**Методологічне керівництво для тесту медикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні *туберкульозу***

**Всесвітня організація**

**охорони здоров'я**



**Методологічне керівництво для тесту медикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні *туберкульозу***

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Всесвітня організація охорони здоров'я** |

Методологічне керівництво для тесту медикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні *туберкульозу*WHO/CDS/TB/2018.24

**© Всесвітня організація охорони здоров'я 2018**

Деякі права захищені. Це керівництво доступно під ліцензією Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons>. org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo).

Згідно з умовами цієї ліцензії дозволяється копіювати, перерозподіляти та адаптувати роботу для некомерційних цілей за умови відповідного цитування цього керівництва, як зазначено нижче. Використання цього керівництва не позначає, що ВООЗ схвалює будь-яку конкретну організацію, продукцію чи послуги. Використання логотипу ВООЗ заборонено. При адаптації роботи необхідно ліцензувати свою роботу відповідно до тієї самої або аналогічної ліцензії Creative Commons. При перекладі цього керівництва, слід додати наступну відмову разом із запропонованим цитуванням: «Цей переклад не був створений Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ). ВООЗ не несе відповідальності за зміст або точність цього перекладу. Оригінальне англійське видання є обов'язковим і автентичним виданням».

Будь-яке посередництво, що стосується спорів, що виникають за ліцензією, проводиться відповідно до правил посередництва Всесвітньої організації інтелектуальної власності.

**Пропоноване цитування.** Методологічне керівництво для тесту медикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються для лікування туберкульозу Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2018 рік. Ліцензія: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

**Бібліографічний запис (БЗ).** БЗ доступний на веб-сайті <http://apps.who.int/iris>.

**Продажі, права та ліцензування.** Щоб придбати публікації ВООЗ, див. <http://apps.who.int/bookorders>. Щоб подати запити на комерційне використання та запити щодо прав та ліцензування, див. <http://www.who>. int/about/licensing.

**Сторонні матеріали.** Якщо ви хочете повторно використовувати матеріали з цієї роботи, які віднесені до третьої сторони, такі як таблиці, фігури чи зображення, ви несете відповідальність за визначення того, чи потрібен дозвіл для цього повторного використання та отримання дозволу від власника авторських прав. Ризик претензій внаслідок порушення будь-якого сторонніх компонентів у роботі покладається виключно на користувача.

**Загальні відмови від відповідальності.** Зазначені позначення та подання матеріалів у цій публікації не означають висловлення будь-якої думки з боку ВООЗ щодо правового статусу будь-якої країни, території, міста чи району чи їх органів влади, або щодо розмежування їх меж або кордонів. Пунктирні лінії на картах представляють приблизні межі, щодо яких, можливо, ще немає повної згоди.

Згадка про конкретні компанії чи продукцію певних виробників не означає, що вони затверджуються або рекомендуються ВООЗ, надаючи перевагу іншим виробникам аналогічного характеру, які не згадуються. Виключені помилки та упущення, назви фірмових товарів відрізняються початковими великими літерами.

ВООЗ вжила всіх розумних запобіжних заходів для перевірки інформації, що міститься в цій публікації. Однак опублікований матеріал поширюється без жодних явних чи неявних гарантій. Відповідальність за інтерпретацію та використання матеріалу покладається на читача. ВООЗ в жодному разі не несе відповідальності за збитки, що виникли внаслідок його використання.

Надруковано в ???

|  |
| --- |
| **Зміст** |

**Подяка** [**vi**](#bookmark0)

**Скорочення** [**vii**](#bookmark1)

**Глосарій термінів** [**ix**](#bookmark2)

**1. Вступ** [**1**](#bookmark3)

1. Передумови [1](#bookmark3)
2. Загальна інформація [2](#bookmark4)
3. Біобезпека [2](#bookmark4)
4. [Доказова база для визначення критичних концентрацій для ТМЧ 3](#bookmark5)
5. [Рекомендації для ТМЧ 4](#bookmark6)
6. [Протитуберкульозні препарати першої лінії 4](#bookmark6)
7. [Протитуберкульозні препарати другої лінії 6](#bookmark8)

[**2.**](#bookmark11) **[Тест медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів з](#bookmark11)**

**[посівом на тверде поживне середовище 11](#bookmark11)**

[2.1 Метод пропорції з використанням середовища Левенштайна-Йенсена 11](#bookmark11)

1. [Принципи 11](#bookmark11)
2. [Підготовка середовища 11](#bookmark11)
3. [Протитуберкульозні препарати та критичні концентрації для](#bookmark12)

[тестування 12](#bookmark12)

1. [Підготовка мікобактеріальної суспензії 14](#bookmark14)
2. [Розведення суспензії та інокуляція середовища Левенштайна-Йенсена 14](#bookmark14)
3. [Інкубація 14](#bookmark14)
4. [Огляд культур 15](#bookmark15)
5. [Інтерпретація та звітування про результати 15](#bookmark15)
6. [Контроль якості 16](#bookmark16)

[2.2 Спосіб пропорції з використанням агарового середовища Middlebrook](#bookmark16)

[7H10 або 7H11 16](#bookmark16)

1. [Принципи 16](#bookmark16)
2. [Підготовка середовища 16](#bookmark16)
3. [Протитуберкульозні препарати та концентрації для тестування 17](#bookmark17)
4. [Підготовка мікобактеріальної суспензії 20](#bookmark20)
5. [Розведення суспензії та інокуляція середовища 20](#bookmark20)
6. [Інкубація 21](#bookmark21)
7. [Огляд культур 21](#bookmark21)
8. [Інтерпретація та звітування про результати 21](#bookmark21)
9. [Контроль якості 22](#bookmark22)

[**3. Тест медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів з посівом на рідке поживне середовище 23**](#bookmark23)

1. [Принципи 23](#bookmark23)
2. [Підготовка середовища 23](#bookmark23)

[3.2.1 Середовище 23](#bookmark23)

1. [Протитуберкульозні препарати та критичні концентрації для тестування 24](#bookmark24)
2. [Приготування розчинів протитуберкульозних препаратів 25](#bookmark25)
3. [Використання ліофілізованих препаратів 25](#bookmark25)
4. [Використання чистих лікарських порошків 25](#bookmark25)
5. [Розрахунок коефіцієнта розведення для середовища МТІР 29](#bookmark28)
6. [Додавання протитуберкульозного препарату до середовища 29](#bookmark28)
7. [Підготовка мікобактеріальної інокуляції 29](#bookmark28)
8. [Використання інокуляту з трубки МТІР 29](#bookmark28)
9. [Використання інокуляту для росту в твердому середовищі 30](#bookmark29)
10. [Інокуляція та інкубація 31](#bookmark30)
11. [Додавання та інокуляція середовища МТІР 31](#bookmark30)

[3.8.Носії ТМЧ 31](#bookmark30)

[3.8.1 Введення носія ТМЧ в прилад МТІР 31](#bookmark30)

[3.9 Тривалість тестування 32](#bookmark31)

[3.10 Інтерпретація та звітування про результати 32](#bookmark31)

[3.10.1 Важливі міркування 32](#bookmark31)

[3.11 Контроль якості 33](#bookmark32)

[**4. Додатки 34**](#bookmark33)

[Додаток А. Зберігання вихідних культур 34](#bookmark33)

[Додаток B. Стандарти помутніння Макфарленда 34](#bookmark33)

[Додаток C. Тестування контролю якості 35](#bookmark34)

|  |
| --- |
| Список таблиць |

Таблиця 1. [Критичні концентрації (КК) для лікарських засобів першої лінії,](#bookmark5)

[рекомендованих для лікування лікарсько-чутливого туберкульозу. . 3](#bookmark5)

Таблиця 2. [Таблиця клінічної інтерпретації протитуберкульозних препаратів першої лінії 5](#bookmark7)

Таблиця 3. [Критичні концентрації (КК) та клінічна критична точка (ККТ) для лікарських засобів,](#bookmark9)

[рекомендованих для лікування туберкульозу, стійкий до рифампіцину туберкульоз (СРТБ), та ТБМЛ).](#bookmark9)

[(Проміжні КК виділені червоним кольором) 8](#bookmark9)

Таблиця 4. [Таблиця клінічної інтерпретації протитуберкульозних препаратів другої лінії 9](#bookmark10)

Таблиця 5. [Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища Левенштайна-
Йенсена 13](#bookmark13)

Таблиця 6. [Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища 7H10 18](#bookmark18)

Таблиця 7. [Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища 7H11 19](#bookmark19)

[Таблиця 8 Кількісне визначення та повідомлення про ріст бактерій на культуральних
планшетах 21](#bookmark21)

Таблиця 9. [Об'єм відновлення та кінцеві концентрації для протитуберкульозних препаратів першої лінії 24](#bookmark24)

Таблиця 10. [Об'єм відновлення та кінцеві концентрації для ліофілізу](#bookmark25)

[протитуберкульозних препаратів другої лінії, доступних із BD 25](#bookmark25)

Таблиця 11. [Наявність чистих порошків від GDF та інших виробників 26](#bookmark26)

Таблиця 12. [Концентрації та розчини, необхідні для підготовки протитуберкульозних](#bookmark27)

[препаратів другої лінії для використання із системою BACTEC МТІР 960 27](#bookmark27)

[**Подяка**](#bookmark1)

Розробкою цього документа керував Christopher Gilpin з внесками Alexei Korobitsyn, Lice Gonzales Angulo та Karin Weye(Глобальна програма протитуберкульозної системи ВООЗ) на основі проекту документа, підготовленого Salman Siddiqi (науковий співробітник BD, США).

[**Група зовнішнього огляду**](#bookmark1)

Daniela Cirillo (San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy); Soudeh Ehsani (WHO Regional Office For Europe, Copenhagen, Denmark); Ramona Groenheit ( Public Health Agency of Sweden, Stockholm, Sweden); Rumina Hasan (The Aga Khan University, Karachi, Pakistan); Sven Hoffner (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden); Nazir Ismail (National Institute of Communicable Diseases, Johannesburg, South Africa); Claudio Köser ( University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom); Florian Maurer (National та Supranational Reference Center for Mycobacteria Research Center Borstel, Germany); Leen Rigouts (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium); Thomas Shinnick (t, USA); Elisa Tagliani (San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy); Jim Werngren (Public Health Agency of Sweden, Stockholm, Sweden).

[**Подяка за фінансову підтримку**](#bookmark1)

Також виказуємо подяку за фінансування з боку Агентства США з міжнародного розвитку через Консолідований грант USAID-WHO № GHA-G-00-09-00003 / US2014-741.

|  |
| --- |
| [**Скорочення**](#bookmark1) |
| 7H10 | Середовище Middlebrook 7H10 |
| 7H11 | Середовище Middlebrook 7H11 |
| АМК | амікацин |
| БДК | бедаквілін |
| КАП | капреоміцин |
| ККТ | клінічна критична точка |
| КК | критична концентрація |
| КФЗ | клофазимін |
| ІКЛС | Інститут клінічних та лабораторних стандартів |
| D-ЦС | D-циклосерин |
| ДЛМ | деламанід |
| ДМСО | диметилсульфоксид |
| ЛСТБ | лікарсько-стійкий туберкульоз |
| ТМЧ | тест медикаментозної чутливості |
| ECOFF | Епідеміологічні точки відсікання |
| ФХ | фуорохінолон (наприклад, левофоксацин, моксифоксацин) |
| ГФК | гатифлоксацин |
| гНДТ | генотипно не дикого типу |
| ГТБ | Глобальна програма проти туберкульозу |
| гДТ | генотипно дикого типу |
| ВЕРХ | високоефективна рідинна хроматографія |
| КАН | канаміцин |
| ЛФК | левофлоксацин |
| АОЗ | аналіз олігонуклеотидними зондами |
| ЛЙ | середовище Левенштайна-Йенсена |
| ЛЗД | лінезолід |
| МЛС | із множинною лікарською стійкістю |
| МФК | моксифлоксацин |
| МТІР |  Мікобактеріальна трубка для індикатора росту BACTEC™  |
| МІК | мінімальна інгібуюча концентрація |
| КМТБ | Комплекс *М. tuberculosis* |
| ОАДК | Олеїнова кислота, альбумін, декстроза, каталаза |

|  |  |
| --- | --- |
| ОФК | офлоксацин |
| ФК/ФД | фармакокінетичний / фармакодинамічний |
| фНДТ | фенотипно не дикого типу |
| ПЗА | піразинамід |
| фДТ | фенотипно дикого типу |
| КЯ | контроль якості |
| С | стійкість / стійкий |
| СР | стійкий до рифампіцину |
| Ч | чутливий/ чутливість  |
| СІРЕ | стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин, етамбутол |
| ІДР (ЛЗ) | ін'єкційний другий ряд (лікарський засіб) (тобто, амікацин) |
| ТБ | тубекульоз  |
| ТРД | терізидон |
| ВООЗ | Всесвітня організація охорони здоров'я |
| ДТ | дикий тип |
| ШЛС | широка лікарська стійкість |

[**Глосарій термінів**](#bookmark2)

Тлумачна категорія тесту для визначення чутливості до антимікробних препаратів класифікація, заснована на реакції *in vitro* організму на антимікробний препарат Для мікобактерій для категорій результатів *in vitro* використовувались дві різні категорії, «критична концентрація» та «мінімальна інгібуюча концентрація». Для штамів комплексу *М. tuberculosis* при випробуванні на низьку концентрацію деяких препаратів застосовують категорію «критична концентрація». Для деяких препаратів може бути також рекомендовано тестування додаткової більш високої концентрації (концентрації клінічної критичної точки). Однак не існує «проміжної» інтерпретаційної категорії, навіть коли тестування проводиться як при критичній концентрації, так і при концентрації клінічної критичної точки.

