичен разтвор, за инокулация на контролната епруветка.

11.5.3.4. Инокулиране на епруветките MGIT със съответния туберкулозен щам:

11.5.3.4.1. Инокулира се контролната епруветка с 0,5 мл суспензия с разреждане 1:100. Епруветките с противотуберкулозните лекарства се инокулират с 0,5 мл суспензия от съответното разреждане;

11.5.3.4.2. Инокулираните епруветки се поставят в баркодиран носач, регистрират се в BACTEC® MGIT 960 SYSTEM и се вкарват в посочените от автоматизираната система позиции.

11.5.3.4.3. Култивирането се извършва при 37° C за 13 дни.

11.5.4. Принцип на интерпретиране на резултатите

Отчитането се извършваше автоматично от BACTEC® MGIT 960. Един тест цикъл на всички отделения се изпълнява за 60 минути. Позитивиралите епруветки с растежната контрола незабавно се сигнализируют с индикаторна светлина отпред на отделението, както и със звукова аларма и се показват на LCD – екран върху панела на автоматизираната система т.е. оригиналният фирмен софтуер регистрира в компютъра наличието на готовата антибиограма. Контролната MGIT епруветка трябва да достигне

400 растежни единици до 13-я ден за валидна интерпретация на ТЛЧ. Ако до 13-я ден контролата не позитивира, съответната антибиограма се повтаря. MGIT епруветките, в които апаратът отчита растеж 100 растежни единици, софтуерът го интерпретира като резултат „резистентност към съответното противотуберкулозно лекарство” и го изписва в протокола на резултата със символа R. MGIT епруветките, в които не се отчита растеж, софтуерът го интерпретира като резултат „чувствителност към съответното противотуберкулозно лекарство” и го изписва в протокола на резултата със символа S. Този резултат се съхранява в компютъра на автоматизираната система по два начина: като растежни криви, които могат да бъдат проследени и както текстови запис с интерпретацията на резултатите (S, R) с посочените критични концентрации на противотуберкулозните лекарства.

11.5.5. Контрол на качеството

11.5.5.1. Ежегодно метода трябва да се контролира, чрез провеждане на опит за повторяемост и възпроизводимост с референтни щамове, като резултатите се вписват в протоколи;

11.5.5.2. Ежегодно всички лаборатории, осъществяващи ТЛЧ следва да участват в схемата за Външна оценка на качеството на ТЛЧ за първи, респ. втори ред, осъществяван НРЛ ТБ, НЦЗПБ за страната, респ. външна (чуждестранна) организация за НРЛ ТБ и тази дейност да се сертифицира (Приложение № 4);

11.5.5.3. Ежегодно да се извърша технически преглед на апаратурата от оторизиран сервиз, като резултатите се вписват в протоколи.

11.5.5.1. Периодично да се сменя калибриращия кит във всяко отделение на апарата BASTEC® MGIT 960 от оторизиран сервиз, съгласно изискванията на производителя.

12. Амплификационни методи в диагностиката на туберкулозата/микобактериите

С традиционните методи за лабораторна диагностика на туберкулоза се изискват седмици за получаване на положителен или отрицателен резултат от изследването, което от своя страна забавя лечението. За успешната съвременна диагностика на туберкулоза са необходими лесни, бързи и високоспецифични тестове. Амплификационните техники (молекулярно генетичните методи), в частност полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR), дават големи надежди за това. В момента прилагането на молекулярно генетичните методи не заменя или отменя конвенционалната диагностика на туберкулозата, но помага за по-ранна и точна диагностика.

12.1. Идентификационни тестове за видово определяне на микобактерии. Методи за линейна хибридизация

Тестовите са разработени на принципа на ДНК амплификация на определена секвенция, като се използват биотинирани праймери, следва обратна хибридизация на амплифицирания продукт към специфични олигонуклеотиди, имобилизирани на мембранен стрип, като по този начин, чрез ензим медирана реакция се визуализира и отчита крайния продукт.

Чрез използването на тестовите за линейна хибридизация бързо се идентифицират повече от 90% от най-често изолираните NTM. На този принцип, са конструирани два теста, препоръчани от СЗО: INNO-Lipa Mycobacteriav2 (Innogenetics, Gent, Belgium) и Geno Type® Mycobacterium CM и AS (Hain Lifescience, Germany).

Тестът INNO-Lipa Mycobacteriav2 използва спейсърен регион разделящ гените 16S - 23S рРНК и позволява идентификация на следните видове микобактерии: *M. tuberculosis complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium/M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoeense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae complex*, *M. fortuitum complex* и *M. smegmatis*.

Тестът Geno Type® Mycobacterium CM и AS (Hain Lifescience, Germany) е разработен на базата на детекция на видово специфична секвенция на ген 23S рРНК. Конструирани са два отделни кита, които се изпълняват независимо един от друг и взаимно се допълват. GenoType® Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) позволява идентификация на *M. tuberculosis complex* и следните най-често срещани NTM: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. marinum/M. ulcerans*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoeense*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. interjectum*, *M. peregrinum* (Приложение № 12: Интерпретация за GenoType Mycobacterium CM).

Другият кит: Geno Type® Mycobacterium AS (Additional Species), позволява независима идентификация на допълнителни видове NTM, имащи отношение към човешката патология: *M. genavense*, *M. simiae*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. haemophilum*, *M. smegmatis*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshomense*, *M. szulgai*, *M. flei*, *M. gastrii*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei* (Приложение №13: Интерпретация за GenoType Mycobacterium AS).

Освен за конкретната видова идентификация на клинично значими NTM, имащи отношение към човешката патология, линейнохбридизационните тестове се използват за видова идентификация вътре в *M. tuberculosis complex*. Тестът GenoType Mycobacterium MTBC дава възможност за разграничаване на: *M. tuberculosis*, *M. aricanium*, *M. microti*, *M. bovis ssp. bovis*, BCG и *M. bovis ssp. caprae* (Приложение №14: Интерпретация за GenoType Mycobacterium MTBC).

12.1.1. Материали за изследване

За изпълнение на посочените тестове се използват само положителни микобактериални култури, т.е. след доказване на КУБ от изследвания шам. Тестовите не са пригодени и не трябва да се използват за откриване на микобактерии директно от клиничен материал на пациент. Идентификацията на NTM до вид, както и тази на конкретните видове в МТС се осъществява в НРЛ ТБ, НЦЗПБ, като ТБ лабораториите от страната изпращат шамовете до НРЛ ТБ, след като предварително са ги определили до ниво NTM или МТС.

Всеки кит е фабрично готов за употреба, като съдържа необходимите реактиви и консумативи, без термостабилна ДНК полимераза с буфер. По препоръка на производителя се използва HotStarTaq DNA Polymerase на Qiagen (Hilden, Германия), със следната характеристика: ниво на увеличаване: 2-4 kb/min при 72°C; полуживот: 10 минути при 97°C, 60 минути при 94°C и ефективност на амплификация: >10⁵ пъти.

12.1.2. Апаратура обслужваща метода

Минималната необходимост от апаратура за работа по метода Geno Type изисква: ламинарен бокс, клас 2; водна баня; миницентрофуга; PCR бокс; PCR термосайкълър; хибридизатор с разклащаща платформа TwinCubator и автоматични вариабилни пипети с съответните консумативи за тях. Използват се лични предпазни средства, необходими при работа с биологично опасен материал.

12.1.3. Процедура

Изпълнението на тестовете се осъществява в три етапа: изолиране на ДНК; многократна амплификация с биотинирани праймери и обратна хибридизация с визуализация. Всеки един от тези етапи с конкретната стандартна оперативна

процедура е посочена в предоставяните от производителя ръководства за употреба, които са съобразени със съответната версия на доставения комерсиален продукт.

12.1.3.1. ДНК екстракция

Екстракцията на ДНК се извършва съобразно правилата за биологична безопасност в ламинарен бокс клас 2. Използват се само чисти култури на твърда (Löwenstein-Jensen) или течна (MGIT) хранителни среди, съобразявайки се с процедурите, описани от производителя.

12.1.3.2. Амплификация

Амплификацията е с продължителност от 2 до 4 часа. Продуктите за амплификация могат да бъдат съхранявани при температура от +8 до -20°C. Процедурата по приготвяне на PCR микса се изпълнява в PCR бокс (специално за целта лабораторно пространство чисто от ДНК и PCR амплифицирани продукти).

12.1.3.3. Хибридизация

Хибридизацията на ампликоните върху тест лентите се извършва с помощта на хибридизатор с разклащаща платформа TwinCubator, който е ситуиран в друга стая, различна от помещенията за екстракция и амплификация. При работата с тест лентите операторът винаги трябва да използва ръкавици.

12.1.3.4. Интерпретация на получените резултати

Към всеки кит GenoType производителят е приложил съответните шаблони, които улесняват разчитането на визуализираните бандове и отчитането на конкретния микобактериален вид. Тестът GenoType Mycobacterium CM позволява разграничаването на *M. tuberculosis complex* от 13 обичайно изориращи се, клинично значими NTM, асоциирани с човешката патология. Интерпретацията на резултатите, получени чрез теста GenoType Mycobacterium CM са представени в Приложение 13: Интерпретация за GenoType Mycobacterium CM.

В случай, че полученият резултат е само род *Mycobacterium*, т.е. конкретният вид NTM не може да бъде определен сред посочените 13 вида, същият амплифициран продукт се използва за изпълнение на хибридизация с другия тест: GenoType Mycobacterium AS. Неговото използване дава възможност за идентифициране на допълнителни 16 клинично значими NTM вида. Интерпретацията на резултатите, получени чрез теста GenoType Mycobacterium AS са представени в Приложение 14: Интерпретация за GenoType Mycobacterium AS.

Видовата идентификация на представителите вътре в комплекса MTC се осъществява чрез интерпретация на теста GenoType Mycobacterium MTBC, както е посочено в Приложение 15: Интерпретация за GenoType Mycobacterium MTBC.

12.1.4. Контрол на линейнохибридизационните тестове за видова идентификация

12.1.4.1. Вътрешни контроли

Всеки стрип (лента) включва 3 вътрешни контроли, целящи коректното отчитане на етапите на работа.

