

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ФГУН
Государственный научный центр при-
кладной микробиологии и
биотехнологии
_____ И.А. Дятлов
«___» _____ 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора питательных сред для ускоренного определения чувстви- тельности микобактерий туберкулеза к пипразинамиду (PZA-тест)

1. Назначение

PZA-тест предназначен для ускоренного определения чувствительности микобактерий туберкулеза к пипразинамиду непрямым методом.

2. Описание

PZA-тест представляет собой набор готовых к использованию питательных сред, содержащих пипразинамид (PZA), и сред без препарата. Питательные среды находятся во флаконах.

Основой питательных сред является модифицированная среда Левенштейна-Йенсена, которая содержит нитрат калия в концентрации 1 г/л и поддерживает рост микобактерий туберкулеза при пониженном значении pH, равном 5,9.

PZA-тест выпускается комплектом на 2 анализа и состоит из девяти флаконов, четырех стерильных шприцев и цветовой шкалы для регистрации интенсивности окраски. Шесть флаконов (№1) содержат готовую к употреблению контрольную питательную среду без препарата, два флакона (№2) содержат готовую к употреблению питательную среду с пипразинамидом и один флакон (№3) содержит сухой реактив Грисса.

Питательные среды во флаконах №№1-2 представляют собой скошенный гель голубого цвета, а реактив Грисса - кристаллический порошок серовато-розового цвета. Все флаконы завальцованы алюминиевыми колпачками и маркированы соответствующими этикетками: флаконы №1 – синего цвета, №2 – синего цвета с черной полосой, №3 – белого цвета.

3. Состав PZA - теста:

Содержимое	Цвет этикетки на флаконе	Кол-во на 1 анализ	Общее кол-во на 2 анализа
Питательная среда - без препарата (контроль), во флаконе №1	синий	3	6
Питательная среда с пипразинамидом (PZA), 1000 мкг/мл, во флаконе №2	синий с черной полосой	1	2
Реактив Грисса, сухой; 0,375 г, во флаконе №3	белый	1	1
Шприц постоянно прикрепленной иглой, стерильный объемом 1 мл, для посева		1	2
Шприц с иглой, стерильный объемом 5 мл, для раствора реактива Грисса		1	2
Цветовая шкала для определения интенсивности окраски		1	1

4. Принцип действия

Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к пипразинамиду основано на выявлении нитратредуктазной активности. Растущие культуры микобактерий туберкулеза на питательной среде восстанавливают нитрат в нитрит, который регистрируется по цветной реакции с раствором реактива Грисса.

5. Методика определения

5.1. Подготовка PZA-теста

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

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

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

1. При посеве шприцем снимают центральную часть алюминиевого колпачка флаконов №№1-2, затем стерильной иглой от шприца объемом 5 мл в асептических условиях

прокалывают резиновую пробку флакона для дополнительной аэрации. Иглу не уничтожают, а оставляют для дальнейшего использования при учете результатов.

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

5.2 Посев

Для проведения одного анализа следует использовать три флакона №1 с контрольной средой и один флакон №2, содержащий питательную среду с пипразинамидом.

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

Затем засеянные флаконы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 8-21 суток в наклонном положении таким образом, чтобы инокулят равномерно распределялся по всей поверхности скоса среды. Для этого их помещают в упаковочную коробку с предварительно выдавленной перфорированной стенкой.

5.3. Приготовление раствора реактива Грисса

Непосредственно перед проведением учета результатов готовят 7,5 %-ный раствор реактива Грисса путем добавления 5 мл дистиллированной воды, подогретой до температуры 50 °С, к содержимому флакона №3. Приготовленный раствор можно использовать в течение 14 суток при условии хранения его при температуре 2-8 °С в темном месте.

5.4. Учет результатов

Через 8-10 суток инкубирования посевов в один из трех контрольных флаконов №1 добавляют 0,5 мл раствора реактива Грисса с помощью шприца объемом 5 мл. Учет результатов проводят визуально колориметрическим методом по появлению розового или фиолетового окрашивания в засеянных флаконах. Интенсивность окраски, которая может варьировать от «-» до «5+», регистрируют по цветовой шкале. В зависимости от интенсивности окраски в контрольном флаконе возможны 3 варианта учета результатов:

а) Если в контрольном флаконе №1 интенсивность розовой или фиолетовой окраски соответствует 3+ и более, то продолжают внесение раствора реактива Грисса во флакон №2, содержащий PZA, регистрируют интенсивность окраски и интерпретируют результат.

б) Если в контрольном флаконе интенсивность цветной реакции будет менее, чем 3+, этот флакон уничтожают, а все остальные флаконы тест-набора продолжают инкубировать до 12–14 суток. По истечении срока инкубации (12-14 суток) вносят реактив Грисса во второй контрольный флакон. Если во втором контрольном флаконе интенсивность розовой или фиолетовой окраски соответствует 3+ и более, то вносят раствор реактива Грисса во флакон №2, содержащий PZA, и регистрируют результат.

в) Если во втором контрольном флаконе интенсивность окраски будет слабо-розовой или слабо-фиолетовой (менее 3+), этот флакон уничтожают, а все остальные флаконы тест-набора продолжают инкубировать до 16–21 суток. По истечении срока инкубации (16-21 суток) вносят раствор реактива Грисса в оставшиеся флаконы №1 и №2 и проводят учет результатов.

Если в течение всего срока инкубации (18 суток) не произошло появления розовой или фиолетовой окраски ни в одном из контрольных флаконов, то данная культура подлежит повторному анализу.

Возможные причины отсутствия окраски в контрольных флаконах:

1. Концентрация микробной взвеси в посевной дозе менее 10^7 м.к./мл.
2. Исследуемые культуры не обладают нитратредуктазной активностью.

Не инкубируйте флаконы PZA - теста более 21 суток, т.к. возможно получение ложноположительных результатов.

5.3.3. Интерпретация результатов.

Культура МБТ считается **чувствительной** к пиразинамиду, если во флаконе №2 не появилась розовая или фиолетовая окраска (при интенсивности окраски в контрольном флаконе №1 не менее 3+).

Культура МБТ считается **устойчивой** к пиразинамиду, если во флаконе №2 с интенсивность розовой или фиолетовой окраски не менее 1+ (при интенсивности окраски 3+ и более в контрольном флаконе №1).

6. Контроль качества

Каждую серию PZA-теста рекомендуется проверять на эффективность, выполнив тестирование чувствительного штамма *M. tuberculosis H37Rv* или *M. tuberculosis H37Ra*. Ес-

ли PZA-тест не показал ожидаемого результата, не используйте оставшиеся тест-наборы данной серии до тех пор, пока не свяжетесь с представителем предприятия-изготовителя.

Предпочтительно использовать PZA-тест совместно с ТБ тест-набором для ускоренного определения чувствительности микобактерий туберкулеза к четырем препаратам первого ряда.

7. Хранение

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

8. Срок годности - 6 месяцев.

Среда с истекшим сроком годности использованию не подлежит!

По вопросам, касающимся качества «Набора питательных сред для ускоренного определения чувствительности микобактерий туберкулеза к пиразинамиду (PZA-тест)» в течение срока годности, следует обращаться в адрес предприятия-изготовителя: 142279 Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, ФГУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, тел./факс: (4967) 36-00-20, 36-01-16.