**Критична концентрація** протитуберкульозного препарату була прийнята та модифікована відповідно до міжнародної конвенції. Критична концентрація визначається як найнижча концентрація протитуберкульозного препарату *in vitro*, що інгібуватиме зростання 99% (90% для піразинаміду) фенотипно дикого типу штамів комплексу *М. tuberculosis*

**Клінічна критична точка** - це концентрація або концентрації антимікробного препарату, яка визначає МІК вище критичної концентрації, яка відокремлює штами, які, ймовірно, реагують на лікування, від тих, які, ймовірно, не відповідатимуть на лікування. Ця концентрація визначається кореляцією з наявними даними клінічних результатів, розподілом МІК, генетичними маркерами та даними ФК/ФД, включаючи дозу препарату. Підвищення дози може бути використане для подолання стійкості, спостережуваної при меншому дозуванні, до досягнення максимальної стерпної дози, а отже, більш високої клінічної критичної точки, вище якої конкретний препарат не рекомендується використовувати. клінічна критична точка використовується для наведення окремих клінічних рішень при лікуванні пацієнта. Клінічна критична точка не застосовується для спостереження за стійкістю до лікарських засобів.

**Критична частка** - це частка стійких організмів у межах певного культивованого ізоляту, яка використовується для визначення стійкості до певного лікарського засобу. Критична частка 1% (10% для піразинаміду) використовується для диференціації чутливих та стійких штамів. Будь-яка культура, яка демонструє ріст менше 1% на середовищі, що містить критичну концентрацію досліджуваного препарату в порівнянні з ростом на контрольній без препарату, вважається сприйнятливою; культура, яка має 1% або більше зростання на середовищі, що містить критичну концентрацію препарату, вважається стійкою, і пацієнт, зразок якого тестують, може не відповісти на препарат. Критерії критичної концентрації та пропорції використовуються для тестування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії.

**Перехресна стійкість** - це стійкість до множинних протитуберкульозних препаратів, викликана однією генетичною зміною (або множинні зміни, якщо дані механізми стійкості потребують декількох генетичних змін), хоча на практиці такі мутації можуть бути невідомі.

**Епідеміологічні точки відсікання (ECOFF), штами фенотипно дикого типу (фД) та недикого типу (фНДТ)**

* Як правило, коли МІК, які тестуються за допомогою стандартизованого методу, агрегуються для одного виду, утворюється єдиний розподіл МІК у формі Гаусса, що відповідає розподілу **фДТ** для цього виду (тобто розподілу для організмів, у яких відсутні механізми стійкості до фенотипного виявлення). Додаткові розподіли з більш високими загальними МІК іноді визначають, навіть перед клінічним застосуванням конкретного препарату, про який йдеться (або до клінічного використання іншого, спорідненого лікарського засобу, який має той самий механізм стійкості), які відповідають властивим або природним чином стійким організмам. У цьому випадку розподіл з найнижчими МІК відповідає розподілу **фДТ**, а інші розподіли відповідають одному або більше розподілам **фНДТ**.
* ЕМ відповідає верхньому кінці розподілу **фДТ** (тобто він зазвичай включає 99% штамів **фДТ**).
* Виключаючи сценарій, коли важко відрізнити фДТ та фНДТ штами через • методологічну різницю в тестуванні МІК (тобто там, де обидва розподіли перекриваються), фДТ штами, за визначенням, є генотипно ДТ (гДТ). Однак це не означає, що штами гДТ є ідентичними генотипно, оскільки вони можуть переносити мутації в генах, пов'язаних зі стійкістю, які не змінюють МІК (наприклад, мутація gyrA S95T не впливає на МІК фуорохінолонів).
* І навпаки, організми із МІК вище ЕМ є за визначенням являються фНДТ. Знову ж таки, виключаючи можливість методологічних варіацій тестування, близьких до ЕМ, повинна бути генетична основа для цього фенотипу (тобто штами повинні бути генотипно НДТ (гНДТ)). Однак на практиці ці штами гНДТ можуть здаватися гДТ, якщо:

- Ген, що відповідає фенотипу, не досліджувався.

- Ген досліджували, але генетичну зміну, що надає фенотип, виявлено не було, оскільки це відбувалося на частоті нижче рівня виявлення молекулярного тесту (тобто гетеростійкості).

- Генетична зміна була виявлена, але не могла бути інтерпретована через неповне розуміння взаємозв'язку генотип-фенотип.

**Непрямий тест для визначення чутливості** - процедура, заснована на інокуляції лікарським засобом із використанням організмів, вирощених у культурі.

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) - найнижча концентрація антимікробного препарату, що перешкоджає зростанню мікроорганізму понад 99% у тесті на чутливість твердого середовища чи відвару.

**Активність** - всі антимікробні препарати аналізуються на стандартні одиниці активності. Одиниці аналізу можуть сильно відрізнятися від фактичної ваги порошку і часто можуть відрізнятися між партіями виробництва лікарських препаратів. Таким чином, лабораторія повинна стандартизувати свої антимікробні розчини на основі аналізів партій антимікробних порошків, які використовуються.

Значення активності, надане виробником, повинно включати:

* Заходи щодо чистоти (зазвичай методом високоефективної рідинної хроматографії)
* Вміст води (наприклад, за допомогою аналізу Карла Фішера або втрати ваги при висушуванні)
* Сольова / протиіонна фракція (якщо сполука постачається у вигляді солі замість вільної кислоти чи основи)

Активність може бути виражена у відсотках або в одиницях мікрограмів на міліграм (мас / мас).

**Метод пропорції:** Метод пропорції був спочатку запропонований Canetti та ін., а згодом був модифікований; це найпоширеніший метод, який застосовується для тестування на чутливість до складних ізолятів *М. tuberculosis*. У цьому способі використовуваний інокулят контролюють шляхом випробування двох розведень суспензії культури, а зростання (тобто кількість колоній) на контрольному середовищі без протитуберкульозного препарату порівнюють із зростанням (кількість колоній ) присутній на середовищі, що містить критичну концентрацію тестуваного протитуберкульозного препарату; розраховується відношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат до кількості колоній на середовищі без протитуберкульозного препарату, а частка виражається у відсотках. Для більшості протитуберкульозних препаратів 1% критична частка диференціює частку стійких організмів у конкретному штамі, який використовується для визначення клінічно значущої стійкості до конкретного препарату.

|  |
| --- |
| **1.** [**Вступ**](#bookmark3) |
| **1.1** [**Передумови**](#bookmark3)Туберкульоз спричиняє 10 мільйонів випадків захворювання та 1,3 мільйони випадків смерті щорічно, і, за оцінками, 3,6 мільйона випадків або не виявляються, або не повідомляються державним службам охорони здоров’я щорічно.1 Закінчення глобальної епідемії туберкульозу буде досягнутим лише протягом наступних 20 років за умови інтенсивних дій усіх країн, які схвалили Стратегію боротьби проти туберкульозу та її амбітні цілі. Крім того, потрібна зміна парадигми від цілеспрямованих дій, які поступово знижують захворюваність на туберкульоз до посилених, багатоспектральних дій, які, як було показано, швидкими темпами зменшують епідемію.ТБ із множинною лікарською стійкістю (ТБМЛ) є головною глобальною проблемою охорони здоров'я, яка загрожує прогресу, досягнутому в лікуванні та профілактиці туберкульозу в останні десятиліття. Стійкість до лікарських засобів в комплексі *Mycobacterium tuberculosis* (КМТБ) обумовлена ​​геномними мутантами, що зустрічаються в природі. Існує два механізми, які сприяють розвитку лікарсько-стійкого туберкульозу (ЛСТБ). По-перше, придбаний ЛСТБ виникає, коли лікування туберкульозу є неоптимальним через неадекватну політику та збої в системах охорони здоров’я та надання медичної допомоги, низьку якість лікарських засобів проти туберкульозу, погану практику призначення рецептів, недотримання правил пацієнта або поєднання вищезазначеного. По-друге, первинний ЛСТБ є результатом прямої передачі ЛСТБ від однієї людини до іншої. В усьому світі приблизно за 3,6% нових та 17,0% випадків, які раніше лікували туберкульоз, у 2017 році мали ТБМЛ або стійкий до рифампіцину туберкульоз (СРТБ).2 Кожного року ТБМЛ або СРТБ становлять близько 580 000 нових випадків захворювання і 230 000 смертей у всьому світі.Стратегія боротьби з туберкульозом передбачає ранню діагностику та оперативне лікування всіх людей будь-якого віку з будь-якою формою туберкульозу. Це вимагає забезпечення доступу до рекомендованої ВООЗ швидкої діагностики та універсального доступу до тестування на чутливість до лікарських засобів (ТМЧ) для всіх осіб, які мають ознаки та симптоми туберкульозу, і більше не надавати пріоритет лише особам, з |  | більшим ризиком розвитку туберкульозу та / або ВІЛ-асоційованого туберкульозу. ВООЗ визначає універсальний доступ до ТМЧ як швидкий ТМЧ принаймні для рифампіцину та подальший ТМЧ для принаймні фурохінолонів серед усіх хворих на туберкульоз із стійкістю до рифампіцину2.Ефективне лікування туберкульозу та ТБМЛ покладається на швидку діагностику та ефективне лікування стійких інфекцій. Культурно-фенотипічні методи ТМЧ в даний час є золотим стандартом для виявлення стійкості до лікарських засобів, але ці методи трудомісткі, вимагають складної лабораторної інфраструктури, кваліфікованого персоналу та суворого контролю якості.Традиційно ТМЧ для КМТБ спирається на тестування єдиної критичної концентрації (КК), яка використовується для диференціювання стійких ізолятів від чутливих ізолятів КМТБ і є специфічною для кожного протитуберкульозного препарату та методу випробувань. Лабораторні тести на чутливість туберкульозних бацил до протитуберкульозних препаратів виконують три основні цілі; по-перше, вони можуть бути використані для керівництва вибором хіміотерапії, яку слід надати пацієнту; по-друге, вони мають цінність у підтвердженні того, що стійкість до лікарських засобів виникла тоді, коли пацієнт не виявив задовільної реакції на лікування; по-третє, може використовуватися для спостереження за появою стійкості до лікарських засобів.Для виконання фенотипного ТМЧ мікобактерії часто спочатку вирощують у різних твердих або рідких культуральних середовищах. Найчастіше використовуються середовища - Левенштайн-Йенсен (ЛЙ), агар Middlebrook 7H10 (7H10), агар з збагаченим середовищем Middlebrook 7H11 (7H11) та бульйон Middlebrook 7H9. Останній використовується як середовище для мікобактеріальної трубки для індикатора росту (МТІР) для автоматизованої культури М. tuberculosis (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, США). Зростання бактерій на тверде поживне середовище можна ідентифікувати візуально (тобто шляхом визначення характерного росту) або в рідкому середовищі МТІР шляхом автоматизованого виявлення флуоресценції, що вказує на зниження напруги кисню за рахунок |
| [1 Global tuberculosis report 2018. Женева: World Health Organization; 2018 (WHO/CD](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1)S/TB/2018.20; <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>, доступ 20 вересня 2018 року).2 Кінцева стратегія проти туберкульозу: глобальна стратегія після 2015 року. Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2014 рік (<http://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf>, доступ 1 червня 2017 року). |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| бактеріального росту. Всі позитивні культури повинні бути протестовані для підтвердження виявлення КМТБ та для виключення наявності будь-яких нетуберкульозних мікобактерій або інших бактерій до проведення ТМЧ.Метод непрямої пропорції з посівом на тверде поживне середовище є найпоширенішим методом тестування чутливості до ізолятів M. tuberculosis.3. У цьому методі визначений інокулят використовується для інокуляції лікарського середовища, що містить лікарський засіб, та двох серійних розведень у 10 разів (розведення 10–2) інокуляту застосовують для інокуляції безлікарського контрольного середовища. Зростання (тобто кількість колоній, виправлене на коефіцієнт розведення) на контрольній середовищі без протитуберкульозного препарату порівнюється із зростанням присутності препарату в середовищі, що містить критичну концентрацію випробуваного протитуберкульозного препарату.3 Стійкість визначається коли при критичній концентрації препарату в культуральному середовищі спостерігається щонайменше 1% приросту.Інші методи, такі як методи співвідношення абсолютної концентрації та стійкості, потребують додаткового контролю та використання стандартизованого інокуляту.3 Оскільки ці методи не були адекватно підтверджені для всіх протитуберкульозних препаратів, їх наразі не рекомендується застосовувати. Комерційні системи рідких культур для ТМЧ скорочують час до отримання лише 10 днів, порівняно з 28–42 днями, необхідними для ТМЧ, з посівом на тверде поживне середовище. Оскільки системи рідкої культури більш швидкі і можуть скоротити час на виявлення стійкості, вони можуть покращити процес лікування пацієнтів. ЛЧТБ з використанням системи BACTEC МТІР є кращим методом виконання ТМЧ для багатьох протитуберкульозних препаратів, враховуючи стандартизацію середовищ та інструменту МТІР.**1.2** [**Загальна інформація**](#bookmark4) Це методологічне керівництво зосереджується на доступних методах ТМЧ як для протитуберкульозних препаратів першої, так і другої лінії. Фенотипні методи ТМЧ, засновані на культурі, є надійними та відтворюваними, але ці методи |  | є трудомісткими, потребують складної лабораторної інфраструктури, кваліфікованого персоналу та суворого контролю якості. У цей документ включені лише непрямі процедури ТМЧ щодо протитуберкульозних лікарських засобів. Описані методи - ЛЙ, 7H10 та 7H11 агар та МТІР.ВООЗ рекомендує використовувати швидкі молекулярні тести на ТМЧ як початкові тести для виявлення стійкості до лікарських засобів до початку відповідної терапії для всіх хворих на туберкульоз, включаючи нових пацієнтів та пацієнтів, які потребують повторного лікування. Якщо виявлена ​​стійкість до рифампіцину, слід негайно проводити молекулярні тести на стійкість до ізоніазиду, фторхінолонів та амікацину, щоб повідомити, які лікарські засоби другої лінії слід використовувати для лікування СРТБ та ТБМЛ. Генотипні методи ТМЧ, такі як послідовність наступного покоління, є привабливими альтернативами методів ТМЧ, заснованих на культурі, враховуючи швидкість виконання молекулярних методів та детальну інформацію про послідовності, яка може бути сформована для декількох областей генів, пов'язаних із стійкістю до лікарських засобів. Однак, поки наші знання про молекулярну основу стійкості не поліпшаться, потрібно буде проводити ТМЧ на основі культури для важливих другої лінії, включаючи бедахілін, лінезолід та препарати. Розглянемо можливість проведення ТМЧ на основі культури для фуорохінолонів (ФХ) та амікацину (АМК), коли підозрюють стійкість, незважаючи на відсутність раніше виявлених генетичних мутацій, пов’язаних із стійкістю. Комерційно доступні швидкі генетичні методи, такі як лінійний зонд другої лінії, виявляють приблизно 85% ізолятів, стійких до ФХ або АМК.4**1.3** [**Біобезпека**](#bookmark4)Діяльність, пов’язана з розповсюдженням та маніпулюванням культурою бактерій *M. tuberculosis*, особливо тих, які підозрюються або є мультирезистентними (МР) або мають широку лікарську стійкість (ШЛС), повинна проводитися у відповідній лабораторії з системою протитуберкульозного захисту або перевищувати мінімум |
|  |
|  |
| 3 Canetti, G. та ін. Мікобактерії: лабораторні методи тестування чутливості та стійкості до лікарських засобів. *Bull World Health Organ* 29, 565-78 (1963).4 Використання аналізу олігонуклеотидними зондами для виявлення стійкості до ізоніазиду та рифампіцину: оновлення політики[. Geneva: 2016 update. Geneva: World Health Organization; 2016. (WHO/H](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250586/1/9789241511261-eng.pdf?ua=1)TM/TB/2016.12; <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250586/1/9789241511261-eng.pdf?ua=1>, доступ 10 жовтня 2018 року). |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| вимог до лабораторії високого ризику. Більш детальну інформацію щодо встановлення та належної реалізації системи управління біологічними ризиками можна знайти в Рекомендаціях з біобезпеки щодо лабораторії ВООЗ 2012 року.5**1.4 Доказова база для визначення критичних концентрацій для ТМЧ** У 2018 році Глобальна програма проти туберкульозу ВООЗ доручила FIND провести систематичний огляд наявних даних про мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) для фенотипно дикого типу (фДТ), а також фенотипно не дикого типу (фНДТ), включаючи супутні дані секвенування для відповідних стійких ген для критичних протитуберкульозних препаратів першої лінії, рифампіцину та ізоніазиду. У таблиці 1 представлені  |  | критичні концентрації та клінічні критичні точки для лікарських засобів першої лінії, рекомендованих для лікування туберкульозу, чутливого до лікарських засобів. У таблиці 2 наведено інформацію про клінічні інтерпретації.Цей огляд доповнює систематичний огляд наявних даних про МІК та пов’язані з ними дані секвенування відповідних стійких генів для лікарських засобів другої лінії, проведений FIND у 2017 році. Лікарські препарати, що входять до складу останньогоогляду були ін'єкційні препарати другої лінії(канаміцин, амікацин і капреоміцин),клофазимін та бедахілін, циклосерині теризидон, лінезолід, деламанід тафторхінолони (офлоксацин, левофлоксацин,гатифлоксацин і моксифлоксацин) Були розглянуті наступні середовища: Левенштайн-Йенсен,Middlebrook 7H10/7H11 та BACTEC™Мікобактеріальна трубка для індикатора росту (МТІР). 6 |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 1. критичні концентрації (КК) для лікарських засобів першої лінії, рекомендованих для лікування туберкульозу, чутливого до лікарських засобів.*** |
| **Лікарський препарат** | **Скорочення** | **Критичні концентрації (мкг / мл) для ТМЧ залежно від середовища** |
| Левенштайн-Йенсенa | Middlebrook 7H10a | Middlebrook 7H1 la | BACTEC МТІРрідка культураa |
| Рифампіцин | РІФ | 40,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0b |
| Ізоніазид c | ІНД | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| Етамбутолd | ЕТБ | 2,0 | 5,0 | *7,5* | 5,0 |
| Піразинамід6 | ПЗА | - | - | - | 100 |