12.1.4.1.1. Контрол на конюгацията

В тази зона трябва да се появи банд (линия), показващ ефикасността на свързването на конюгата и реакцията със субстрата.

12.1.4.1.2. Универсална контрола

В тази зона трябва да се появи банд, ако тествания продукт е микобактерий или G⁺ бактерий с високо ниво на G+C.

12.1.4.1.3. Контрола за род *Mycobacterium* (за тест GT Mycobacterium CM/AS).

Бандът в тази зона определя видът на изследваните бактерии като представител на род *Mycobacterium*. Контрола за *M. tuberculosis complex* (за тест GenoType MTBC).

Линията в тази зона определя пробата като член на *M. tuberculosis complex*

12.1.4.2. Отрицателна (външна) контрола

За всяка партида изпълнявани тестове, трябва да се включи и един контролен стрип (отрицателна контрола).

12.1.4.3. Външна оценка на качеството

Както всяка рутинна лабораторна дейност, така и осъществяването на тестове за видова идентификация следва да бъдат контролирани чрез външна оценка на качеството и съответно сертифицирани.

12.2. Амплификационни (молекулярно генетични) методи за определяне на резистентността към първи и втори ред противотуберкулозни лекарства ТЛЧ

12.2.1 Амплификационни (молекулярно генетични) методи за определяне на резистентността към първи ред противотуберкулозни лекарства

12.2.1.1. Принцип

Тестът GenoType® MTBDRplus се базира на технологията DNA-STRIP® и позволява молекулярно генетично определяне на *M. tuberculosis complex* и резистентността му към Рифампицин и Изониазид (MDR-TB) в рамките на часове, обикновено 48ч. Определянето на резистентността към Рифампицин се базира на откриване на най-важните мутации в гена *rpoB* (кодиращ β -субединица на РНК полимеразата). За отчитане на висока степен на резистентност към Изониазид, се изследва гена *katG* (кодиращ каталаза пероксидаза), а за отчитане на ниска степен на резистентност към Изониазид, се изследва промотора на региона на ген *inhA* (кодиращ NADH енол АСР редуктаза).

12.2.1.2. Материали за изследване

Тестът работи с изолирана ДНК от щамове от твърда или течна хранителна среда и от белодробни материали, с директно положителни за КУБ микроскопски препарати: хрочки, вкл. индуцирани; БАЛ; аспирати (напр., плеврален аспират). Извършването на теста с материали, различни от горепосочените не е валидирано. Процедурите по извършване на манипулациите за изолация на ДНК, свързани с образуването на инфекциозни аерозоли, опасни за оператора се осъществяват в ламинарен бокс, клас 2, ползвайки описаните по-горе лични предпазни средства.

12.2.1.3. Реактиви

12.2 Китът GenoType® MTBDRplus е фабрично готов за употреба, като съдържа всички необходими реактиви и консумативи, включително термостабилна ДНК полимеразата с буфер.

12.2.1.4. Апаратурата, обслужваща метода

Апаратурата е същата, като посочената в т. 12.1.2.

12.2.1.5. Процедура

Изпълнението на теста се осъществява в три етапа: изолане на ДНК; многократна амплификация с биотинирани праймери и обратна хибридизация с визуализация. Всеки един от тези етапи с конкретната стандартна оперативна процедура е посочена в предоставяните от производителя ръководства за употреба, които са съобразени със съответната версия на доставения комерсиален продукт. Тук по-подробно ще бъде представена процедурата на последната – Версия 2 на теста GenoType MTBDRplus, която се осъществява от четири ТБ лаборатории в страната: НРЛ ТБ, НЦЗПБ; СБАЛББ „Св. София“, гр. София, УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив, УМБАЛ „Г. Странски“, гр. Плевен.

12.2.1.5.1. Изолане на ДНК

ДНК може да бъде изолирана от култури (на течна или твърда среда) или директно от положителна на микроскопско изследване хранка, спазвайки протокола за изолиране на ДНК, препоръчан от производителя:

12.2.1.5.1.1. Чрез йозе се събират колонии от твърда хранителна среда и се суспендират в приблизително 300 мкл вода (клас молекулярна биология).

12.2.1.5.1.2. Когато се работи с течна хранителна среда, директно се поставят 1мкл, а когато се използва деконтаминиран с NALC/NaOH материал от пациенти се използват 500 мкл. Бактериите се утаяват чрез центрофуга, за 15 минути при 10000 x g. Супернатанта се отстранява и отново се ресуспендират бактериите в 100-300 мкл вода (за проби от култура), или в 100 мкл вода (за директен материал от пациенти) чрез вортекс.

12.2.1.5.1.3. Инкубират се бактериите за 20 минути при 95°C (водна баня).

12.2.1.5.1.4. Инкубират се 15 минути в ултразвукова баня или се поставят във фризер на минус 20°C.

12.2.1.5.1.5. Центрофугират се 5 минути на пълна скорост и директно се използват 5 мкл от супернатанта за PCR. В случай, че ДНК разтворът ще се съхранява за продължителен период от време, супернатанта се прехвърля в нова епруветка. Изолацията на ДНК може да се осъществява и чрез комерсиалния кит GenoLyse.

12.2.1.5.2. Амплификация

Приготвя се сместа за амплификация (45 мкл) без ДНК. ДНК пробата трябва да бъде добавена в отделено пространство. Сместа за епруветка съдържа: 35 мкл от предоставения микс, означен като AM-B; и 10 мкл AM-A Отрицателната контролна проба, съдържа 5 мкл вода вместо ДНК разтвор. Приготвя се основна смес, съдържаща количеството за всички проби, и се разбърква добре (не се използва вортекс). Разпределят се по 45 мкл във всяка от приготвените PCR епруветки. Добавят се 5 мкл ДНК разтвор (20-100 нг ДНК) до получаване на окончателен обем от 50 мкл и се поставят в термосайкълъра на програма с конкретни параметри (Таблица 21).

Таблица 21: Амплификационен профил

Продължителност	Температура	Проби от култура	Проби от клиничен материал
15 минути	95°C	1 цикъл	1 цикъл
30 секунди	95°C	10 цикъла	20 цикъла
2 минути	65°C		
25 секунди	95°C	20 цикъла	30 цикъла
40 секунди	50°C		
40 секунди	70°C		
8 минути	70°C	1 цикъл	1 цикъл

Продуктите за амплификация се съхраняват при температура от плюс 4 до минус 20°C.

12.2.1.5.3. Хибридизация:

Предварително се загрява разклащачата платформа TwinCubator до 45°C с максимално допустимо отклонение от температурата +/-1°C. Предварително се загряват разтворите HYB и STR до 37-45°C. Разтварят се разтворите Конюгат концентрат (CON-C, оранжев) и Субстрат концентрат (SUB-C, жълт) 1:100 със съответния буфер (CON-C с CON-D, SUB-C с SUB-D) в нужните количества. За всеки стрип се добавят 10 мкл концентрат към 1мкл от съответния буфер. Разбърква се добре и се загрява до

стайна температура. Разрежденият SUB-C е стабилен 4 седмици, ако се съхранява на стайна температура, защитен от светлина.

12.2.1.5.3.1. Разреждат се 20 мкл Разтвор за денатуриране (DEN, син) в края на всяко от използваните кладенчета;

12.2.1.5.3.2. Добавят се към разтвора 20 мкл амплифицирана проба, разбърква се добре с пипета и се инкубира при стайна температура 5 минути. Използвайки пинцета се изваждат стриповете от епруветката и се отбелязват с молив под оцветения маркер;

12.2.1.5.3.3. Внимателно се добавя към всяко кладенче по 1 мкл предварително загрят Буфер за хибридизация (HYB, зелен). Внимателно се разклаща ваната, докато разтворът придобие хомогенен цвят. Не трябва да се разлива разтвор в съседните кладенчета;

12.2.1.5.3.4. Поставя се стрип във всяко кладенче. Стриповете трябва да са напълно покрити с разтвор и обвитата страна (разпознава се по оцветения маркер близо до долния край) трябва да сочи нагоре. Пинцетите се почистват внимателно след всяка употреба, за да се предотврати замърсяване. Това важи и за всички стъпки, които са описани по-долу;

12.2.1.5.3.5. Ваната се поставя в разклащащата платформа TwinCubator и се инкубира 30 минути при 45°C;

12.2.1.5.3.6. С пипета се аспирира напълно Буфера за хибридизация;

12.2.1.5.3.7. Добавя се 1 мкл Разтвор за промиване (STR, червен) към всеки стрип и се инкубира 15 минути при 45°C във водната баня TwinCubator;

12.2.1.5.3.8. От тази стъпка нататък се работи при стайна температура. Отстранява се изцяло Разтвора за промиване;

12.2.1.5.3.9. Измива се всеки стрип веднъж с 1 мкл Разтвор за изплакване (RIN) за 1 минута в разклащащата платформа на TwinCubator;

12.2.1.5.3.10. Добавя се 1мкл разтворен Конюгат към всеки стрип и се инкубира 30 минути върху разклащащата платформа на TwinCubator;

12.2.1.5.3.11. Отстранява се разтвора и се измива всеки стрип два пъти за 1 минута с 1мкл Разтвор за изплакване (RIN) и веднъж за 1 минута с приблизително 1мкл дестилирана вода върху разклащащата платформа на TwinCubator;

12.2.1.5.3.12. Добавя се 1мкл разтворен субстрат към всеки стрип и се инкубира далеч от светлина, без да се разклаща;

12.2.1.5.3.13. Реакцията се спира, като за кратко се изплаква два пъти с дестилирана вода;

12.2.1.5.3.14. Стриповете от ваната се отстраняват, използвайки пинцети и се изсушават между два слоя абсорбираща хартия.

12.2.1.5.4. Оценка и интерпретация на резултатите

Стриповете се залепват на оценъчен лист и се съхраняват далече от светлина. Всеки стрип има общо 27 зони на реакция, както е представено в Приложение 15: Стрип на теста GenoType® MTBDRplus с обозначени зони на реакция. Отчитането на теста: точното му изпълнение и правилното функциониране на реагентите, се гарантира от налични 5 (вътрешни) контролни зони върху мембранни стрипове. Те са: зона Контрол на конюгацията за проверка на свързването на конюгата върху стрипа и правилна хромогенна реакция; зона Контрол на амплификацията за проверка на успешното протичане на реакцията по амплификация и три зони Контрол на съответните локуси (groB, katG, inhA) за проверка на оптималната чувствителност на реакцията за всички тествани генни локуси.

12.2.1.5.4.1. Контрол на конюгацията (CC) – Ако тестът е извършен правилно, в тази зона следва да се появи линия (банд), показваща ефикасността на свързването на конюгата и реакцията със субстрата.

12.2.1.5.4.2. Контрол на амплификацията (AC) – Когато тестът е извършен правилно, контролен ампликон, получен по време на амплификацията, ще се свърже със зоната за Контрол на амплификацията върху стрипа. Затова, липсващата ивица сочи за грешки по време на подготовката за амплификация или преноса на инхибитори за амплификация с изолираната ДНК. В случай на положителен резултат от теста, маркировката на зоната за Контрол на амплификацията може да бъде слаба. В този случай, реакцията по амплификация е извършена правилно и не се налага тестът да бъде повтарян.

12.2.1.5.4.3. *M. tuberculosis complex* (TUB) – Тази зона хибридизира с ампликони, получени от всички съставки на *M. tuberculosis complex*. Ако зоната TUB е отрицателна, тестваната култура/материал не принадлежи към *M. tuberculosis complex* и не може да бъде оценен с този тест.

12.2.1.5.4.4. Контрол на локуса (*ropB*, *katG* и *inhA*) – Зоните за Контрол на локуса разпознават специфичния за региона ген за съответния локус и трябва да присъстват.

12.2.1.5.4.5. Контролни (див тип) сонди – Контролните (див тип) сонди съдържат най-важните региони на резистентност на съответните гени (Приложение 16, Таблици 22, 23 и 24). Когато всички контролни (див тип) сонди на ген се отговорят положително (наличие на банд) и няма видима мутация в рамките на изследваните региони тестваният щам МТС е чувствителен към съответния антибиотик.

В случай на мутация, съответния ампликон не може да се свърже със съответната контролна (див тип) сонда. Следователно, отсъствието на маркировка (банд) за поне една от контролните (див тип) сонди показва резистентност на тествания щам МТС към съответния антибиотик.

Само онези ивици, чиито интензитети са приблизително или по-силни от тази на зоната за Контрол на амплификацията се взимат под внимание.

Всяка схема, отклоняваща се от схемата на контролна (див тип) сонда, показва резистентност на тествания щам. Получената схема на свързване при сонди с *groV*, позволява да се направи заключение за резистентността към Рифампицин на тествания щам, а получената схема на свързване при сондите с *katG* позволява да се направи заключение за високата степен на резистентност към Изониазид, съответно схемата на свързване, получена при сондите с *inhA* позволява да се направи заключение за ниската степен на резистентност към Изониазид на тествания щам.

12.2.1.5.4.6. Мутационни сонди

Мутационните сонди отчитат някои от най-разпространените относително устойчиви мутации (Таблица 22, 23 и 24). В сравнение с други сонди, положителните маркировки на мутационни сонди *groV* MUT2A и MUT2B може да покажат по-слаба сила на сигнала.

Само онези ивици, чиито интензитети са приблизително толкова силни, колкото тези на зоната за Контрол на амплификацията или по-силни се взимат под внимание.

Всяка схема, отклоняваща се от схемата на контролната (див тип) сонда, показва резистентност на тествания щам. Получената схема на свързване при сондите с *groV* позволява да се направи заключение за резистентността към Рифампицин, получената схема на свързване при сондите с *katG* - за високата степен на резистентност, съответно получената от сондите с *inhA* схема на свързване - за ниската степен на резистентност към Изониазид на тествания щам.

Могат да бъдат наблюдавани следните ситуации: тестваната проба да съдържа хетерогенен шам и ако при изследване, шамът прояви само частична резистентност, може да се появи една от мутационните сонди, както и съответната контролна (див тип) сонда или тестваната проба да съдържа повече от един шам *M. tuberculosis* комплекс (заради смесена култура или замърсяване) и ако поне един от тези шамове крие мутация, може да се появи една от мутационните сонди, както и съответната контролна (див тип) сонда.

Таблица 22: Мутации в ген *rpoB* и съответните контролни (див тип) сонди и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирани кодони	Мутационна сонда	Мутация
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V
			D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y
			H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L
			S531P S531Q* S531W L533P

* Тази рядка мутация все още е отчетена само теоретично (*in silico*). Поради тази причина е възможно тя да не може да бъде отчетена *in vitro*.

Таблица 23: Мутации в ген *katG* и съответните контролни (див тип) сонди и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирани кодони	Мутационна сонда	Мутация
------------------------------------	--------------------	------------------	---------

katG WT1		315	katG MUT1		S315T1
			katG MUT2		S315T2

Таблица 24: Мутации в промоторния регион на *inhA* и съответните контролни (див тип) сонди и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирана позиция на нуклеинова киселина	Мутационна сонда	Мутация
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

12.2.1.5.4.7. Ограничения

Както при всички останали анализи, базирани на ДНК, този тест проверява само секвенцията на нуклеиновата киселина, а не секвенцията на аминокиселината. Затова е възможно мутациите, които не причиняват обмен на аминокиселини (тихи мутации), все пак да предизвикат отсъствие на една от контролните (див тип) сонди. Най-новите данни показват, че вместо мутация L533P, съответния щам на *M. tuberculosis* все още може да бъде чувствителен към RMP. Затова, ако ивица WT8 липсва, а пробата *rpoB* MUT3 не се проявява, трябва да се вземат предвид резултатите от определянето на фенотипичната резистентност. Тестът GenoType® MTBDRplus отчита само онази резистентност на *M. tuberculosis* комплекс, която произхожда от *rpoB*, *katG* и *inhA* ген регионите. Резистентността, произхождаща от мутациите на други генетични региони, както и други механизми на резистентност към Рифампицин и Изониазид няма да бъдат отчетени от този тест.

12.2.2. Молекулярно генетични методи за определяне на резистентността към втори ред противотуберкулозни лекарства

12.2.2.1. Принцип

Тестът GenoType® MTBDRsl се базира на технологията DNA-STRIP® и позволява молекулярно генетично определяне на *M. tuberculosis* комплекс и резистентността му към флуорохинолони (Офлоксацин и Моксифлоксацин) и/или аминогликозиди/циклични пептиди (антибиотици за инжекционно приложение като Капреомицин, Виомицин/Канамицин и Амикацин) и/или Етамбутол от културелни проби или положителни на директна микроскопия белодробни клинични проби т.е. чрез този тест даден изолат може да бъде окачествен като XDR-TB. Определянето на резистентността към флуорохинолони е възможно с отчитане на най-важните мутации на гена *gyrA* (кодиращ за ДНК-гираза). За отчитане на резистентността към аминогликозиди/циклични пептиди, гена 16S рРНК (*rrs*) и за отчитане резистентността към Етамбутол се изследва гена *embB* (който заедно с гените *embA* и *embC* кодира арабинозил трансфераза).

Апаратурата, процедурите по изолация на ДНК, амплификация и хибридизация са идентични с тези, посочени в т. 12.2.1.5.

12.2.2.2. Оценка и интерпретация на резултатите

Всеки стрип има общо 22 зони на реакция, както е представено в Приложение 17: Стрип на теста GenoType® MTBDRsl с обозначени зони на реакция

12.2.2.2.1. Отчитането на пробите е съобразено с контролите, както при теста MTBDRplus: контрол на конюгацията (CC); контрол на амплификацията (AC) и M. tuberculosis комплекс (TUB).

12.2.2.2.2. Контрол на локуса (*gyrA*, *rss* и *embB*) Зоните за Контрол на локуса разпознават специфичния за региона ген за съответния locus и трябва винаги да бъдат оцветени положително. Ако нито пробата за Контрол на локуса, нито контролната (див тип сонда или мутационните сонди от един от трите изследвани гена, се прояви, тестът не може да бъде оценен.

12.2.2.2.3. Контролни (див тип) сонди

Контролните (див тип) сонди съдържат най-важните региони на резистентност на съответните гени (Таблицы 25, 26 и 27). Когато всички контролни (див тип) сонди на ген се оцветят положително, няма видима мутация в рамките на изследваните региони – тестваният щам е чувствителен към съответните антибиотици. В случай на мутация, съответния ампликон не може да се свърже със съответната контролна (див тип) сонда. Следователно, отсъствието на маркировка за поне една от контролните (див тип) проби показва резистентност на тествания щам към съответните антибиотици. Само онези ивици, чиито интензитети са приблизително силни колкото или по-силни от тази на зоната за Контрол на амплификацията се взимат под внимание. Всяка схема, отклоняваща се от схемата на контролната (див тип) сонда, показва резистентност на тествания щам. Получената схема на свързване при сондите с *gyrA* позволява да се направи заключение за резистентността към флуорохинолони (Офлоксацин или Моксифлоксацин), получената схема на свързване при пробите с *rss* позволява да се извади заключение за резистентността към аминогликозиди (Капреомицин или Виомицин/циклични пептиди (Канамицин или Амикацин), а схемата на свързване, получена при сондите с *embB* позволява да се заключи, че тестваният щам е резистентен към Етамбутол.

12.2.2.2.4. Мутационни сонди

Мутационните сонди отчитат някои от най-разпространените относително устойчиви мутации (Таблицы 25, 26 и 27).

Таблица 25: Мутации в ген *gyrA* и съответните контролни (див тип) сонди и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирани кодони	Мутационна сонда	Мутация	Фенотипна резистентност ¹
<i>gyrA</i> WT1	85-90	-	C88S	FQ
<i>gyrA</i> WT1		-	A88T	
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
<i>gyrA</i> WT2		<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
<i>gyrA</i> WT3		<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	
<i>gyrA</i> WT3		<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y	
<i>gyrA</i> WT3		<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
<i>gyrA</i> WT3		<i>gyrA</i> MUT3D	D94H ²	

¹ FQ: флуорохинолони (Офлоксацин и Моксифлоксацин); ^R = резистентност

² Тази рядка мутация все още е отчетена само теоретично (*in silico*). Поради тази причина е възможно тя да не може да бъде отчетена *in vitro*.