a Рекомендується використовувати метод непрямої пропорції. Інші методи з посівом на тверде поживне середовище (такі як коефіцієнт стійкості або абсолютна концентрація), не були адекватно підтверджені для протитуберкульозних препаратів.

b Виявлення стійкості до рифампіцину за допомогою системи BACTEC МТІР 960 має обмеження і не може виявити клінічно значущу стійкість у певних ізолятах. Виявлення стійкості, що надає мутації у всьому гені *rpoB* за допомогою секвенування ДНК, може бути найбільш надійним методом виявлення стійкості до рифампіцину.

c Пацієнти з ізолятами КМТБ, стійкі до критичної концентрації, можуть ефективно лікуватися ізоніазидом з високою дозою. Раніше більш високу концентрацію ІНД (0,4 мкг / мл у МТІР) використовували для ідентифікації штамів, які можуть бути ефективно оброблені більш високою дозою препарату. Однак молекулярні структури стійкості до ІНД можуть бути більш надійними для прогнозування результатів пацієнта, ніж фенотипний ТМЧ.7. На сьогоднішній день не встановлено жодної клінічної критичної точки концентрації для ІНД.

d Усі фенотипні методи ТМЧ етамбутолу дають непослідовні результати. ТМЧ не рекомендується.

e Метод рідкої культури BACTEC ТМІР 960 є єдиним рекомендованим ВООЗ методом тестування на чутливість до ПЗА, хоча, як повідомляється, навіть таке тестування пов'язане з високим рівнем результатів хибнопозитивної стійкості. Ретельна підготовка до інокуляції важлива для надійного проведення тестування на ПЗА. Виявлення стійкості, що надає мутації в гені *pncA*, за допомогою секвенування ДНК, може бути найнадійнішим методом виявлення стійкості до піразинаміду, хоча є нові свідчення про мутаційну стійкість не-*pncA* до ПЗА.8

5 Рекомендації з біобезпеки щодо лікування туберкульозу. Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2012 року (WHO/HTM/TB/2012.11;

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638\_eng.pdf, доступ 10 жовтня 2018 року).

6 Технічний звіт про критичні концентрації для тесту медикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні туберкульозу,

стійкого до лікарських засобів. Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2018 року (WHO/CDS/TB/2018.5)

(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf доступ 10 жовтня 2018 року).

7 Рекомендації ВООЗ щодо лікування туберкульозу, стійкого до ізоніазидів: Доповнення до лікування ВООЗ

Рекомендації щодо лікарсько-стійкого туберкульозу. Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2018 рік.

http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO\_guidelines\_isoniazid\_resistant\_TB/en/

8 Werngren J, Alm E, Mansjö *Mycobacterium* *tuberculosis*, не-pncA-мутований ген,

але стійкий до піразинаміду: Чому так? Land GA Ред. *Журнал клінічної мікробіології.* 2017;55(6):1920-1927. doi:10.1128/JCM.02532-16.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Два ін'єкційних препарату (канаміцин та капреоміцин) більше не рекомендують для лікування ЛСТБ Щодо класу флурохінолонів на даний момент для лікування ЛСТБ та агенту ТМЧ рекомендовано використовувати лише лікарські засоби більш пізнього покоління (левофлоксацин та моксифлоксацин). Спеціальні засоби, що застосовуються в схемі лікування, повинні бути протестовані9 (тобто тестувати моксифоксацин, якщо використовується моксифоксацин). В таблиці 3 представлені критичні концентрації та клінічні критичні точки для лікарських засобів другої лінії, рекомендованих для лікування СРТБ та ТБМЛ.**1.5 Рекомендації щодо ТМЧ** ***1.5.1 Протитуберкульозні препарати першої лінії***Стратегія боротьби з туберкульозом передбачає ранню діагностику та оперативне лікування людей будь-якого віку з будь-якою формою туберкульозу. Це вимагає забезпечення доступу до рекомендованої ВООЗ швидкої діагностики та універсального доступу до ТМЧ для всіх пацієнтів із ознаками та симптомами ТБ.10. ВООЗ визначає універсальний доступ до ТМЧ як швидкий ТМЧ принаймні для рифампіцину серед усіх пацієнтів із бактеріологічно підтвердженим туберкульозом та подальшим ТМЧ щонайменше для фторхінолонів серед усіх хворих на туберкульоз із стійкістю до рифампіцину.11Пацієнти з передбачуваним туберкульозом, чутливим до лікарських засобів, та туберкульозом, який раніше не лікувався протитуберкульозними препаратами та не мають інших факторів ризику стійкості до лікарських засобів, повинні приймати рекомендовані ВООЗ схеми лікування першої лінії, використовуючи якісні протитуберкульозні препарати. Стандартний 6-місячний режим для лікування лікарсько-чутливого туберкульозу (2 місяці ізоніазиду, рифампіцину, піразінаміду та етамбутолу, а потім 4 місяці ізоніазиду та рифампіцину, позначені як 2HRZE / 4HR) є рекомендованим режимом.12Ізоніазид - один з найважливіших лікарських засобів першої лінії для лікування активної туберкульозної та  |  | латентної туберкульозної інфекції, що володіє високою бактерицидною активністю та хорошим профілем безпеки. Виникнення стійких до ізоніазиду туберкульозних штамів загрожує зниженням ефективності лікування туберкульозу першої лінії. За оцінками, близько 8% хворих на туберкульоз у всьому світі мають туберкульоз, чутливий додорифампіцину та стійкий до ізоніазидів (Сі-ТБ). В усьому світі Сі-ТБ є більш поширеним, ніж ТБМЛ. ВООЗ рекомендує пацієнтам із підтвердженим Сі-ТБ лікування рифампіцином, етамбутолом, піразинамідом та левофлоксацином [(H) REZ-Lfx] тривалістю 6 місяців.11Усі країни повинні докласти зусиль, щоб перейти до загального тестування ізоніазиду та рифампіцину на початку лікування туберкульозу та забезпечити ретельний відбір пацієнтів, які мають право на рекомендовану схему лікування Сі-ТБ [(H) REZ-Lfx]. 10,11 Мінімальна діагностична здатність для належного виконання рекомендацій щодо лікування туберкульозу потребує швидкого молекулярного тестування на рифампіцин до початку лікування режимом Сі-TB. Крім того, стійкість до фторхінолону якнайшвидше повинна бути виключена як фенотипним, так і генотипним ТМЧ. Швидкі молекулярні тести, такі як Xpert MTB/RIF (стійкість до рифампіцину) та аналіз олігонуклеотидними зондами (стійкість до ізоніазиду та рифампіцину з FL-АОЗ та стійкість до фторхінолону зі SL-АОЗ), бажано орієнтувати на вибір пацієнта для режиму (H) REZ-Lfx .Дані *in vitro*, схоже, свідчать про те, що при виявленні специфічних мутацій промотору *inhA* (і за відсутності будь-яких мутацій, пов'язаних зі стійкістю до *katG*) збільшення дози ізоніазиду може бути ефективним; таким чином, можна розглядати додатковий ізоніазид до максимальної дози до 15 мг / кг на добу. У разі мутацій *katG*, які частіше надають стійкість більш високого рівня, використання ізоніазиду навіть у більш високій дозі є меншою ймовірністю |

1. Швидке спілкування: Основні зміни в лікуванні туберкульозу із множинною лікарською стійкістю та стійкого до рифампіцину туберкульозу (ТБМЛ/ СРТБ), Женева: [World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/TB/2018.18)](http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_RapidCommunicationMDRTB.pdf?ua=1) (<http://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_RapidCommunicationMDRTB.pdf?ua=1> доступ 17 серпня 2018 року)
2. Звіт про засідання ВООЗ з питань технічної консультації експертів: аналіз неповноцінності Xpert MTB/RIF Ultra порівняно з Xpert MTB/RIF. [Женева: World Health Organization; 2017 (WHO/HTM/](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254792/1/WHO-HTM-TB-2017.04-eng.pdf)TB/2017.04; <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254792/1/WHO-HTM-TB-2017.04-eng.pdf>, доступ 1 травня 2018 року).

11 Звіт 16-го засідання Стратегічної та технічної консультативної групи з питань лікування туберкульозу. [Женева: World Health Organization; 2016 (WHO/HTM/TB/2016.10; http://www.who.int/tb/advisory\_bodies/stag\_tb\_report\_2016.pdf?ua=1](http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2016.pdf?ua=1), доступ1 червня 2017 року).