Таблица 26: Мутации в ген *rrs* и съответните контролни (див тип) сонда и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирани кодони	Мутационна сонди	Мутация	Фенотипна резистентност*
rrs WT1	1401	rrs MUT1	A1401G	CAP ^R , Vio ^S , AMK ^R , KAN ^R
	1402	-	C1402T	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^S , KAN ^R
rrs WT2	1484	rrs MUT12	G1484T	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^R , KAN ^R

* CAP: Капреомицин, Vio: Виомицин, KAN: Канамицин, AMK: Амикацин
^R = резистентност; ^S = чувствителност

Таблица 27: Мутации в ген *embB* и съответните контролни (див тип) сонди и мутационни сонди

Липсващи контролни (див тип) сонди	Анализирани кодони	Мутационна сонди	Мутация	Фенотипна резистентност
embB WT	306	embB MUT1A	M306I*	EMB ^R
		embB MUT1B	M306V	EMB ^R
		-	M306I**	EMB ^R
		-	M306I***	EMB ^R

EMB: Етамбутол

* Основна обмяна при кодон 306: ATG→ATA

** Основна обмяна при кодон 306: ATG→ATC

*** Основна обмяна при кодон 306: ATG→ATT

^R = резистентност; ^S = чувствителност

12.2.2.3. Ограничения

Както при всички останали анализи, базирани на ДНК, този тест проверява само секвенцията на нуклеиновата киселина, а не секвенцията на аминокиселината. Затова е възможно мутациите, които не причиняват обмен на аминокиселини (тихи мутации), все пак да предизвикат отсъствие на една от контролните (див тип) сонди.

На теория резистентност може да съществува въпреки схемата на контролната (див тип) сонда. Ако при изследване, пробата съдържа щам, който е развил хетерорезистентност и резистентност, която се дължи на мутация, непокрита от мутационните сонди, ще се появи схема на контролна (див тип) сонда. Аналогично, ако пробата съдържа повече от един щам на *M. tuberculosis complex* (заради смесени култури или замърсяване) и един от тях крие мутация, непокрита от мутационните сонди, ще се появи и схема на контролна (див тип) сонда.

Тестът GenoType[®] MTBDRsl отчита само онзи резистентност на *M. tuberculosis complex*, която произхожда от *gyrA*, *rrs* и *embB* ген регионите. Резистентността, произхождаща от мутациите на други региони, както и други механизми на резистентност към флуорохинолони, аминокликозиди/циклични пептиди или Етамбутол, няма да бъдат отчетени от този тест.

12.2.2.4. Контрол на качеството:

Освен вътрешните и външни контроли, гарантиращи правилното изпълнение на стандартните оперативни процедури при конкретното изпълнение на тестовете GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl, следва лабораториите, осъществяващи този тип диагностика да участват в съответните схеми на външна оценка на качеството, организиран от НРЛ ТБ, НЦЗПБ, респ. от чуждестранна организация.

12.2.3. Молекулярно - генетични методи за определяне на МТС и резистентност към Рифампицин (Xpert MTB/RIF Real Time PCR).

12.2.3.1. Принцип: През 2011г. СЗО препоръча използването на нов молекулярно-генетичен метод: Xpert MTB/RIF. Това е автоматизирана технология за амплификация на нуклеинови киселини за бързо и едновременно откриване на туберкулоза и Рифампицинова резистентност, базирани на Real-Time PCR. В рамките на 2 часа чрез сравнително прост и надежден тест се открива МТС, както и мутации в *groV* гена, обуславящи резистентността към Рифампицин на откритите туберкулозни бактерии.

12.2.3.2. Апаратура и реактиви.

Тестът изисква специфичната хардуерна платформа, както и диагностични китове (касети), пипети за еднократна употреба и ръкавици. Хардуерът интегрира обработката на пробата, PCR, и анализа на PCR фрагмента. Автоматизираната система е GeneXpert System, с различен брой гнездна за поставяне на касетите за еднократна употреба. Касетите съдържат всички ingredienti, необходими за осъществяване на PCR в реално време след добавяне на деконтаминирана или недеконтаминирана хранка за откриване и идентифициране на *M. tuberculosis complex* и рифампицинова резистентност.

12.2.3.3. Материали.

Материалите за изследване могат да бъдат белодробни и извънбелодробни, като чувствителността и специфичността варира в големи граници, подробно представени в Методично указание за организация на работата с бързи методи на диагностика на туберкулозата на територията на България. В същото ръководство са посочени: ТБ лабораториите, където ще се позиционират апаратите в страната; алгоритъма и организацията на изследването, както и основните принципи на въвеждането на това изследване в България.

12.2.3.4. Процедура

12.2.3.4.1 Стандартна оперативна процедура за изследване на белодробни материали – недеконтаминирани материали или седимент след деконтаминация

12.2.3.4.1.1. С помощта на стерилна пипета се добавя двойно по-голямо количество от това на пробата лизиращ буфер за Xpert MTB / RIF хранки с обем по-голям от 1 мл и в съотношение 3: 1 към седимента на деконтаминирана хранка с обем по-голям от 0,5 мл. По-големият обем на добавения буфер към седимента е необходим, за да се покрият изискванията за минимален обем на пробата за анализ.

12.2.3.4.1.2. Разклаща се добре 10-20 пъти или на вортекс за най-малко 10 секунди.

12.2.3.4.1.3. Инкубира се за 10 минути при стайна температура и след това се разклаща пробата отново 10-20 пъти.

12.2.3.4.1.4. Инкубира се при стайна температура в продължение на още 5 минути.

12.2.3.4.1.5. Касетата Xpert MTB / RIF се надписва с лабораторния номер на пробата.

12.2.3.4.1.6. С помощта на стерилна пипета се прехвърля 2мл от обработената проба в надписаната Xpert MTB / RIF касета.

12.2.3.4.1.7. Касетата се поставя в GeneXpert системата, следвайки инструкциите на производителя.

12.2.3.4.2. СОП за обработване на екстрапулмонални проби (ликвор, лимфни възли и други тъкани) за Xpert MTB/RIF анализ.

12.2.3.4.2.1. Стандартна оперативна процедура за изследване на извънбелодробни материали: лимфни възли и други тъкани.

12.2.3.4.2.1.1. С помощта на стерилни пинсети и ножици, пробата се нарязва на малки парченца в стерилен хаван (или тъканен хомогенизатор);

12.2.3.4.2.1.2. Добавят се приблизително 2 мл. стерилен фосфатен буфер;

12.2.3.4.2.1.3. Тъканта се смита до получаване на хомогенна суспензия;

12.2.3.4.2.1.4. Използвайки стерилна пипета, суспензията се прехвърля в епруветка с обем 50 мл.;

12.2.3.4.2.1.5. Добавя се равен обем от NALC/NaOH или 4% NaOH (в зависимост от метода на деконтаминация, който се ползва в лабораторията и се затяга капачката;

12.2.3.4.2.1.6. Разклаща се до пълна хомогенизация;

12.2.3.4.2.1.7. Епруветката се оставя да престои 15 минути при стайна температура;

12.2.3.4.2.1.8. Допълва се до 50 мл. с фосфатен буфер;

12.2.3.4.2.1.9. Центрофугира се при 3000 g в продължение на 15 минути;

12.2.3.4.2.1.10. Внимателно се отлива надутаечната течност в контейнер за биологични отпадъци, съдържащ дезинфектант с туберкулоцидно действие;

12.2.3.4.2.1.11. Седиментът се ресуспендира с приблизително 1-2 мл фосфатен буфер;

12.2.3.4.2.1.12. Използва се стерилна пипета за инокулиране на предварително надписани епруветки течна среда и/или твърда хранителна среда;

12.2.3.4.2.1.13. Надписва се касета Xpert MTB/RIF с лабораторния номер на пробата;

12.2.3.4.2.1.14. С помощта на стерилна пипета се пренасят около 0,7мл от хомогенизираната проба в конична епруветка с винтова капачка. Да се избягва пренасянето на нехомогенизирани частици.

12.2.3.4.2.1.15. С помощта на стерилна пипета се добавя двойно на пробата количество лизиращ буфер за Xpert MTB/RIF (например, ако пробата е 0,7 мл се добавя 1,4 лизиращ буфер).

12.2.3.4.2.1.16. Разклаща се добре 10-20 пъти или на вортекс за най-малко 10 секунди..

12.2.3.4.2.1.17. Инкубира се за 10 минути при стайна температура и след това се разклаща отново 10-20 пъти.

12.2.3.4.2.1.18. Инкубира се при стайна температура в продължение на още 5 минути.

12.2.3.4.2.1.19. С помощта на стерилна пипета се прехвърля 2 мл. от обработената проба в надписаната Xpert MTB / RIF касета.

12.2.3.4.2.1.20. Касетата се поставя в GeneXpert системата, следвайки инструкциите на производителя.

12.2.3.4.2.2. Стандартна оперативна процедура за изследване на извънбелодробни материали: ликвор.

12.2.3.4.2.2.1. При повече от 5 мл. ликвор:

12.2.3.4.2.2.1.1. Прехвърляне на цялата проба в конична епруветка за концентриране на пробата чрез центрофугиране 3 000 g за 15 минути;

12.2.3.4.2.2.1.2. Внимателно се отлива надутаечната течност в контейнер за биологични отпадъци, съдържащ дезинфектант с туберкулоцидно действие;

12.2.3.4.2.2.1.3. Седиментът се ресуспендира с 2мл. лизис буфер;

12.2.3.4.2.2.1.4. Надписва се Xpert MTB / RIF касетата с лабораторния номер на пробата;

12.2.3.4.2.2.1.5. С помощта на стерилна пипета се прехвърля 2 мл концентрираната проба ликвор в Xpert MTB / RIF касета;

12.2.3.4.2.2.1.6. Касетата се поставя в GeneXpert системата, следвайки инструкциите на производителя.