12 Рекомендації щодо лікування лікарсько-чутливого туберкульозу та догляду за пацієнтами: оновлення 2017 року. Женева: World [Health Organization; 2017 (WHO/HTM/TB/2017.05;](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255052/1/9789241550000-eng.pdf?ua=1,) <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255052/1/9789241550000-eng.pdf?ua=1>, доступ 1 травня 2018 року).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 13 Наявність комбінованих мутацій у промоторі *inhA* та / або гені *katG* призводить до високого підвищення рівня МІК, тому ізоніазид не слід застосовувати. Таблиця |  | 2 представляє огляд фенотипних та генотипних методів проведення ТМЧ щодо протитуберкульозних препаратів першої лінії та дає клінічну інтерпретацію результатів. |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 2. Таблиця клінічної інтерпретації протитуберкульозних препаратів першої лінії*** |
| **Лікарський препарат** | **Початковий діагностичний тест** | **Фенотипний ТМЧ** | **Запропоновані****Посилання****Методи** | **Коментар** |
| Рифампіцин | Xpert MTB/RIF Ultra | МТІР може не бути надійним для певних ізолятів | ДНКсеквенування всього гена *rpoB* | Будь-яка мутація (за винятком безшумних мутацій), що спостерігається в області гарячої точки 81bp RRDRa гена *rpoB*, відома або вважається пов'язаною зі стійкостю до рифампіцину. У кількох випадках мутації в гені *rpoB* за межами області RRDR асоціюються зі стійкостю до рифампіцину. Пацієнти потребують лікування ТБМЛ. |
| Ізоніазид | FL-АОЗ - єдиний рекомендований ВООЗ швидкий тест на виявлення мутацій в генах *inhA* та *katG*. FL-АОЗ має чутливість 85% для виявлення стійкості до ізоніазиду щодо МТІР ТМЧ. Специфіка висока. В ідеалі - виконується для всіх бактеріологічно підтверджених випадків туберкульозу. | Надійний та відтворюваний під час тестування КК у всіх середовищах. | МТІР | Якщо виявлені специфічні мутації промотору *inhA* (і за відсутності мутацій *katG*), збільшення дози ізоніазиду, ймовірно, буде ефективним; таким чином, додатковий ізоніазид до максимальної дози до 15 мг / кг на добу можна вважати Xpert MTB / RIF, а аналіз олігонуклеотидними зондами ( (АОЗ) вважають за краще орієнтувати вибір пацієнта для режима (H) RZE-Lfx . Стійкість до рифампіцину слід виключити до розглядання режима Сі-ТБ, а стійкість до ФХ слід виключити якнайшвидше |
| Етамбутол | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | Фенотипний ТМЧ не є надійним і відтворюваним, і його не рекомендується. | Не застосовується | Генотипний ЧЛЗ (секвенування), можливо, більш надійний, ніж фенотипний ТМЧ. Потрібно більше доказів |
| Піразинамід | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | Метод ТМЧ, стандартизований в МТІР. Помилково стійкі результати можуть виникнути, якщо інокуляція ТМЧ неправильно підготовлена | ДНКсеквенування *pncA*ген b | У лабораторії із забезпеченням якості сприйнятливий результат ТМЧ для ПЗА може бути використаний для керівництва включенням ПЗА в режим лікування ЛСТБ.Якщо виявлена стійкість до ПЗА, не включайте ПЗА, якщо виявлена ​​стійкість, або при використанні, ПЗА не вважається ефективним лікарським препаратом |

Мутації, що надають стійкість до рифампіцину, розташовуються, головним чином, у кодонових положеннях 426 - 452 в області, що визначає стійкість до рифампіцину 81-bp (ОВСР) гена b полімерази РНК *Mycobacterium tuberculosis* (r*poB*) Виявлення мутацій, що надають стійкість, в гені *pncA* з використанням секвенування ДНК є найбільш надійним методом виявлення стійкості до піразінаміду, хоча з'являються свідчення про мутаційну стійкість не-*pncA* до ПЗА.14

1. [Рекомендації ВООЗ щодо лікування туберкульозу, стійкого до ізоніазидів: Доповнення до рекомендацій ВООЗ щодо лікування туберкульозу, стійкого до лікарських засобів. Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я;](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255052/1/9789241550000-eng.pdf?ua=1); 2018 року (WHO/CDS/TB/2018.7) am/10665/255052/1/9789241550000-eng.pdf?ua=1, доступ 1 травня 2018 року).
2. Werngren J, Alm E, Mansjö *Mycobacterium* *tuberculosis*, не-pncA-мутований ген,Чому так? Land GA Ред. *Журнал клінічної мікробіології.* 2017;55(6):1920-1927. doi:10.1128/JCM.02532-16.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***1.5.2 Протитуберкульозні препарати першої лінії***Лікування ТБМЛ стає все більш індивідуалізованим внаслідок інновацій у діагностиці та зростаючому науковому розумінні молекулярної основи стійкості до лікарських засобів, фармакокінетики та фармакодинаміки лікарських засобів проти туберкульозу.15 Згідно з поточною оцінкою наукових доказів, зрозуміло три сигнали:• Доцільність ефективних та повністю оральних режимів лікування для більшості пацієнтів;• Необхідність забезпечити виключення стійкості до лікарських засобів (принаймні, до фторхінолонів та амікацину) перед початком лікування пацієнтів, особливо для більш короткого режиму ТБМЛ;• Необхідність ретельного контролю за безпекою пацієнтів, реакцією на лікування та низький поріг переключення режимів для пацієнтів, які не реагують на лікування, або пацієнтів з непереносимістю лікарських засобівУ 2018 році критичні концентрації були переглянуті або встановлені для застосування ТМЧ для лікарських засобів групи А, які настійно рекомендується використовувати при лікуванні ЛСТБ. До них відносяться ФХ пізнішого покоління (левофоксацин і моксифлоксацин), бедахілін та лінезолід. Критична концентрація для перорального препарату клофазиміну була встановлена ​​лише для середовища МТІР. Критичні концентрації для препаратів групи C (додатково) були встановлені або затверджені для деламаніду, амікацину та піразинаміду.Тестування офтоксацину не рекомендується, оскільки цей препарат більше не застосовується для лікування ЛСТБ, і лабораторії повинні перейти до тестування специфічних ФХ пізнішого покоління, які використовуються в режимах лікування. |  | В Таблиці 3 представлені критичні концентрації протитуберкульозних препаратів, що застосовуються для лікування стійкого до рифампіцину туберкульозу та ТБМЛ. Для деяких препаратів надійність та відтворюваність тестування є невизначеними, тому тестування цих препаратів не рекомендується.Знання про чутливість до ПЗА може інформувати рішення щодо вибору та створення ефективних режимів лікування ЛСТБ. Фенотипний ТМЧ на основі культури ПЗА важко виконати і може дати недостовірні результати.16,17 В даний час метод рідкої культури BACTEC МТІР 960 є єдиним методом, рекомендованим ВООЗ для тесту медикаментозної чутливості до ПЗА, хоча високий показник хибнопозитивної стійкості повідомлялося в деяких лабораторіях. У лабораторії, що гарантує якість, ТМЧ до ПЗА у МТІР може бути виконано надійно та відтворювано18. Відсутність молекулярного тесту, рекомендованого ВООЗ, для діагностики стійкості до ПЗА перед початком лікування означає, що навіть там, де доступний ТМЧ до ПЗА, результати зазвичай стають доступними лише після початку лікування. Виявлення стійкості, що надає мутації в гені *pncA* за допомогою секвенування ДНК, є найнадійнішим методом виявлення стійкості до піразинаміду, хоча є нові свідчення про мутаційну стійкість не-*pncA* до ПЗА.19У кількох дослідженнях тіоаміди (протіонамід та етионамід) були випробувані в твердих середовищах та рідких середовищах. Важко точно визначити стійкість до тіоаміду, оскільки зміна МІК, пов’язана зі стійкістю, невелика, а препарати термолабільні. Отже, розподіли ймовірно чутливих та ймовірно стійких штамів недостатньо відокремлені, що призводить до |

15 Швидке спілкування: Основні зміни в лікуванні туберкульозу із множинною лікарською стійкістю та стійкого до рифампіцину туберкульозу (ТБМЛ/ СРТБ). Женева: Всесвітня організація охорони здоров'я; 2018 року (WHO/CDS/TB/2018.18)

1. Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. Потенціал помилкових результатів, що вказують на стійкість при використанні системи Bactec МТІР 960 для тесту медикаментозної чутливості *Mycobacterium tuberculosis* до піразінаміду. Журнал клінічної мікробіології **2010**; 48 (1): 300-1.
2. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Умови, які можуть покращити результати тесту медикаментозної чутливості Mycobacterium tuberculosis до піразінаміду. Журнал клінічної мікробіології **2002**; 51 (1): 42-9.
3. Hofner S, Angeby K, Sturegard E, та ін. Тест медикаментозної чутливості на Mycobacterium tuberculosis до піразинаміду: шведський досвід. Міжнародний журнал про туберкульоз та захворювання легенів: офіційний журнал Міжнародного союзу проти туберкульозу та хвороб легень **2013**; 17 (11): 1486-90.
4. Werngren J, Alm E, Mansjö *Mycobacterium* *tuberculosis*, не-pncA-мутований ген, Чому так? Land GA Ред. *Журнал клінічної мікробіології.* 2017;55(6):1920-1927. doi:10.1128/JCM.02532-16.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| невідповідності між прогнозованим клінічним результатом та моделями чутливості *in vitro*.20 Стійкість, що надає мутації в промоторній області гена *inhA*, які, як правило, асоціюються з низькорівневою стійкістю до ізоніазиду, також надають перехресну стійкість класу тіоамідів, що може бути більше надійним методом виявлення стійкості до цих препаратів, ніж виконання фенотипічного ТМЧ.21,22 Мутації в межах структурних генів *etA* та *inhA* також були пов'язані з відносно високим рівнем стійкості до етионаміду. 18Відтворюваність ТМЧ для циклосерину є поганою як для твердих середовищ, так і для рідких середовищ, і його не рекомендується піддавати тестуванню.23 Рутинний ТМЧ не рекомендується застосовувати для інших протитуберкульозних лікарських засобів групи 3 (р-аміносаліцилова кислота, іміпенем-циластатин, меропенем) оскільки відсутні надійні та відтворювані методи ТМЧ.В ідеалі ТМЧ слід проводити під час початку лікування разом з лікарськими засобами, для яких існує надійний метод. Якщо базовий показник ТМЧ неможливий, ТМЧ слід проводити на першій позитивній культурі, виділеній від пацієнта під час моніторингу лікування. Позитивні культури, виділені |  |  від пацієнтів під час моніторингу лікування, слід зберігати замороженими. Якщо є підозра на стійкість до лікарських засобів або недолік лікування, для збору даних про мутації, які можуть бути пов’язані зі стійкістю до протитуберкульозних препаратів, особливо для нових лікарських засобів, слід проводити фенотипний ТМЧ та секвенування наступного покоління.ТМЧ для протитуберкульозних препаратів другої лінії має бути побудований на фундаменті надійних, гарантованих якістю ТМЧ для протитуберкульозних препаратів першої лінії. Тому необхідно встановити та затвердити високоякісні процедури ТМЧ. Для лабораторій в країнах з обмеженими ресурсами це, як правило, робиться у співпраці з членом мережі наднаціональних референс-лабораторії з діагностики туберкульозу. При впровадженні ТМЧ для препаратів другої лінії необхідно дотримуватися протоколів для перевірки випробувань та встановити відтворювану процедуру (тобто гарантувати, що міжтестовий договір становить 95% або більше), перш ніж розпочати тестування клінічних ізолятів та повідомити про ці результати ( див. Додаток С для інформації про тестування контролю якості). Таблиця 3 представляє огляд фенотипних та генотипних методів проведення ТМЧ щодо протитуберкульозних препаратів другої лінії та дає клінічну інтерпретацію результатів. |

1. Lakshmi R, Ramachandran R, Kumar DR, та ін. Перегляд тесту медикаментозної чутливості *Mycobacterium tuberculosis* до етионаміду в твердому культуральному середовищі. *Індійський журнал медичних досліджень*. 2015;142(5):538-542. doi:10.4103/0971-5916.171278.
2. Vilchèze, C., Wang, F., Arai, M., Hazbón, M.,Colangeli, R., Kremer, L. *Та ін*. (2006) Перенесення точкової мутації в *Mycobacterium tuberculosis inhA* вирішує ціль ізоніазиду. *Nat Med* 12:1027–1029.
3. Morlock, G., Metchock, B., Sikes, D., Crawford, J. та Cooksey, R. (2003) *ethA*, *inhA*, та *katG* -локуси стійких до етионаміду клінічних ізолятів *Mycobacteriumtuberculosis*. *Антимікробні препарати Chemother* 47:3799– 3805.
4. Pfyfer GE та ін. Багатоцентрова лабораторна валідація тесту медикаментозної чутливості  *Mycobacterium tuberculosis* до класичних препаратів другої лінії та новіших протимікробних препаратів з використанням радіометричної методики BACTEC 460 та методу пропорцій із твердими середовищами. *Журнал клінічної мікробіології*, 1999, 37: 3179-3186

|  |
| --- |
| ***Таблиця 3. Критичні концентрації (КК) та клінічні критичні точки (ККТ) для лікарських засобів другої лінії, рекомендованих для лікування СРТБ та ТБМЛ. (Проміжні КК виділені червоним кольором)***  |
| **Група** | **Лікарський препарат** | **Скорочення** | **Критичні концентрації (мкг / мл) для ТМЧ залежно від середовища** |
| **Левенштайн-****Йенсен 1** | **Middle-brook****7H101** | **Middle-brook****7H111** | **BACTEC МТІР рідка****Культура 1** |
| **Група А** | Левофлоксацин (КК) | ЛФК2<3 | **2,0** | 1,0 | - | 1,0 |
| Моксифлоксацин (КК) | МФК2'3 | **1,0** | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| Моксифлоксацин (ККТ)4 |  | 2,0 | - | 1,0 |
| Бедаквілін 5 | БДК | - | - | **0,25** | **1,0** |
| Лінезолід 6 | ЛЗД | - | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| **Група B** | Клофазимін | КФЗ | - | - | - | **1,0** |
| Циклосерин Теризидон Терзидон | ЦС ТРД | -- | -- | -- | -- |
| **Група C** | Етамбутол 7 | E | 2,0 | 5,0 | *7,5* | 5,0 |
| Деламанід 8 | ДЛМ | - | - | **0,016** | **0,06** |
| Піразинамід9 | ПЗА | - | - | - | 100,0 |
| Іміпенем-циластатин Меропенем | ІМП/ЦЛН МПМ | -- | -- | -- | -- |
| Амікацин 10(Або Стрептоміцин) | АМК | 30,04,0 | 2,02,0 | 2,0 | 1,01,0 |
| Етіонамід Протіонамід | ЕТО ПТО | 40,040,0 | 5,0 | 10,0 | 5,02,5 |
| *Пара*-аміносаліцилова кислота | ПА С | - | - | - | - |

1 Рекомендується використовувати метод непрямої пропорції. Інші методи з посівом на тверде поживне середовище (такі як коефіцієнт стійкості або абсолютна концентрація), не були адекватно підтверджені для протитуберкульозних препаратів.

2 Тестування офтоксацину не рекомендується, оскільки цей препарат більше не застосовується для лікування ЛСТБ, і лабораторії повинні перейти до тестування специфічних фторхінолони (левофлоксацин і моксифлоксацин), які використовуються в режимах лікування.

3 Проміжні КК левофоксацину та моксифоксацину для ЛЙ встановлені, незважаючи на дуже обмежені дані.

4 Клінічна критична точка концентрації (ККТ) для 7Н10 та МТІР застосовується до моксифоксацину високої дози (тобто 800 мг щодня).

5 Немає доказів щодо безпеки та ефективності БДК після шести місяців; окремим пацієнтам, які потребують тривалого вживання БДК, потрібно буде керуватися відповідно до кращих практик «від мітки».

6 Оптимальна тривалість вживання ЛЗД не встановлена. Вживання принаймні 6 місяців виявилося високоефективним, хоча токсичність може обмежувати вживання протягом тривалих періодів часу.

7 ТМЧ не є надійним та відтворюваним. ТМЧ не рекомендується.

8 Позиція деламаніда буде переоцінена, як тільки окремі дані пацієнта Otsuka будуть проведені для огляду. Немає доказів щодо безпеки та ефективності ДЛМ після шести місяців; окремим пацієнтам, які потребують тривалого вживання БЛМ, потрібно буде керуватися відповідно до кращих практик «від мітки».

9 Піразинамід вважається ефективним препаратом лише тоді, коли результати ТМЧ підтверджують чутливість в лабораторії забезпечення якості. Його використання з БДК може бути синергетичним.

10 Амікацин та стрептоміцин слід враховувати лише в тому випадку, якщо результати ТМЧ підтверджують чутливість та можна забезпечити якісний аудіологічний моніторинг зниження слуху. Стрептоміцин слід розглядати лише в тому випадку, якщо не можна застосовувати амікацин і якщо результати ТМЧ підтверджують чутливість. Стійкість до сстрептоміцину не виявляється за допомогою молекулярної лінії аналізу олігонуклеотидними зондами 2-ї лінії).

|  |
| --- |
| ***Таблиця 4. Таблиця клінічної інтерпретації протитуберкульозних препаратів другої лінії*** |
| **Лікарський препарат** | **Початковий діагностичний тест** | **Фенотипний ТМЧ** | **Запропоновані****Посилання****Методи** | **Коментар** |
| Левофлоксацин | SL-АОЗ слід виконувати для всіх випадків СРТБ. SL-АОЗ має чутливість 85% щодо МТІР ТМЧ. Специфіка висока. | Надійний та відтворюваний під час тестування КК у всіх середовищах ЛЙ 7H10 та МТІР | МТІР | Штами з відомими або припущеними мутаціями стійкості слід вважати стійкими. Більшість штамів без мутацій повинні бути чутливими. Однак штам без мутацій SL-АОЗ все ще може бути стійкими. Слід розглянути проведення ТМЧ при підозрі на високу стійкість. |
| Моксифлоксацин(Критичнаконцентрація) | SL-АОЗ слід виконувати для всіх випадків СРТБ. SL-АОЗ має чутливість 85% щодо МТІР ТМЧ. Специфіка висока. | Надійний та відтворюваний під час тестування КК у всіх середовищах ЛЙ 7H10, 7H11 та МТІР. | МТІР | Штам без мутацій SL-АОЗ все ще може бути стійким. Слід розглянути можливість виконання фенотипного ТМЧ у КК та ККТ концентрації при підозрі на високу стійкість. |
| Моксифлоксацин(Клінічна критична точкаконцентрації) | SL-АОЗ слід виконувати для всіх випадків СРТБ. SL-АОЗ має чутливість 85% щодо МТІР ТМЧ. Специфіка висока. Деякі мутації, виявлені за допомогою SL-АОЗ, призводять до дуже високих МІК, для яких навіть високодозований моксифоксацин не є ефективним. | Клінічна критична точка концентрації (ККТ) для 7H10 та МТІР захищена. | МТІР | Моксифлоксацин, навіть при високій дозі, навряд чи буде ефективним при стійкості до ККТ концентрації або якщо будуть виявлені певні мутації високого довірчого інтервалу, пов’язані з високими МІК. Якщо штам стійкий до КК, але чутливий ККТ, можна розглядати високу дозу МФК. |
| Бедаквілін | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | ККстворено для тестування в середовищах 7H11 та МТІР. | МТІР | В ідеалі проводити фенотипний ТМЧ під час початку лікування. Якщо базовий ТМЧ не виконується, проводять ТМЧ з першим штамом, виділеним у пацієнтів під час моніторингу лікування.a |
| Лінезолід | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | ККстворено для тестування в середовищах 7H10, 7H11 та МТІР. | МТІР | В ідеалі проводити фенотипний ТМЧ під час початку лікування. Якщо базовий ТМЧ не виконується, проводять ТМЧ з першим штамом, виділеним у пацієнтів під час моніторингу лікування.a |
| Клофазимін | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | ККстворено лише для тестування середовища МТІР. | МТІР | В ідеалі проводити фенотипний ТМЧ під час початку лікування. Якщо базовий ТМЧ не виконується, проводять ТМЧ з першим штамом, виділеним у пацієнтів під час моніторингу лікування.a |
| ЦиклосеринТерзидон | Наразі не існує швидкого методу для стійкості виявлення. | КК не було створено для жодного середовища ТМЧ | Не застосовується | ТМЧ не рекомендується |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Лікарський препарат** | **Початковий діагностичний тест** | **Фенотипний ТМЧ** | **Запропоновані****Посилання****Методи** | **Коментар** |
| Етамбутол | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | Фенотипний ТМЧ не є надійним і відтворюваним, і його не рекомендується | Не застосовується | Генотипний ЧЛЗ (секвенування), можливо, більш надійний, ніж фенотипний ТМЧ. Потрібно більше доказів |
| Деламанід | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | ККстворено для тестування в середовищах 7H11 та МТІР. | МТІР | В ідеалі проводити фенотипний ТМЧ під час початку лікування. Якщо базовий ТМЧ не виконується, проводять ТМЧ з першим штамом, виділеним у пацієнтів під час моніторингу лікування.a |
| Піразинамід | Наразі не існує рекомендованого ВООЗ швидкого методу. | Метод ТМЧ, стандартизований в МТІР. Помилково стійкі результати можна виявити, якщо інокуляція ТМЧ неправильно підготовлена | ДНКсеквенування гену *pncA* | У лабораторії із забезпеченням якості чутливий результат ТМЧ для ПЗА може бути використаний для керівництва включенням ПЗА до режиму лікування ЛСТБ. Не включати ПЗА при виявленні стійкості, або при використанні, ПЗА не вважається ефективним |
| Амікацин або Стрептоміцин) | SL-АОЗ слід виконувати для всіх випадків СРТБ. SL-АОЗ має чутливість 85% для виявлення стійкості до ізоніазиду щодо МТІР ТМЧ. Специфіка висока. Немає швидкого методу виявлення стійкості доСтрептоміцин b | ККстворено для тестування в середовищах ЛЙ Middlebrook та МТІР. | МТІР | Ін’єкційні препаратиШтам без мутацій генів *rr* та *eis*, виявлений SL-АОЗ, все ще може бути стійким до АМК.Слід розглянути проведення фенотипного ТМЧ, при підозрі на високу стійкість.Якщо використовується стрептоміцин, виконати фенотипний ТМЧ на початку лікування, якщо це можливо. |
| ІміпенемциластинМеропенем | Наразі не існує швидкого методу для стійкості виявлення. | КК не було створено для жодного середовища ТМЧ | Не застосовується | ТМЧ не рекомендується |
| ЕтіонамідПротіонамід d | Мутації в промоторній області гена *inhA* виявляються за допомогою FL-АОЗ. Ці мутації надають перехресну стійкість класу тіоамідів. | ТМЧ не є надійним і відтворюваним  | ДНКсеквенуванням промоторної області *inhA* та генів *etA* та *ethR*.d | Не включати тіоаміди при виявленні мутації, пов'язаної зі стійкістю |
| *Парааміносаліцилова**кислота* | Наразі не існує швидкого методу для стійкості виявлення. | КК не було створено для жодного середовища ТМЧ | Не застосовується | ТМЧ не рекомендується |

a Виконання фенотипного ТМЧ для штамів, виявлених у пацієнтів під час моніторингу лікування. При виявленні стійкості, зберігати штами

 та, якщо можливо, виконати ВГС для збору даних про мутації, пов’язані зі стійкістю

bSL-АОЗ не охоплюють відповідну область гена *rrs* або інших генів, пов'язаних зі стійкістю до стрептоміцину

c Іміпенем і меропенем мають високу нестабільність у рідких середовищах

d Необхідні додаткові дані для підвищення довірчого інтервалу у зв’язку цих мутацій із стійкістю до лікарських засобів

|  |
| --- |
| **2. Тест медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів з посівом на тверде поживне середовище** |
| **2.1 Метод пропорцій з використанням середовища Левенштайна-Йенсена** ***2.1.1 Принципи***Метод пропорцій може бути використаний із середовищем Левенштайна-Йенсена (ЛЙ), щоб визначити, чи ізоляти *М. tuberculosis* чутливі до протитуберкульозних препаратів. Середовище, що містить критичну концентрацію протитуберкульозного препарату, інокулюють розведенням суспензії культури (зазвичай 10–2 розведення суспензії MacFarland 1), а контрольне середовище без протитуберкульозного препарату інокулюють розведенням 1: 100 (зазвичай 10–4 розведення суспензії MacFarland 1). Зростання (тобто кількість колоній) в середовища, що містять препарат, порівнюється з ростом в контрольному середовище без препарату. Розраховується відношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній (скоригованого на коефіцієнт розведення) на середовищі без протитуберкульозного препарату, а частка виражається у відсотках. Попередні результати для чутливих ізолятів можуть бути прочитані через 3-4 тижні інкубації; дефінітивні результати можуть бути прочитані через 6 тижнів інкубації. Стійкість виявляється протягом 3-4 тижнів. ТМЧ для препаратів другої лінії схожий на ТМЧ для препаратів першої лінії за рівнем підготовки середовищ, бактеріальної суспензії та розведення; інокуляції середовища; інкубації культур; та графіки читання та звітності.2 4,25 Деякі з цих процедур описані в наступних розділах та додатках.***2.1.2 Підготовка середовища***Середовище ЛЙ готується без картопляного крохмалю за описаною нижче процедурою.* Використовуйте свіжі яйця віком не більше 1 тижня від курей, яких не годували антибіотиками.
* Почистіть яйця мильним розчином і залиште їх у розчині на 30 хвилин.
 |  | * Яйця ретельно промийте під проточною водою, а потім замочіть їх у 70% етиловому спирті протягом 15 хвилин.
* Покладіть яйця на аркуш чистого паперового рушника і дайте висохнути на повітрі
* Розбийте яйця в стерильну колбу, а потім струсіть колбу вручну для гомогенізації яєць.
* Відфільтруйте суспензію яєць через чотири шари стерильної марлі та відберіть відфільтровану суспензію у стерильний мірний циліндр, щоб її можна було виміряти.
* Приготуйте 600 мл рекомендованого сольового розчину, як описано нижче, і автоклавуйте при 121 ° С протягом 30 хв. a. Остудіть до кімнатної температури.

Для приготування сольового розчину розчинити інгредієнти в наступному порядку. (Як варіант, сольовий розчин ЛЙ може бути приготований з комерційної бази відповідно до інструкцій виробника)1. Монокалій фосфат (безводний) 2,4 г2. Сульфат магнію 7H2O 0,24 г3. Цитрат магнію 0,6 г4. Аспарагін 3,6 г5. Гліцерин (сорт реагенту) 12,0 мл6. Дистильована або деіонізована вода 600,0 мл* Додайте 20,0 мл зеленого розчину малахіту в охолоджений розчин солі; використовуйте у воді свіжоприготований 2% розчин малахіту зеленого кольору.
* Додайте 1000 мл гомогенізованих яєць.
* Ретельно перемішайте і дозуйте 5,0 мл у кожну стерильну пробірку з кришкою.
* Помістіть пробірки в інспіратор під кутом.
 |
| 24 *Лабораторні послуги по боротьбі з туберкульозом. Частина III: культура*. Женева, Всесвітня організація охорони здоров'я, 1998 р (WHO/TB/98.258)25 Kent PT, Kubica G P. *Мікробіологія охорони здоров'я: посібник для лабораторії III рівня*. Атланта, штат Джорджія, центри контролю та профілактики захворювань США, 1985 р. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| * Проціджуйте пробірки протягом 40-50 хвилин, коли температура стабілізується на рівні 85 ° С ± 1 ° С.
* Для приготування середовища, що містить препарат, який підлягає випробуванню, препарати включають у рідку суміш до того, як вона буде дозирована в пробірки та конденсована. Усі пробірки повинні бути марковані назвою препарату та концентрацією.
* Конденсоване середовище Левенштайна-Йенсена із вбудованими протитуберкульозними препаратами та без них може зберігатися при 6 ° С ± 2 ° С протягом 1 місяця.
* Після конденсування випадковим чином виберіть близько 5% пробірок для тесту на стерильність. Кількість вибраних пробірок залежить від кількості пробірок, підготовлених у кожній партії. Якщо була підготовлена менша кількість пробірок, виберіть принаймні 10 пробірок для тестування на стерильність. Ці пробірки слід інкубувати при 35-37 ° С протягом 48 годин як первинний тест на стерильність, а потім принаймні 5 пробірок потрібно інкубувати при 35-37 ° С протягом 4 тижнів для тесту на повільно зростаючі бактерії та грибки. Пробірки, що інкубуються протягом 48 годин і виявлені стерильними, можуть використовуватися для рутинної роботи з культурою.
* Тест контролю якості слід проводити на кожній партії свіжоприготованого середовища (див. Додаток С).
 |  | ***2.1.3 Протитуберкульозні препарати та критичні концентрації для тестування***Протитуберкульозні препарати, рекомендовані для МЧ з використанням середовища ЛЙ, та встановлені критичні концентрації для тестування, наведені нижче. 26 Більш нові препарати, такі як бедахілін, лінезолід та клофазімін, не були перевірені для тестування з використанням середовищ ЛЙ. Відомо, що бедахілін значно зв’язується з білком. |
| • Ізоніазид | 0,2 мг/л |
| • Рифампіцин | 40,0 мг/л |
| • Етамбутол | 2,0 мг/л |
| • Левофлоксацин | 2,0 мг/л |
| • Моксифоксацин | 1,0 мг/л |
| • Амікацин | 30,0 мг/л |
| • Стрептоміцин | 4,0 мг/л |
| **Примітка:** Для приготування середовища слід використовувати чисті рецептури досліджуваних препаратів. Препарати, які підлягають випробуванню, слід зберігати в ексикаторі або згідно з інструкціями виробника. Маса препарату у формі порошку повинна бути розрахована для кожного препарату виходячи з активності, наданої виробником (див. Додаток D для більш детальної інформації.)Деталі концентрацій для різних протитуберкульозних препаратів та приготування розчинів наведені в таблиці 5. |