12.2.3.4.2.2.2. При количество 1-5 мл. ликвор:

12.2.3.4.2.2.2.1. Към ликвора се добавя равно количество лизис буфер;

12.2.3.4.2.2.2.2. Надписва се Xpert MTB/RIF касетата с лабораторния номер на пробата;

12.2.3.4.2.2.2.3. С помощта на стерилна пипета се прехвърля 2 мл. от сместа в Xpert MTB/RIF касетата;

12.2.3.4.2.2.2.4. Касетата се поставя в GeneXpert системата, следвайки инструкциите на производителя.

12.2.3.4.2.2.3. При количество 0,1 – 1 мл ликвор:

12.2.3.4.2.2.3.1. Към ликвора се добавя лизис буфер до 2мл.;

12.2.3.4.2.2.3.2. Надписва се Xpert MTB/RIF касетата с лабораторния номер на пробата;

12.2.3.4.2.2.3.3. С помощта на стерилна пипета се прехвърля 2 мл от сместа в Xpert MTB/RIF касетата;

12.2.3.4.2.2.3.4. Касетата се поставя в GeneXpert системата, следвайки инструкциите на производителя.

Забележка: При кървав ликвор могат да се получат фалшиво-отрицателни резултати от Xpert MTB/RIF изследването.

Забележка: Количество на ликвора, по-малко от 0,1 мл е недостатъчно за изследване чрез Xpert MTB/RIF.

12.2.3.4.2.2.4. Резултати и интерпретация

Резултатът за откриване на туберкулозни бактерии може да бъде положителен, отрицателен и неопределен. Положителният резултат от своя страна може да бърее Рифампицин положителен или отрицателен. Отчитането и записа са автоматични.

12.2.3.4.2.2.5. Биобезопасност

Трябва да се използват лични предпазни средства и мерки, подходящи при работа с микобактерии. Прехвърлянето на пробите в касетата трябва да се извърши в ламинарен бокс, клас 2. След прибавянето на лизисния буфер, значително се намалява нивото на жизнеспособни бактерии. Пълните касети не трябва да се отварят отново или да се работи със съдържанието им. След получаване на резултат, използваните касети трябва да се третират като биологично опасен отпадък, съгласно с инструкциите за управление на отпадъците.

12.2.3.5. Контрол на качеството:

Освен вътрешните контроли, гарантиращи правилното изпълнение на стандартните оперативни процедури при конкретното изпълнение на тестовете Xpert MTB/RIF, следва лабораториите, осъществяващи този тип диагностика да участват в съответните схеми на външна оценка на качеството, организиран от НРЛ ТБ, НЦЗПБ, респ. от чуждестранна организация.

12.2.4. Методи за генетично типизиране на МТС

Основните методи на генотипизиране, използвани в страната за характеризиране на MDR-TB щамове, разпространени в България са препоръчаните от СЗО методи: сполиготипиране и VNTR/MIRU. Типизирането се осъществява в Националната референтна лаборатория по молекулярна микробиология, НЦЗПБ.

12.2.4.1. Сполиготипиране.

12.2.4.1.1. Принцип

Сполиготипирането (спейсърно типизиране, Spacer Oligonucleotide Typing), е молекулярно генетичен метод чрез който се идентифицират ДНК полиморфизми в участъка от прави повтори в генома на щамове от комплекса на *M. tuberculosis*. Този специфичен геномен участък включва прави повтори, разделени от уникални участъци (спейсъри). Броят прави повтори и съответно уникалните спейсъри между тях се различават при различните щамове. Амплифицираните след PCR продукти се хибридизират с 43 имобилизирани спейсърни олигонуклеотида, които са ковалентно свързани към мембрана. Детекцията на хибридизиралите PCR продукти се осъществява чрез хемилуминисцентна реакция върху филм. Получените профили (сигнали) се сравняват с международна база данни. Обемът от данни при сполиготипирането е стандартизиран и значително улеснен, защото може да се представи в цифров вид – бинарен код. Бинарният код може да бъде превърнат в октетен, като по този начин се определят и съответните сполиготипове (ST или SIT), означавани с цифри. Сполиготиповете се групират в големи семейства и се сравняват с база данни, като по този начин може да бъде определен преобладаващ сполиготип в дадена страна и какво е неговото разпространение в локален и в глобален мащаб.

12.2.4.1.2. Процедура

Стандартните оперативни процедури по: изолиране на ДНК, амплификация, хибридизация и интерпретация са съобразени с изискванията на производителя

12.2.4.1.3. Контрол на качеството

Контрола на качеството се прави с две положителни и една отрицателна контрола: ДНК от *M. tuberculosis* H₃₇R_v и *M. tuberculosis* BCG - за положителна контрола и стерилна вода за отрицателна контрола

Лабораторията, извършваща теста следва да участва във външна оценка на качеството.

12.2.4.2. Типизиране на вариабилни тандемни повтори (VNTR – Variable Number of Tandem Repet или MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units)

В световен мащаб 24 локусният MIRU-VNTR анализ се наложи като най-информативен и предпочитан метод за типизиране на щамове на *M. tuberculosis*.

12.2.4.2.1 Принцип на метода

Променливият брой от тандемни повтори се явяват ценни маркери за определяне на генотипа на *M. tuberculosis* complex. Методът позволява определянето на количеството копия на тандемните повтори в 24 независими полиморфни локуса в генома на *M. tuberculosis*. VNTR генотипизирането се базира на PCR амплификация, използвайки специфични праймери за съпътстващи региони на VNTR и определяне на размерите на ампликоните след електрофореза. Крайният резултат е цифров код, съответстващ на броя на повторите във всеки VNTR локус. Резултатите от получения брой вариабилни фрагменти за отделните VNTR локуси се импортират в интернет on-line сайт, който е програма (софтуер) за обработка.

12.2.4.2.2. Процедура

Стандартните оперативни процедури по: изолиране на ДНК, амплификация, хибридизация и интерпретация са съобразени с изискванията на производителя

12.2.4.2.3. Контрол на качеството

Контрола на качеството се прави с две положителни и една отрицателна контрола: ДНК от *M.tuberculosis* H₃₇R_v и *M.tuberculosis* BCG - за положителна контрола и стерилна вода за отрицателна контрола

Лабораторията, извършваща теста следва да участва във външна оценка на качеството.

Декларация за условия на биобезопасност

До:
НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ
Бул. „Ген. Столетов” № 44 А
1233 гр. София

ДЕКЛАРАЦИЯ

Име на ръководителя на лаборатория:.....

.....

Име на лечебното заведение:.....

Име и код на лабораторията:.....

Аз, долуподписаният:

удостоверявам, че ръководената от мен лаборатория отговаря на условията за осъществяването на микробиологична работа с биологични агенти от група 3 – *M.tuberculosis*, съгласно Наредба № 4 от 2002 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа (обн. ДВ бр.105/8.11.2002 г.).

Декларирам, че изследването е извършено от мен или моят екип; в съответстващата на кода микробиологична лаборатория; при условия, отговарящи на посочената наредба и правилата за техника на безопасност при работа, използвайки лични и колективни предпазни средства (съобразно кода на заявления Външен контрол: респираторни предпазни маски; ръкавици; предпазно работно облекло и обувки; ламинарен бокс, клас 2; антиаерозолна центрофуга и т.н.).

Ръководител лаборатория:

Дата:

Бланка за отговор
на оценяваната лаборатория при Външна оценка на качеството на микроскопското
изследване за киселинно устойчиви бактерии

До:
НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ
Бул. „Ген. Столетов“ № 44 А
1233 гр. София

МИКРОСКОПСКО ИЗСЛЕДВАНЕ

Външна оценка на качеството на микроскопското изследване за киселинно
устойчиви бактерии

Цикъл:.....

Микобактериология - № 224

Краен срок (за изпращане на резултатите в НРЛ по туберкулоза):.....

Код на лабораторията:

Моля, попълнете графите, като изберете съответните кодове, посочени на гърба
на бланката

Препарат №	Код Метод на оцветяване	Код Резултат от микроскопско изследване	Използвани реактиви (производител)	Коментари (ако има такива)
1				
2				
3				
4				
5				

Декларирам, че изследването е извършено от мен или моят екип в съответстващата
на горепосоченият код лаборатория, при условия, отговарящи на Наредба №4 от 2002
г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти
при работа.

Изследването е извършено от:

(име, презиме, фамилия, подпис)

(адрес, телефон, GSM, e-mail)

Дата:**Код Метод на оцветяване**

1	Ziehl-Neelsen (Цил-Нилсен)
2	Kinyoun (Киниън)
3	Флуоресцентен метод
4	Друг

Код Резултат от микроскопско изследване

5	КУБ не се откриват на 100 зрителни полета
6	1-9 КУБ на 100 зрителни полета
7	КУБ (1+) пол.
8	КУБ (2+) пол.
9	КУБ (3+) пол.

Код Метод на деконтаминация

10	N-Acetylcystein/NaOH (NALC)
11	Метод на Петров
12	Друг

Код Хранителни среди за култивиране

13	Твърда хранителна среда (ЛЙ)
14	Течна хранителна среда (MGIT)
15	И твърда, и течна хранителна среда
16	Други

Код Резултат от културелно изследване

17	Без растеж на микобактерии
18	<i>M.tuberculosis</i> complex
19	NTM (атипични микобактерии)
20	Културата е контаминирана (без наличен резултат)

Код Метод на идентификация

21	pNBA
22	Нитрат-редуктазен тест
23	Ниацинов тест
24	Друг

**Бланка за отговор
на оценяваната лаборатория при Външна оценка на качеството на културелното
изследване за туберкулоза**

До:
НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ
Бул. „Ген. Столетов“ № 44 А
1233 гр. София

КУЛТУРЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Външна оценка на качеството на културелното изследване за туберкулоза

Цикъл:

Микобактериология - № 240

Краен срок (за изпращане на резултатите в НРЛ по туберкулоза):

Код на лабораторията:

Моля, попълнете графите, като изберете съответните кодове, посочени на гърба на бланката

Проба №	Код Метод на деконтаминация	Код Хранителни среди за култивиране	Код Резултат от културелно изследване	Код Метод на идентификация
1				
2				
3				
4				
5				

Декларирам, че изследването е извършено от мен или моят екип в съответствието на горепосоченият код лаборатория, при условия, отговарящи на Наредба №4 от 2002 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа.