26 Технічний звіт про критичні концентрації для тесту мудикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні туберкульозу, стійкого до лікарських засобів. [Женева: World Health Organization;2018 (WHO/CDS](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf)/TB/2018.5) (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf> доступ 1 травня 2018 року).

|  |
| --- |
| ***Таблиця 5.  Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища Левенштайна-Йенсена*** |
|  | **Кінцева концентрація****протитуберкульозного препарату****(мкг / мл)** | **Вихідний розчин і розчинник** | **Подальші розведення****в середовищі** **Левенштайна-Йенсена**  |
| **Протитуберкульозні препарати першої лінії** | Ізоніазид (0,2) | * Розчинити 20,0 мг ІНД у 40 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 500 мкг / мл
* Розвести 2,0 мл розчином А до кінцевого об'єму 50 мл стерильної дистильованої води - 20 мкг / мл (розчин B)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища ЛЙ |
| Рифампіцин (40,0) | * Розчинити 80,0 мг / активність a в 5,0 мл абсолютного метанолу - 1600 мкг / мл
* Далі розвести до кінцевого об'єму 5 мл 95% етанолу - 800 мкг / мл (розчин B) (самостерилізується)
 | Додати 2,5 мл розчину В до 500 мл середовища ЛЙ |
| Етамбутол (2,0) | * Розчинити 10,0 мг ЕМБ у 50 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 200 мкг / мл
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища ЛЙ |
| **Протитуберкульозні препарати другої лінії** | • Левофлоксацин (2,0) | * Розчинити 10 мг ЛФК у 5 мл стерильного 0,1 М NaOHb. (Розчин А) - 2000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 200 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину С до 500 мл середовища ЛЙ |
| Моксифлоксацин (1,0) Критична концентрація | * Розчинити 10 мг МФК у 5 мл стерильного 0,1 М NaOHb. (Розчин А) - 2000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 20 мл - 100 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину С до 500 мл середовища ЛЙ |
| Амікацин (30) | * Розчинити 30 мг a АМК у 10 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 3000 мкг / мл
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища ЛЙ |
| Стрептоміцин (4,0) | * Розчинити 20 мг / активність a СТР у 50 мл стерильної дистильованої води. (Розчин А) - 4000 мкг / мл
* Розвести 5 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 50 мл - 400 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину С до 500 мл середовища ЛЙ |

NaOH, гідроксид натрію.

a Налаштування активності. Див. Додаток D

b для 1М NaOH: розчинити 40 г NaOH в 1 л дистильованої або деіонізованої води (або розчинити 4,0 г в 10 мл); розвести до 1:10 для досягнення

Дозування 0,1 м.

**Примітка:** Схема підготовки, показана в таблиці 5, може бути змінена за потребою. Докладніше про джерело, зважування, обчислення активності та заморожування протитуберкульозних препаратів див. у додатку D.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***2.1.4 Підготовка мікобактеріальної суспензії***Непрямий ТМЧ проводиться з використанням первинного ізоляту або субкультури на середовищі ЛЙ. Свіжий первинний ізолят є кращим, оскільки характеристики популяції (наприклад, частка стійких бактерій) можуть змінюватися після субкультивації, особливо після повторного субкультирування. Незалежно від того, використовується оригінальний ізолят або субкультура, культуру, що активно розвивається, слід використовувати протягом 1-2 тижнів після появи зростання. Якщо минуло більше 2-х тижнів з дня, коли спостерігається позитивне зростання на середовищі, повторно субкультурірують та використовують щойно вирощену субкультуру.**Заходи безпеки:** Поводження з культурами, доповнення та маніпуляції слід проводити всередині БСК. Слід дотримуватися рекомендацій ВООЗ щодо цих процедур або встановлених національних рекомендацій. Використовувати належним чином стерилізовані та контрольовані якістю реагенти та асептичні методи впродовж усієї процедури ТМЧ.**Процедура**Далі зазначено процедуру приготування суспензії для культури.* Отримайте репрезентативну частину росту бактерій шляхом відбору проб якомога більше колоній. Будьте обережні, щоб не зішкрібати будь-яке середовище, оскільки залишкове середовище дасть помилкові показання помутніння.
* Перенесіть колонії у скляну пробірку, що містить 5-6 мл звичайного стерильного сольового розчину (0,85% хлориду натрію). (Примітка: Як варіант, менший об'єм 0,5-1,0 мл може бути використаний для полегшення гомогенізації та мінімізації скупчення).
* Суспензію можна гомогенізувати, використовуючи 3 мм скляні кульки (використовуйте приблизно 5-10 кульок), а потім перемішати вихровим способом протягом 2-3 хвилин. Замість скляних кульок може використовуватися скляна паличка з розплавленим округлим наконечником. Якщо використовується скляна паличка, зростання слід емульгувати, використовуючи стрижень, щоб втерти бактерії до внутрішньої стінки пробірки, а потім пробірку необхідно перемішати вихровим способом протягом 2-3 хвилин. Якщо вихору немає, пробірку можна енергійно струшувати
 |  | вручну. Перед тим, як струсити або перемішувати вихровим способом, переконайтесь, що кришка щільно закрита.* Прокручуйте пробірку близько 1 хвилини. Якщо немає вихору, ретельно перемішуйте його вручну, щоб гомогенізувати суспензію.
* Залиште пробірку непорушеною на 30 хвилин, щоб великі скупчення бактерій осіли. Не порушуючи осад, вийміть 2–4 мл супернатанту і перенесіть у стерильну пробірку.
* Відрегулюйте помутніння суспензії до стандарту McFarland № 1. Це буде робоча суспензія для ТМЧ. Вона повинна бути однорідною, без видимих скупчень. Суспензія бактерій відповідає приблизно 1 мг мокрої бактеріальної маси / мл (приблизно одна повна петля з внутрішнім діаметром 3 мм). Помутніння суспензії візуально регулюється, порівнюючи її з еталонним стандартом McFarland № 1 (інформацію про підготовку стандартів McFarland див. у Додатку B).

***2.1.5 Розведення суспензії та інокуляція середовища Левенштайна-Йенсена*** Зробити серійні 10-кратні розведення стандартної суспензії шляхом розведення послідовно 1,0 мл суспензії культури в пробірках, що містять 9 мл стерильної дистильованої води або звичайного сольового розчину (0,85% хлориду натрію). Обов’язково ретельно перемішати кожне розведення. Розчини 10–2 (для контролю 1) та 10–4 (для контролю 2) інокулюють як засоби контролю росту (тобто середовища ЛЙ без будь-яких протитуберкульозних препаратів). Деякі лабораторії інокулюють повторювані пробірки ЛЙ як для контролю 1, так і для контролю 2. Одну пробірку із середовищем, що містить кожен протитуберкульозний препарат, інокулюють лише 10–2 розведенням. Об'єм інокуляту становить 0,1 мл. Інокулят повинен бути розміщений на середині двох третин нахилу, уникаючи країв. Переконайтесь, що всі пробірки марковані належним чином.***2.1.6 Інкубація***Після інокуляції пробірки розміщують під кутом і інкубують при 37 ° С ± 1 ° С. Деякі лабораторії інкубують пробірки з трохи ослабленими |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| кришками з різьбою, щоб забезпечити випаровування інокулята. Потім через 24-48 годин кришки натягують і пробірки інкубують близько 6 тижнів. Слід бути надзвичайно обережними, якщо кришки залишаються вільними, оскільки штами ТБМЛ та ЛСТБ становлять потенційно великий ризик для біобезпеки.***2.1.7 Огляд культур***Результати можна прочитати в два етапи. Результати читаються через 21, 28 та 40 днів після інокуляції.• Порахуйте загальну кількість колоній, що ростуть у різних пробірках. Контроль 1 зазвичай має злитий ріст; Контроль 2 повинен мати лічильні колонії (близько 20-100 колоній). Якщо дві пробірки були інокульовані як контрольні групи, то для розрахунків використовується середнє число колоній для обох контрольних груп.• Частка стійких бацил обчислюється шляхом порівняння підрахунків на контролі 1 (з розведенням 10–2) з підрахунками на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат (з розведенням 10–2). Потім відсоток обчислюється за наступною формулою. |  | 3. Контроль 2 (розведення 10–4) має 80 колоній. Для оцінки кількості колоній у контролі 1 (розведення 10–2) помножують кількість колоній у контролі 2 на 100. Це дасть 8000 колоній (ця конверсія дає кількість колоній, що очікується при розведенні 10–2, щоб її можна було використовувати у наведеній вище формулі);4. 6/8000 × 100 = 0,075%, тому штам чутливий**Примітка:** Не рахують колонії, які ростуть лише у верхній частині нахилу, оскільки це вказує на те, що протитуберкульозний препарат був інактивований у цій частині. **Кількість колоній, вирощених на контролі 1, має бути приблизно в 100 разів більше кількості колоній на контролі 2; це вказує на те, що розведення 1: 100 було підготовлено належним чином.*****2.1.8 Інтерпретація та звітування про результати**** Результати інтерпретуються методом пропорції 1%. Це означає, що якщо 1% або більше популяцій стійкі, то культуру вважають стійкою. Якщо відношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній на контрольному середовищі менше 1%, то повідомляється, що штам чутливий.
* Якщо на 21 або 28 день відношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній на контрольному середовищі становить 1% або більше, тоді культура є стійкою. Якщо на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, немає колоній, а контроль 1 має злитий ріст, без подальшого зчитування повідомляється, що штам чутливий. За винятком цих двох обставин, про всі інші результати слід повідомити після 40 дня.
* На 28 день, якщо Контроль 1 або Контроль 2 має 20 колоній або менше, це вказує на те, що середовище було недостатньо інокульовано. Якщо на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, спостерігається ріст, повідомляється, що воно стійке; але якщо на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, немає зростання, тест слід повторити, використовуючи свіжий інокулят.
 |
| Кількість колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат | **x** 100 |
| Кількість колоній на контролі 1 (розведення 10–2) |
| **Приклад 1**1. Контроль росту (розведення 10-2) має 80 колоній;2. Пробірка з протитуберкульозним препаратом має 6 колоній;3. 6/80 × 100 = 7,5%, тому штам стійкий.Якщо в контролі 2 (розведення 10–4) є лічильні колонії, помножують кількість колоній на 100 і порівнюють це число з кількістю колоній на контролі 1 (інокульована пробірка при розведенні 10–2); Контроль 1 повинен мати злитий ріст.**Приклад 2**1. Контроль 1 має злитий ріст; Контроль 2 має 80 колоній;2. Пробірка з протитуберкульозним препаратом має 6 колоній; (розведення 10–2) |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| • Якщо контроль 2 має злитий ріст, це вказує на те, що середовище було переінокульовано, і тест слід повторити. У цій ситуації зростання на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, може бути наслідком надмірної інокуляції, і культуру не слід трактувати як стійку. Однак якщо на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, немає зростання, результат тесту можна вважати чутливим.• Результати тестів слід повідомляти лише як «чутливі» або «стійкі», щоб полегшити використання лікарем. Про результати слід повідомити, як тільки вони будуть доступні. Про результати можна повідомити через 3 тижні, якщо спостерігається ріст на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, а всі інші параметри задовільні.***2.1.9 Контроль якості***Контроль якості є надзвичайно важливим для тесту медикаментозної чутливості взагалі та для ТМЧ для препаратів другої лінії зокрема. Процедури контролю якості описані в Додатку С.**2.2 Спосіб пропорції з використанням агарового середовища Middlebrook 7H10 або 7H11** ***2.2.1 Принципи***Метод пропорцій може бути використаний із середовищем Middlebrook 7H10 (7H10) або 7H11 (7H11), щоб визначити, чи ізоляти *М. tuberculosis* чутливі до протитуберкульозних препаратів другої лінії. Готують стандартизовану суспензію досліджуваного організму і виробляють визначені розведення; Потім їх інокулюють на середовищі, що містять антимікробні препарати, і на контрольні середовища, які не містять антимікробні препарати. Після інкубації культур протягом 3-4 тижнів зростання (тобто кількість колоній) на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, порівнюється з ростом на контрольному середовищі. Розраховується відношення кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній на середовищі без протитуберкульозного препарату. |  | (виправлено на розведення), а пропорція виражається у відсотках. Ізолят вважається стійким, якщо частка кількості колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, до кількості колоній на контрольному середовищі становить 1% або більше.27***2.2.2 Підготовка середовища***Рекомендовані середовища - 7H10 та 7H11 агар. І 7H10, і 7H11 середовища можуть використовуватися для ТМЧ, хоча 7H11 більше підходить для росту штамів, стійких до ізоніазидів. ТМЧ з використанням середовища Middlebrook часто виконується з використанням пластикових квадрантів чашок Петрі (Примітка: для бедахіліну необхідно використовувати полістирол з чашками Петрі), у якому квадранти містять або середовище без протитуберкульозного препарату, або середовище з одним із перевірених протитуберкульозних препаратів. Середовище Middlebrook 7H10 або 7H11 готується з зневодненої основи згідно інструкцій виробника. Після приготування середовища додають добавку, що містить олеїнову кислоту, альбумін, декстрозу та каталазу (ОАДК), що має важливе значення для росту комплексу бактерій M. tuberculosis.Кожен квадрант чашки Петрі містить 5 мл середовища: 500 мл середовища потрібно для заповнення 1 квадранта на кожній з приблизно 100 планшетів. Процедура перемішування середовища коротко описана нижче. Позначають планшети та квадранти, щоб усі планшети та квадранти були марковані правильним протитуберкульозним препаратом та концентрацією.* Розливають 450 мл дистильованої води в колбу на 1000 мл Ерленмайєра.
* зважують 9,5 г агарової основи 7Н10 або 7Н11; регулюють вагу агарової основи відповідно до інструкцій виробника в упаковці. Додають агарну основу в дистильовану воду. Цієї кількості достатньо для кожного заданого квадранта з 100 планшетів.
* Додають 2,5 мл гліцерину в кожну колбу.
* Ретельно перемішують.
* Містять кожну колбу з бавовняним ковпаком, або кришкою з різьбою, і автоклавірують при 121 ° C протягом 15 хвилин.
 |

27 Kent PT, Kubica G P. *Мікробіологія охорони здоров'я: посібник для лабораторії III рівня*. Атланта, штат Джорджія, центри контролю та профілактики захворювань США, 1985 р.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| • Поки колби середовища автоклавують, виймають основні розчини протитуберкульозних препаратів та добавку ОАДК з холодильника та доводять до кімнатної температури.• Після автоклавування дають колбам із середовищем охолонути до 50–56 ° C.• Додають 50 мл добавки ОАДК до 450 мл рідкої основи агару і добре перемішають.• До середовища, що містить протитуберкульозний препарат, додають відповідну кількість препарату (див. Таблиці 6 та 7), добре перемішують та негайно дозують 5,0 мл у кожен квадрант, використовуючи асептичні методи. Усі пробірки повинні бути марковані назвою протитуберкульозного препарату та концентрацією.• Дають агару затвердіти при кімнатній температурі.• Планшети слід зберігати при температурі 4 ° C у перевернутому положенні в мішках із застібкою та захищати від світла.• Стерильність кожної партії планшетів слід перевірити шляхом інкубації 1-5% від загальної кількості при 35-37 ° С протягом 48 годин. Кількість, обрана для тесту на стерильність, залежить від кількості планшетів, підготовлених у кожній партії.***2.2.3 Протитуберкульозні препарати та концентрації для тестування***Агарові середовища 7H10 і 7H11 можуть використовуватися для ТМЧ для вибраних протитуберкульозних препаратів другої  |  | лінії. Концентрації антимікробних препаратів, що використовуються для тестування, є встановленими критичними концентраціями для цих середовищ, які використовуються для тестування на *M. tuberculosis* (див. Таблицю 1) 28. ці антимікробні препарати наведені в таблиці 6 та 7.Тільки препарати другої лінії з встановленими критичними концентраціями повинні бути випробувані.**Примітка:** критичні концентрації деяких протитуберкульозних препаратів недоступні як для 7H11, так і для 7H11. |
|  |  | 7H10 | Середовище 7H11 |
|  | * • Ізоніазид
 | 0,2 мкг / мл | 0,2 мкг / мл |
|  | * • Рифампіцин
 | 1,0 мкг / мл | 1,0 мкг / мл |
|  | * • Етамбутол
 | 5,0 мкг / мл | 7,5 мкг / мл |
|  | * • Левофлоксацин
 | 1,0 мкг / мл | - |
|  | * Моксифлоксацин (КК)
 | 0,5 мкг / мл | 0,5 мкг / мл |
|  | * Моксифлоксацин (ККТ)
 | 2,0 мкг / мл | - |
|  | * • Бедахілін a
 | - | 0,25 мкг / мл |
|  | * • Лінезолід
 | 1,0 мкг / мл | 1,0 мкг / мл |
|  | * • Деламанід
 | - | 0,016 мкг/мл |
|  | * • Амікацин
 | 2,0 мкг / мл | - |
|  | * • Стрептоміцин
 | 2,0 мкг / мл | 2,0 мкг / мл |
|  | a Для бедахіліну для приготування вихідних розчинів, робочих розчинів та використовуваних кінцевих планшетів або пробірок слід використовувати тільки полістирол або скло. |

28 Технічний звіт про критичні концентрації для тесту мудикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні туберкульозу, стійкого до лікарських засобів. [Женева: World Health Organization;2018 (WHO/CDS](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf)/TB/2018.5) (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf> доступ 1 травня 2018 року).

|  |
| --- |
| ***Таблиця 6.  Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища 7H10***  |
|  | **Кінцева концентрація протитуберкульозного препарату (мкг / мл)** | **Вихідний розчин і розчинник** | **Подальші розведення****в середовищі Middlebrook****7H10** |
| **Протитуберкульозні препарати першої лінії** | Ізоніазид (0,2) | * Розчинити 20,0 мг ІНД у 40 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 500 мкг / мл
* Розвести 2,0 мл розчином А до кінцевого об'єму 50 мл стерильної дистильованої води - 20 мкг / мл (розчин B)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |
| Рифампіцин (1,0) | * Розчинити 10,0 РИФ мг / активність в 5,0 мл абсолютного метанолу (або ДМСО) - 2000 мкг / мл
* Далі розвести до кінцевого об'єму 5 мл 95% етанолу - 100 мкг / мл (розчин B) (самостерилізується)
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища 7H10. |
| Етамбутол (5,0) | * Розчинити 10,0 мг ЕМБ у 20 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 500 мкг / мл
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища 7H10. |
| **Протитуберкульозні препарати другої лінії** | Левофлоксацин (1,0) | * Розчинити 10 мг ЛФК у 10 мл стерильного 0,1 М NaOHb. (Розчин А) - 1000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 100 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |
| Моксифлоксацин (0,5) Критична концентрація | * Розчинити 10 мг МФК у 20 мл стерильного 0,1 М NaOHb. (Розчин А) - 500 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 50 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |
| Моксифлоксацин (2,0) Клінічна критична точка | * Розчинити 10 мг МФК у 5 мл стерильного 0,1 М NaOHb. (Розчин А) - 2000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 200 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |
| Лінезолід (1,0) | * Розчинити 10 мг ЛЗД у 10 мл стерильної дистильованої води. (Розчин А) - 1000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 100 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |
| Амікацин (2,0) | * Розчинити 10,0 мг АМК у 20 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 2000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 200 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H10. |

NaOH, гідроксид натрію. Розвести до 1:10 для досягнення дозування 0,1 М.

Налаштування активності. Див. Додаток D

b для 1М NaOH: розчинити 40 г NaOH в 1 л дистильованої або деіонізованої води (або розчинити 4,0 г в 10 мл);

**Примітка:** Схема підготовки, показана в таблиці 6, може бути змінена за потребою. Докладніше про джерело, зважування, обчислення активності та заморожування протитуберкульозних препаратів див. у додатку D.

|  |
| --- |
| ***Таблиця 7.  Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів першої та другої лінії для використання з 500 мл середовища 7H11***  |
|  | **Кінцева концентрація****протитуберкульозного препарату****(мкг / мл)** | **Вихідний розчин і розчинник** | **Подальші розведення в середовищі 7H11** |
| **Протитуберкульозні препарати першої лінії** | Ізоніазид (0,2) | * Розчинити 20,0 мг ІНД у 40 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 500 мкг / мл
* Розвести 2,0 мл розчином А до кінцевого об'єму 50 мл стерильної дистильованої води - 20 мкг / мл (розчин B)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H11. |
| Рифампіцин (1,0) | * Розчинити 10,0 РИФ мг / активність в 5,0 мл абсолютного метанолу (або ДМСОb) - 2000 мкг / мл
* Далі розвести до кінцевого об'єму 5 мл 95% етанолу - 100 мкг / мл (розчин B) (самостерилізується)
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища 7H11. |
| Етамбутол *(7,5)* | * Розчинити 15,0 мг ЕМБ у 20 мл стерильної дистильованої води (розчин A) - 750 мкг / мл
 | Додати 5 мл розчину А до 500 мл середовища 7H10. |
| **Протитуберкульозні препарати другої лінії** | Моксифлоксацин (0,5)Критичнаконцентрація | * Розчинити 10 мг МФК у 20 мл стерильного 0,1 М NaOHa. (Розчин А) - 500 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 50 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H11. |
| Бедахілін c (0,25) | * Розчинити 12 мг фумаратних солей БДХ (еквівалентно 10 мг основи БДХ) у 20 мл стерильного ДМСО b. (Розчин А) - 500 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А ДМСО до кінцевого об'єму 20 мл - 25 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H11. |
| Лінезолід (1,0) | * Розчинити 10 мг ЛЗД у 10 мл стерильної дистильованої води. (Розчин А) - 1000 мкг / мл
* Розвести 1 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 100 мкг / мл (Розчин В)
 | Додати 5 мл розчину В до 500 мл середовища 7H11. |
| Деламанід (0,016) | * Розчинити 10,0 мг ДЛМ у 2,5 мл стерильного ДМСО (розчин A) - 4000 мкг / мл
* Розвести 0,5 мл розчину А стерильною водою до кінцевого об'єму 12,5 мл - 160 мкг / мл (Розчин В)
* Розвести 1 мл розчину А стерильною дистильованою водою до кінцевого об'єму 10 мл - 16,0 мкг / мл (Розчин C)
* Розвести 1 мл розчину C стерильною дистильованою водою до кінцевого об'єму 10 мл - 1,6 мкг / мл (Розчин D)
 | Додати 5 мл розчину D до 500 мл середовища 7H10. |

NaOH, гідроксид натрію. Розвести до 1:10 для досягнення дозування 0,1 М.

a для 1М NaOH: розчинити 40 г NaOH в 1 л дистильованої або деіонізованої води (або розчинити 4,0 г в 10 мл);

bДМСО - диметилсульфоксид. Препарат повинен повністю розчинятися, а в препараті не повинно бути осаду або помутніння розчину

c Для бедахіліну для приготування вихідних розчинів, робочих розчинів та використовуваних кінцевих планшетів або пробірок слід використовувати тільки полістирол або скло.

**Примітка:** Схема підготовки, показана в таблиці 7, може бути змінена за потребою. Докладніше про джерело, зважування, обчислення активності та заморожування протитуберкульозних препаратів див. у додатку D.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***2.2.4 Підготовка мікобактеріальної суспензії***Свіжий первинний ізолят є кращим, оскільки характеристики популяції можуть змінюватися після субкультивації, особливо після повторного субкультирування. Для приготування інокуляту слід використовувати свіжовирощену культуру. Культуру слід ретельно перевірити на чистоту, виконавши мазок на швидкі кислотні бацили (ШКБ), а потім промазавши суспензію на планшеті з кров'яним агаром; зростання слід перевірити після інкубації планшету при 37 ° С протягом 48 годин.Свіжий первинний ізолят є кращим, оскільки характеристики популяції (наприклад, частка стійких бактерій) можуть змінюватися після субкультивації, особливо після повторного субкультирування. Незалежно від того, використовується оригінальний ізолят або субкультура, культуру, що активно розвивається, слід використовувати протягом 1-2 тижнів після появи зростання. Якщо минуло більше 2-х тижнів з дня, коли спостерігається позитивне зростання на середовищі, повторно субкультурірують та використовують щойно вирощену субкультуру.Помутніння суспензії повинно дорівнюватися стандарту McFarland № 1. Інокуляція середовища 0,1 мл розведення 10–2 або розведення 10–4, або обох розведень цієї стандартизованої суспензії повинна створити кількість океми колоній на середовищі, що не містить протитуберкульозного препарату.**Заходи безпеки:** Поводження з культурами, доповнення та маніпуляції слід проводити всередині БСК. Слід дотримуватися рекомендацій ВООЗ щодо цих процедур або встановлених національних рекомендацій. Використовувати належним чином стерилізовані та контрольовані якістю реагенти та асептичні методи впродовж усієї процедури ТМЧ.**Процедура****Використання росту на твердому середовищі**• Вишкребіть колонії з поверхні твердого середовища. Візьміть зразок росту з усієї поверхні культурального середовища. Слідкуйте за тим, щоб не зішкрібати середовища, оскільки залишкове середовище дасть помилкові показання помутніння суспензії.• Перенесіть бактеріальну масу у відповідну мітку пробірки, що містить 5-6 мл бульйону 7Н9 |  | з добавкою альбумін-декстрози-каталази (АДК), 0,05% скляних кульок Tween 80 та 3 мм (використовують приблизно 6–10 кульок). (Примітка: Як варіант, менший об'єм 0,5-1,0 мл може бути використаний для полегшення гомогенізації та мінімізації скупчення). Закрийте пробірку.* Енергійно прокручуйте протягом приблизно 1 хвилини для гомогенізації зразка.
* Залиште пробірку непорушеною на 30 хвилин, щоб великі скупчення бактерій осіли.
* Вийміть 1-2 мл з верхньої частини суспензії і перенесіть її в стерильну пробірку. Необхідно стежити, щоб не порушити осад.
* Відрегулюйте помутніння суспензії до стандарту McFarland № 1. (Див. Додаток B для отримання інформації про стандарти помутніння McFarland.)