Изследването е извършено от:

.....
(име, презиме, фамилия, подпис)

.....
(адрес, телефон, GSM, e-mail)

Дата:

**Бланка за отговор
на оценяваната лаборатория при Външна оценка на качеството на теста за
лекарствена чувствителност на туберкулозни бактерии**

До:
НРЛ по туберкулоза, НЦЗПБ
Бул. „Ген. Столетов” № 44 А
1233 гр. София

ТЕСТ ЗА ЛЕКАРСТВЕНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ

**Външна оценка на качеството на теста за лекарствена чувствителност на
туберкулозни бактерии**

Цикъл:
Микобактериология - № 241
Краен срок (за изпращане на резултатите в НРЛ по туберкулоза):
Код на лабораторията:

Проба №	Чувствителност						Коментари (ако има такива)
	(R - резистентен или S - чувствителен)						
	STR	INH	RM P	EMB	PZA		
1							
2							
3							
4							
5							

Моля, посочете използвания метод за ТЛЧ:

Декларирам, че изследването е извършено от мен или моят екип в съответстващата на горепосоченият код лаборатория, при условия, отговарящи на Наредба №4 от 2002 г. за защита на работещите от рискове, свързани с експозиция на биологични агенти при работа.

Изследването е извършено от:

.....
(име, презиме, фамилия, подпис)

.....
(адрес, телефон, GSM, e-mail)

Дата:

Приложение № 5 към т. 6.1.

Анкета за оценка на здравословното състояние на лабораторния служител

Дата на прегледа

Име, презиме, фамилия Възраст

Адрес на лабораторията

Резултат от прегледа при постъпване на работа:.....

Проведена имунизация с БЦЖ ☐ Да ☐ Не

Ако „Да” – кога

Предишно заболяване от туберкулоза ☐ Да ☐ Не

Изход от заболяването:

- ☐ Излекуване
- ☐ Завършено лечение
- ☐ Прекъснато лечение
- ☐ Неефективно лечение

Признаци и симптоми на туберкулоза:

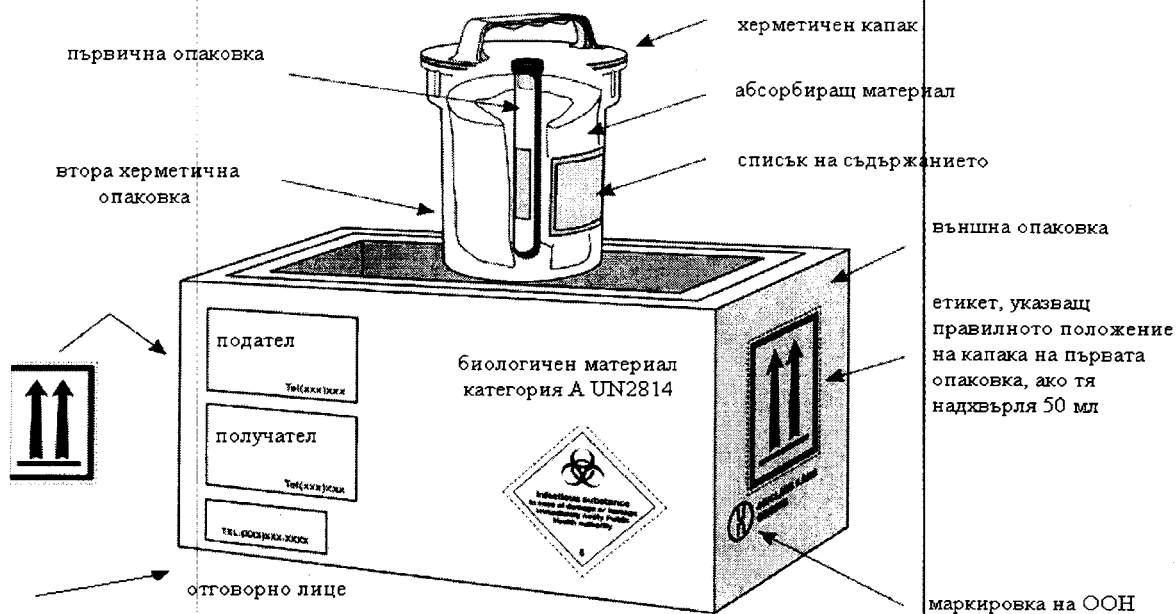
- Кашлица > 3 седмици ☐ Да ☐ Не
- Болки в гърдите ☐ Да ☐ Не
- Загуба на тегло ☐ Да ☐ Не
- Загуба на апетит ☐ Да ☐ Не
- Сънливост ☐ Да ☐ Не
- Нощни изпотявания ☐ Да ☐ Не

Други заболявания:.....

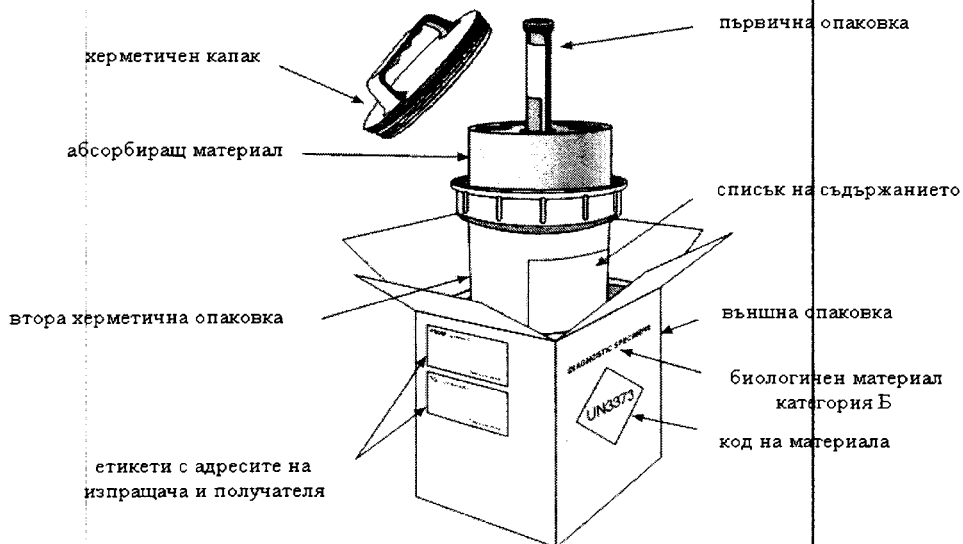
	Проба на Манту			Рентгенография на гръден кош		Микробиологично изследване на храчка			
	Дата	Туберкулин	Резултат	Дата	Резултат	Дата	Резултат микроскопско изсл.	Резултат култура	ТЛЧ
При постъпване									
Повторно изследване									

Предложен тест за HIV ☐ Да ☐ Не
Съгласие на служителя ☐ Да ☐ Не

Тройно пакетираща система при транспорт на биологичен материал – категория А и категория Б



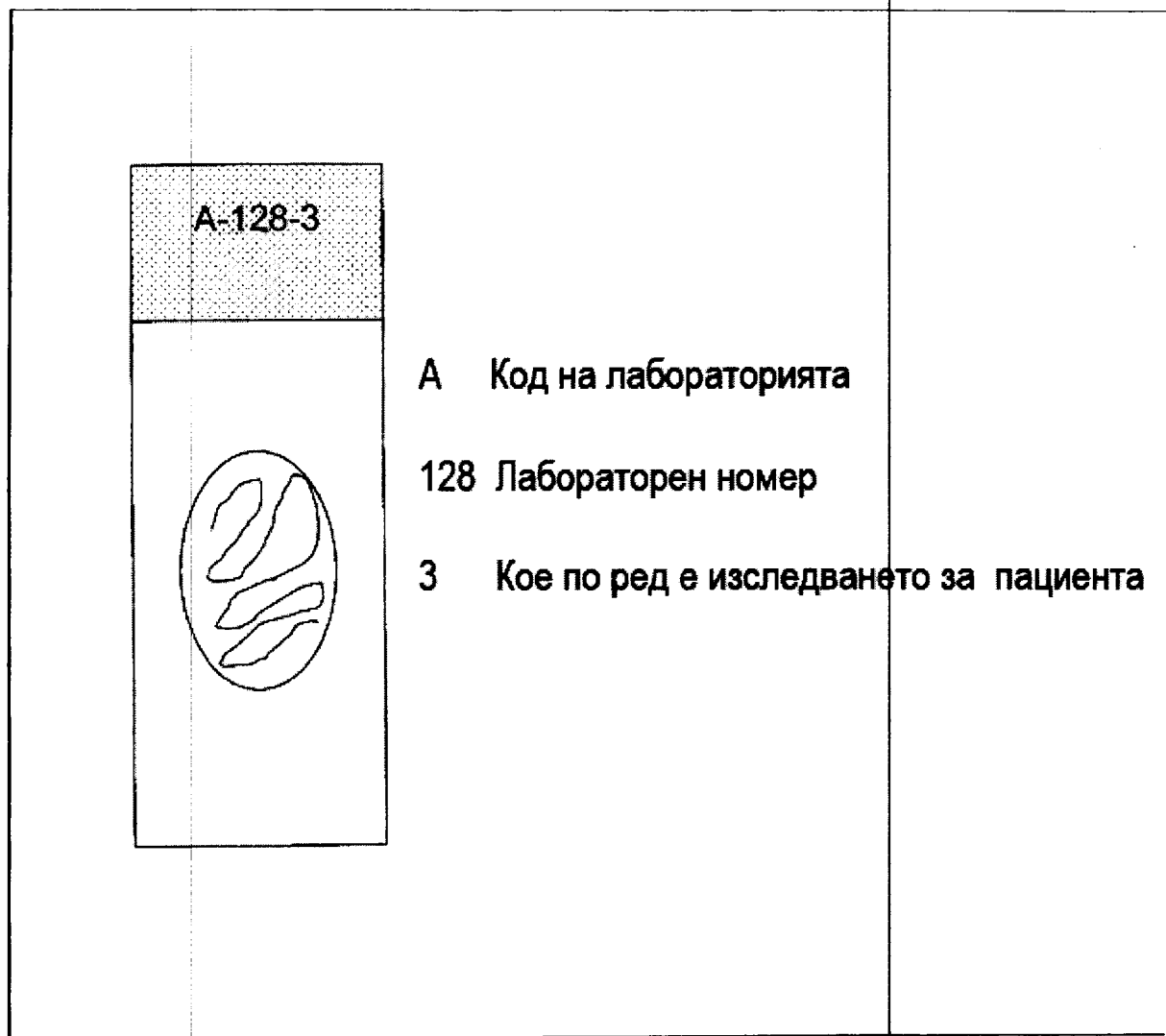
Пример за тройно пакетиране и маркиране на биологичен материал категория А



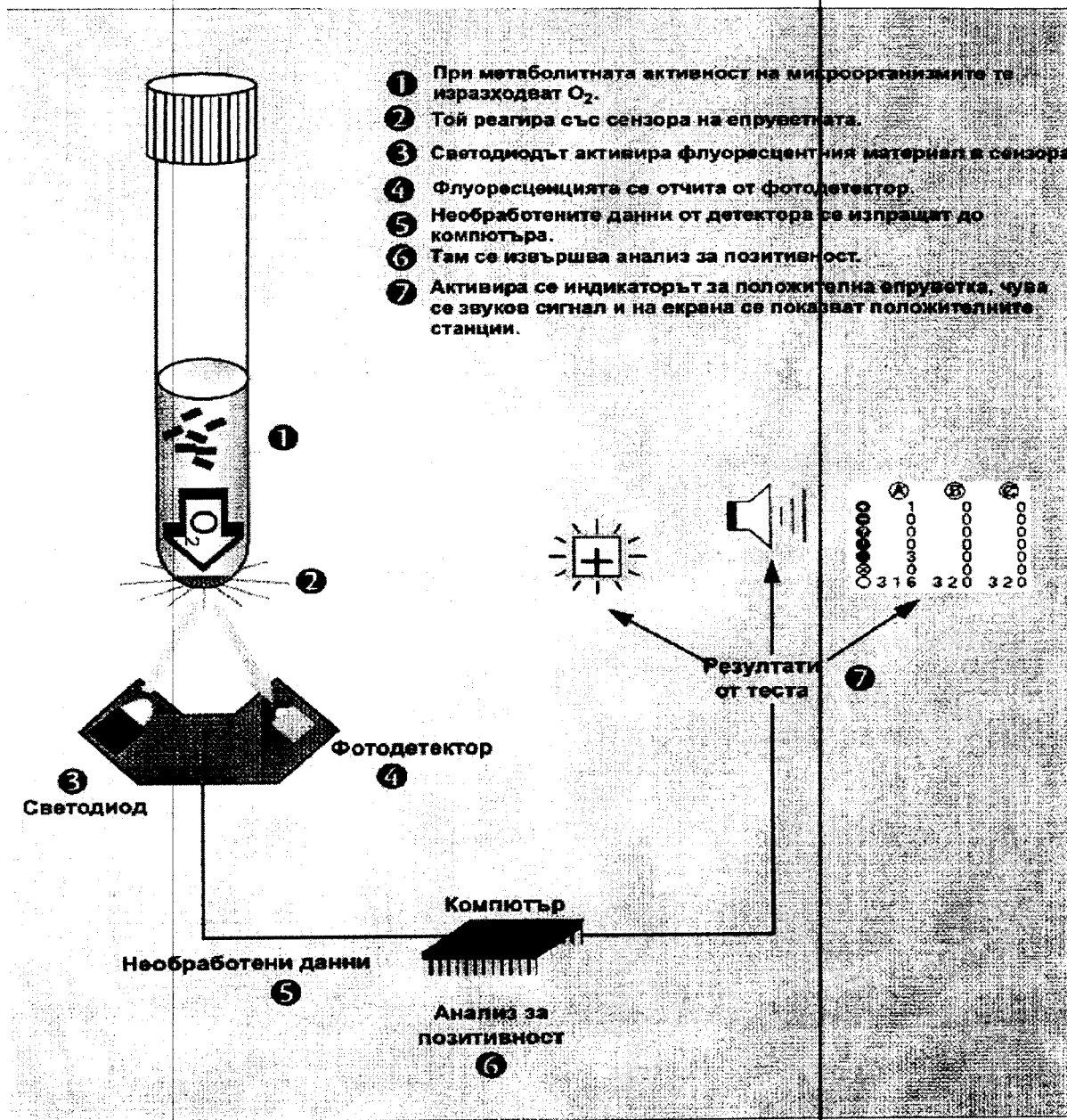
Пример за тройно пакетиране и маркиране на биологичен материал категория Б

Правилно изготвен микроскопски препарат

Върху матирания край на предметното стъкло се отбелязва кодът на лабораторията, лабораторният номер, под който е записано изследването на пациента, и се означава кое по ред изследване е за този пациент.



Принцип на култивиране на микобактерии в автоматизирана система BACTEC MGIT



Приложение № 9 към т. 10.

Форма на съпроводително писмо изпращане на материал (щам) за микробиологично изследване за туберкулоза в НРЛ ТБ

До
НРЛ по туберкулоза
НЦЗПБ, Микробиологичен отдел
1233 София
Бул. „Ген. Н. Столетов“ № 44А
Тел: 02 931 23 22/230, 02 944 64 45

ИСКАНЕ ЗА МИКРОБИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ
ЗА ТУБЕРКУЛОЗА

Име на пациента:
(собствено, бащино, фамилно)

Пол: ☐ М ☐ Ж
(посочва се със знака „X“)

Възраст..... ЕГН/ дата на раждане.....

Адрес по местоживееене:

Причина за изследване:
(посочва се със знака „X“)

☐ Диагноза ☐ Проследяване на лечението ☐ Контактен

Вид на клиничния материал: ☐ хрчка ☐ БАЛ
(посочва се със знака „X“)
☐ ликвор ☐ друг.....
(моля, отбележете какъв)

Дата на вземане на клиничния материал:.....

или

Изолиран щам: лаб. №...../дата на посевка...../ резултат от посевката

Посочете клиничния материал от който е изолиран изпратения щам.....

Вид на исканото изследване:.....
.....
.....

Насочващо лечебно заведение (лаборатория):

Адрес на лечебното заведение:

Лекар, искащ изследването:..... Подпис:.....
(ясно и четливо изписано)

Телефон за контакт с насочващия изследването лекар:.....

Приложение № 10 към т.10

Форма за изпращане на отговор на НРЛ ТБ с резултат от молекулярно-генетно изследване за туберкулоза/микобактерии

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ
МИКРОБИОЛОГИЧЕН ОТДЕЛ
НРЛ ПО ТУБЕРКУЛОЗА

1233 гр. София, бул. "Н. Столетов" № 44а 02/931 23 22/230 и 02/ 944 64 45

РЕЗУЛТАТ ОТ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТУБЕРКУЛОЗА/МИКОБАКТЕРИИ

(попълва се в НРЛ ТБ, НЦЗПБ)

Дата на постъпване на пробата:.....	Лаб. №.....
Пациент: (трите имена)	
Дата на раждане или ЕГН:.....	
Възраст:..... Пол: М ☐ Ж ☐	
Адрес по местоживееене:.....	

Име на насочващото лечебно заведение:.....	
Диагноза:.....	
Лаб. № на изпратения клиничен материал/ щам:.....	
Вид на клиничния материал/ щам:	☐ Храчка ☐ Ликвор ☐ БАЛ ☐ Други.....

Резултат от видова идентификация: <i>M. tuberculosis</i> complex ☐	<i>NTM</i> ☐
--	-------------------------------------

Резултати от тест за лекарствена чувствителност на <i>M. tuberculosis</i> complex:		
Тест MTBDR _{plus} ☐	Тест MTBDR <i>sl</i> ☐	
Рифампицин.....	Флуорохинолони.....	
Изониазид.....	Аминогликозиди/циклични пептиди.....	

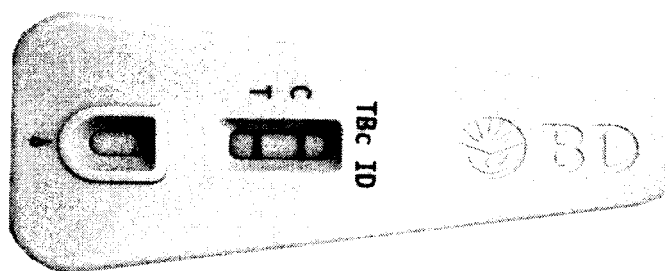
Резултати от тест за видова идентификация на NTM:	
--	--

	Извършил изследването.....
	Подпис.....
	Зав. НРЛ по туберкулоза:
	Подпис:.....
	Дата:

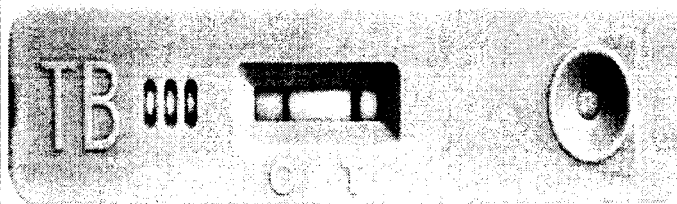
Приложение № 11 към т. 10.4.5.1.

Видове имунохроматографски тестове за МТС, препоръчани от СЗО

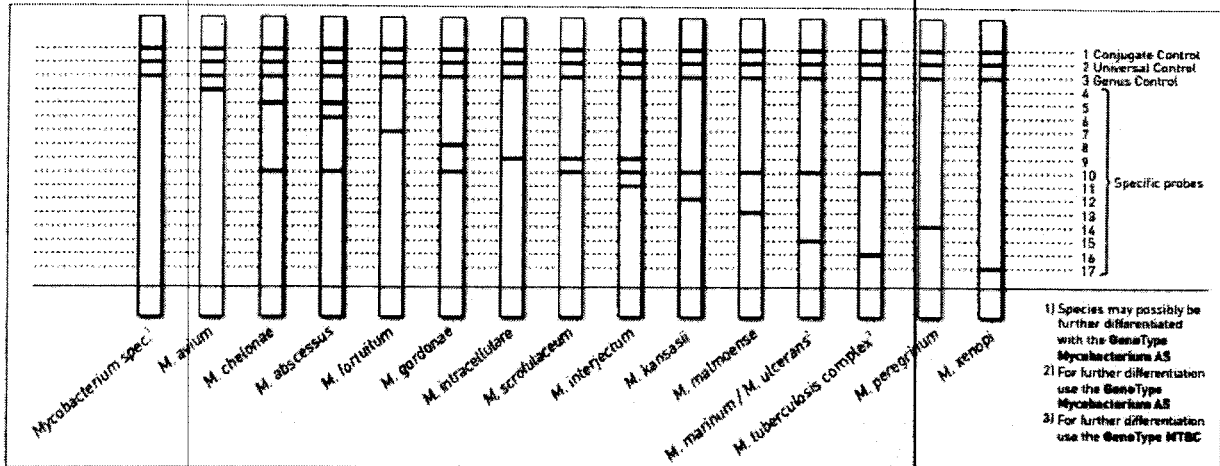
a) BD MGIT TBc Identification Test, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA



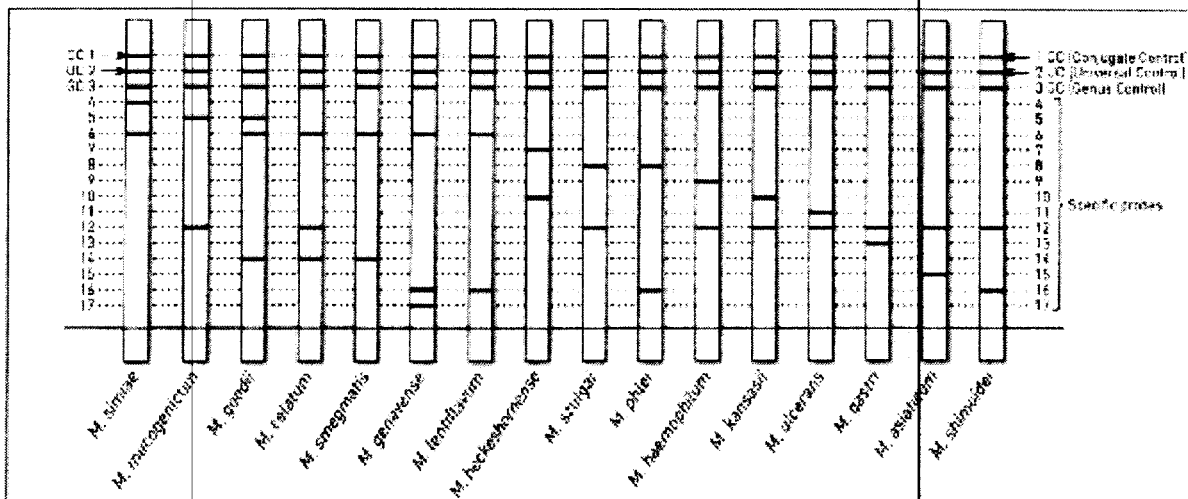
б) Capilia TB-neo, TAUNS Laboratories Co, Numazu, Japan



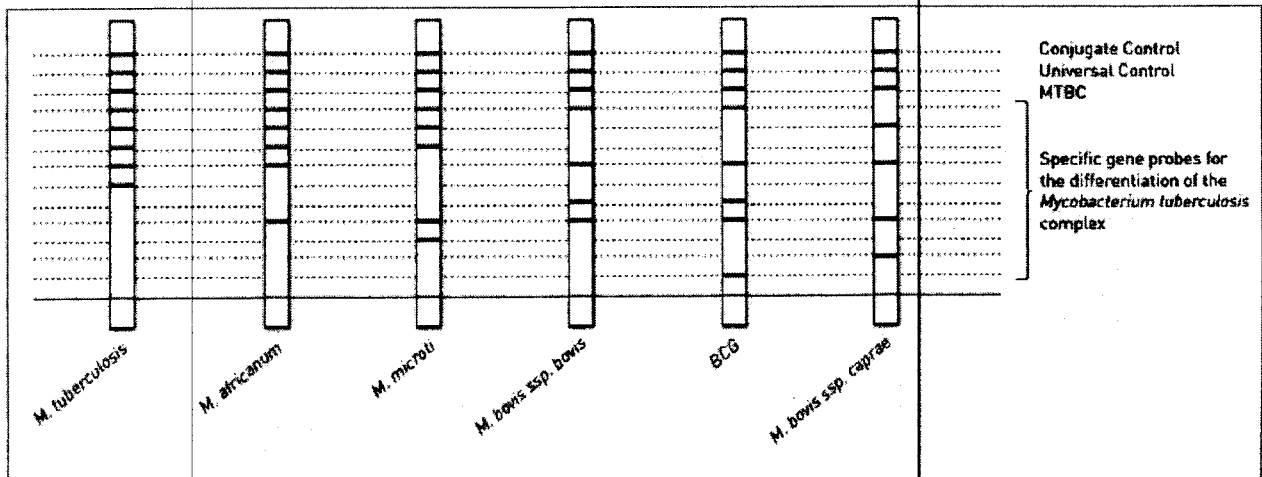
Приложение № 12 към т. 12.1.
Интерпретация за GenoType Mycobacterium CM



Приложение № 13 към т. 12.1.
Интерпретация за GenoType Mycobacterium AS

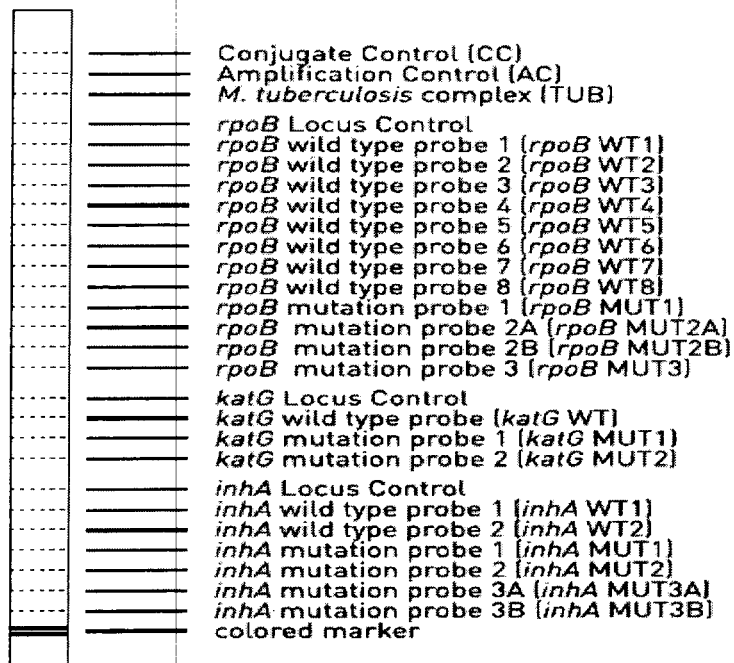


Приложение № 14 към т. 12.1.
Интерпретация за GenoType Mycobacterium MTBC



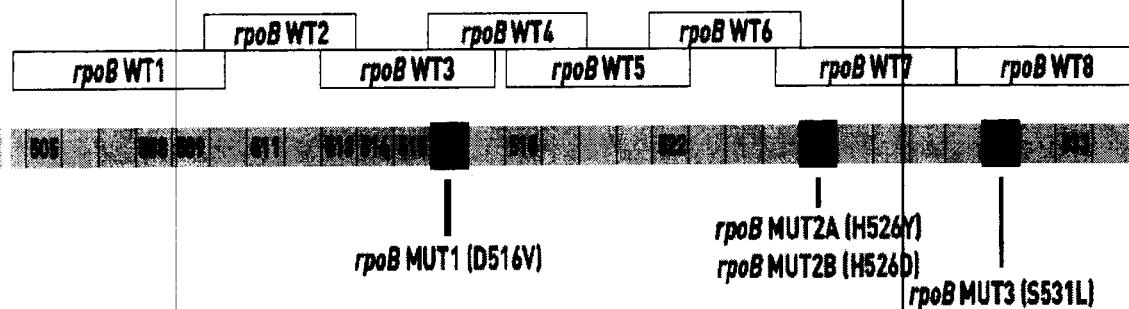
Приложение № 15 към т. 12.2.1.5.4.

Стрип на теста GenoType® MTBDRplus с обозначени зони на реакция



Приложение 16 към т. 12.2.1.5.4.5.:

Схематично представяне на асоциираната с ген *rpoB* резистентност към Рифампицин



rpoB WT1-8: *rpoB* контролни (див тип/) сонди; *rpoB* MUT1-3: *rpoB* мутационни сонди

Приложение № 17 към т. 12.2.2.2.

Стрип на теста GenoType® MTBDRsl с обозначени зони на реакция

.....	=====	Conjugate Control (CC)
.....	=====	Amplification Control (AC)
.....	=====	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
.....	=====	<i>gyrA</i> Locus Control (<i>gyrA</i>)
.....	=====	<i>gyrA</i> wild type probe 1 (<i>gyrA</i> WT1)
.....	=====	<i>gyrA</i> wild type probe 2 (<i>gyrA</i> WT2)
.....	=====	<i>gyrA</i> wild type probe 3 (<i>gyrA</i> WT3)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 1 (<i>gyrA</i> MUT1)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 2 (<i>gyrA</i> MUT2)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 3A (<i>gyrA</i> MUT3A)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 3B (<i>gyrA</i> MUT3B)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 3C (<i>gyrA</i> MUT3C)
.....	=====	<i>gyrA</i> mutation probe 3D (<i>gyrA</i> MUT3D)
.....	=====	<i>rrs</i> Locus Control (<i>rrs</i>)
.....	=====	<i>rrs</i> wild type probe 1 (<i>rrs</i> WT1)
.....	=====	<i>rrs</i> wild type probe 2 (<i>rrs</i> WT2)
.....	=====	<i>rrs</i> mutation probe 1 (<i>rrs</i> MUT1)
.....	=====	<i>rrs</i> mutation probe 2 (<i>rrs</i> MUT2)
.....	=====	<i>embB</i> Locus Control (<i>embB</i>)
.....	=====	<i>embB</i> wild type probe 1 (<i>embB</i> WT1)
.....	=====	<i>embB</i> mutation probe 1A (<i>embB</i> MUT1A)
.....	=====	<i>embB</i> mutation probe 1B (<i>embB</i> MUT1B)
.....	=====	colored marker