**Використання росту в рідкому середовищі*** Також може використовуватися середовище Middlebrook 7H9. Для субкультури зазвичай використовують середовище 7H9 з АДК і 0,05% Tween 80.
* Перенесіть 5 мл культури, щойно вирощеної в рідкому середовищі, у відповідну мітку пробірку, що містить 3 мм скляні кульки (використовуйте близько 6-10 кульок). (Примітка: Як варіант, менший об'єм 0,5-1,0 мл може бути використаний для полегшення гомогенізації та мінімізації скупчення). Закрийте пробірку.
* Енергійно прокручуйте протягом приблизно 1 хвилини для гомогенізації зразка.
* Залиште пробірку непорушеною на 30 хвилин, щоб великі скупчення бактерій осіли.
* Вийміть 1-2 мл з верхньої частини суспензії і перенесіть її в стерильну пробірку.
* Відрегулюйте помутніння суспензії до стандарту McFarland № 1. (Див. Додаток B для отримання інформації про стандарти помутніння McFarland.)

***2.2.5 Розведення суспензії та інокуляція середовища*** * Зробіть два розведення суспензії у стерильній воді або сольовому розчині: один 10–2 та один 10–4, як описано у пунктах нижче. Включення
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 0,01% Tween 80 (кінцева концентрація в середовищі) може зменшити скупчення.* Перенесіть 0,1 мл досліджуваного організму в пробірку з 9,9 мл розчинника і ретельно перемішайте. Отримана суспензія буде 10–2 розведенням вихідного зразка.
* Перенесіть 0,1 мл 10–2 суспензії в іншу пробірку з 9,9 мл розчинника і ретельно перемішайте. Отримана суспензія буде 10-4 розведенням вихідного зразка.
* Належним чином маркувати повторювані набори планшетів, що містять контрольне та протитуберкульозне тестове середовище, щоб вказувати концентрацію тестової інокуляції.
* Інокулюйте 0,1 мл розведення 10–2 на контрольний квадрант кожного планшету та на кожен із квадрантів, що містять протитуберкульозний препарат. Це можна зробити за допомогою стерильної скляної або пластикової піпетки Пастера для інокуляції кожного квадрата кожного планшету трьома чистими краплями суспензії. Слідкуйте за тим, щоб не торкатися поверхні агару кінчиком піпетки або бризками крапель у сусідні квадранти.
* Аналогічним способом нанесіть 0,1 мл розведення 10–4 на контрольний квадрант та на кожен із квадрантів, що містять протитуберкульозний препарат. Дайте планшетам постояти при кімнатній температурі поверхнею агару зверненою вгору, поки рідина не вбереться в агар.
* Запечатайте кожний планшет термоусадочним кільцем, проникним CO2, або помістіть у герметичний мішок, проникний СО2.

***2.2.6. Інкубація***Інкубіруйте планшети зі стороною агара зверненою вниз) при 37 ° C ± 1 ° C. Переконайтесь, що температура області в інкубаторі, де розміщені планшети, підтримує рекомендовану температуру. Захищайте від світла. Планшети можна додатково інкубувати в інкубаторі з атмосферою 5-10% СО2.***2.2.7 Огляд культур**** Огляньте планшети через 3-7 днів інкубації для оцінки забруднення. Відмовтеся від забруднених планшетів. При забрудненні, повторіть тест на чутливість.
 |  | * Через 21 день інкубації досліджуйте кожен квадрант за допомогою розсічувального мікроскопа. Для ізолятів, які, як відомо, ростуть повільно, або якщо на контрольному середовищі недостатній ріст, інкубаційний період може бути продовжений до 28 днів.
* Порахуйте або оцініть загальну кількість колоній (включаючи мікроколонії) у кожному квадранті для обох розведень і запишіть ці значення.

**Примітка:** Мікроколонії можуть представляти справжню стійкість (наприклад, повільно зростаючий стійкий штам), часткову стійкість (наприклад, штам із МІК, близький до випробуваної концентрації) або хибну стійкість (наприклад, через руйнування протитуберкульозного препарату протягом 3-4 тижнів інкубації). Персонал повинен інтерпретувати наявність мікроколоній з урахуванням минулого досвіду в лабораторії. Наприклад, якщо лабораторія зазвичай виявляє, що бактерії з мікроколонії на планшету, що містить протитуберкульозний препарат, можуть рости при посіві на свіже середовище, що містить препарат, мікроколонії, швидше за все, виникли зі стійких бактерій. З іншого боку, якщо такі бактерії зазвичай не вдається вирости, якщо їх висаджувати на свіже середовище, що містить протитуберкульозний препарат, мікроколонії, швидше за все, виникли з чутливих бактерій. Середовища, які зберігаються тривалий час, як правило, утворюють більше мікроколоній.Кількісно оцініть та повідомте про зростання, як показано в таблиці 8.***Таблиця 8 Кількісне визначення та повідомлення*** ***про ріст бактерій на культуральних планшетах*** |
|  | **Кількість колоній** | **Звіт** |
|  | 0-50 | Фактична кількість |
|  | 50-100 | 1+ (використовувати фактичну кількість) |
|  | 100-200 | 2+ (використовувати приблизну кількість) |
|  | 200-500 | 3+ |
|  | Злитий ріст | 4+ |
|  | ***2.2.8 Інтерпретація та звітування про результати***• Вивчіть зростання на контрольному середовищі.- Якщо на контрольному середовищі, засіяному 10–2 розведенням, присутнє менше 50 колоній, тест потрібно повторити через недостатню  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| інокуляцію. Це пояснюється тим, що кількість колоній на планшеті утворює пуассонівський розподіл, що відображає кількість колонієутворюючих одиниць на мілілітр при розведенні. Таким чином, ізоляти можуть виявлятись помилково чутливими через відсутність надійності у виявленні низьких порцій стійких бактерій у зразку менше 50 бактерій. Однак якщо на одному або декількох квадрантах, що містять протитуберкульозний препарат, є колонії, результати слід повідомити клініцисту під час повторного тестування, оскільки хибна стійкість навряд чи з’явиться через помилку вибірки.- Якщо приріст на контрольному середовищі, засіяному при розведенні 10–4, становить 3-4 +, це означає перенакулювання середовища; Необхідно бути обережним при тлумаченні цього результату, оскільки він може представляти появу природних стійких колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат (особливо на середовищі, інокульованому розведенням 10–2). Наявність великої кількості бактерій може знизити ефективну концентрацію протитуберкульозного препарату через механізми поглинання або деградації до точки, коли чутливі бактерії можуть рости, а це може призвести до хибної стійкості. У таких випадках ТМЧ слід повторити більш ретельно підготовленим свіжим інокулятом. З іншого боку, якщо на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, немає зростання, то ізолят вважається чутливим, і про результат можна повідомити.- При необхідності кількість колоній на контрольній середовищі, засіченій 10–4 розведенням, можна використовувати для обчислення кількості колоній на середовищі без протитуберкульозного препарату, інокульований при розведенні 10–2.* Обчисліть частку стійких колоній і виражте це у відсотках, виконуючи наведену нижче процедуру.
 |  | **Примітка:** наведені вище розрахунки стосуються кількості колоній на контрольному середовищі та середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, які були інокульовані з однаковим розведенням. Якщо для інокуляції контрольної середовища та середовища, що містять протитуберкульозний препарат, використовуються різні розведення, то для розрахунку застосуйте коефіцієнт розведення. Наприклад, якщо на середовищі є 80 колоній, що містять протитуберкульозний препарат, інокульований розведенням 10–2, і якщо на контрольному середовищі, інокульованому розведенням 10–4, є 75 колоній, то помножте 75 на 100 (це дає кількість колоній, очікуваних для розведення 10–2).Результат слід інтерпретувати як стійкий, коли частка приросту на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат, у зростанні на контрольному середовищі становить 1% або більше. Якщо стійкість менше 1%, то штам організму вважається чутливим. Результати слід повідомляти як стійкі або чутливі. Звіти можуть включати частку стійких колоній.**Заходи безпеки:** Кришки повинні бути закріплені на планшетах, а планшети- герметично закріплені у водопроникних мішках CO2. Переконайтесь у відсутності конденсату води, оскільки він може просочитися через поліетиленовий пакет і стати біонебезпечним.***2.2.9 Контроль якості***Контроль якості є надзвичайно важливим для ТМЧ взагалі та для ТМЧ для препаратів другої лінії зокрема. Слід впровадити кілька різних тестів з контролю якості; див. Додаток С для деталей. |
| Кількість колоній на середовищі, що містить протитуберкульозний препарат | **x** 100 |
| Кількість колоній на контрольному середовищі |

|  |
| --- |
| **3. Тест медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів з посівом на рідке поживне середовище** |
| Процедури, описані в цьому керівництві, призначені для використання з автоматизованою системою BACTEC МТІР 960. Це керівництво доповнює керівництво з МТІР, опубліковане Фондом інноваційної нової діагностики, яке доступне за адресою: [https://www.finddx.org/wp-content/ uploads/2016/02/mgit\_manual\_nov2006.pdf](https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf)**3.1 Принципи**Середовище МТІР складається з модифікованого бульйону Middlebrook 7H9. Для автоматизованої системи МТІР потрібен прилад під назвою BACTEC 960 (також доступні інші розміри). Пробірки в автоматизованій системі потребують 7,0 мл середовища. Для рутинної культури зразків від виробника випускається добавка для росту, відома як ОАДК (що складається з олеїнової кислоти, альбуміну, декстрози та каталази). Цю добавку для росту додають до середовища до інокуляції для заповнення середовища. Вона має важливе значення для росту багатьох видів мікобактерій, особливо тих, що належать до комплексу *M. tuberculosis*.Крім рідкого середовища Middlebrook 7H9, пробірка МТІР містить кисневий фторхром - трис (4,7-дифеніл-1,10-фенонтролін) рутенію хлориду пентагідрат - вбудований у силікон на дні пробірки. Під час росту бактерій у пробірці вільний кисень утилізується та замінюється СО2. Виснаження вільного кисню призводить до флуоресценції датчика всередині пробірки МТІР при візуалізації під ультрафіолетом. Інтенсивність флуоресценції прямо пропорційна ступеня виснаження кисню. Прилад BACTEC МТІР 960 автоматично виявляє цю флуоресценцію.Тестування на чутливість до препаратів другої лінії можна проводити за тим же принципом, що і для препаратів першої лінії29. Дві пробірки МТІР інокулюють досліджуваною культурою. Відома концентрація досліджуваного препарату додається до однієї з пробірок МТІР, і обидві пробірки інкубують. Зростання в пробірці, що містить препарат, порівнюється. |  |  з пробіркою МТІР без препарату (тобто контрольною пробіркою) Якщо досліджуваний препарат буде активним проти мікобактерій, він буде гальмувати ріст і, таким чином, відбуватиметься придушення флуоресценції, тоді як ріст в контрольній пробірці буде гальмуватися і флуоресценція збільшуватиметься.Зростання контролюється інструментом МТІР 960 і реєструється у значеннях, відомих як одиниці росту (ОР). У випадку з препаратами першої лінії прилад автоматично інтерпретує різницю значень ОР між контрольними пробірками та пробірками, що містять препарат; результати повідомляються як чутливі або стійкі. Значення ОР доступні для препаратів другої лінії або новіших, але користувач повинен інтерпретувати значення вручну.Принципи пропорційного методу використовувались для встановлення процедур ТМЧ як для препаратів першої, так і другої лінії. Для оцінки критеріїв 1%, інокулят контролю розводять у 100 разів порівняно з інокулятом для пробірки, що містить протитуберкульозний препарат. Зростання в пробірках, що містять протитуберкульозний препарат, порівнюється, коли зростання контрольної пробірки досягає заданого порогу, вираженого в ОР. Протокол тесту на чутливість BACTEC МТІР 960 зазвичай займає 4-13 днів як для препаратів першої, так і другої лінії. У деяких випадках може знадобитися продовжити інкубаційний період для деяких стійких до лікарських препаратів штамів, для росту яких може знадобитися більше 14 днів. ПЗА використовують протокол 21 день і для цього препарату використовується контроль росту 1:10 (КР).**3.2 Підготовка середовища*****3.2.1 Середовище***Препарат, що використовується в системі BACTEC МТІР 960, є модифікованим бульйоном Middlebrook 7H9; Потрібно 7 мл. Для ТМЧ одна контрольна пробірка потрібна як контрольна (тобто ця пробірка не містить протитуберкульозного препарату); для кожного препарату та концентрації, що підлягає випробуванню, додаткова пробірка |
| 29 Siddiqi SH, Rüs[ch-Gerdes S. *Керівництво з процедури МТІР.*. Женева, Фонд інноваційної діагностики, 2006.](https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf)  <https://www.fnddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf> |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| необхідна. Для розміщення пробірок у приладі також потрібні особливі носії ТМЧ; кількість необхідних носіїв залежить від кількості пробірок, які використовуються для ТМЧ.**Обладнання та матеріали для ТМЧ першої лінії**Комплект BACTEC МТІР 960 SIRE (кот. № 245123 BD, № GDF 106028) містить по одному ліофілізованому флакону стрептоміцину, ізоніазиду, рифампіцину та етамбутолу та 8 флаконів добавки SIRE. |  | Середовище МТІР є повним лише після додавання до середовища добавки для росту. Якщо добавка Becton Dickson SIRE недоступна, тоді можна використовувати добавку для росту BBL OADC (номер каталогу: 245116) в тому ж обсязі, що і добавка SIRE (тобто 500 мкл). Для піразинаміду ТМЧ використовуйте добавку піразинаміду (РЗА) ТМЧ.**3.3 Протитуберкульозні препарати та критичні концентрації для тестування** |
| Стрептоміцин | 332,0 мкг |  | Концентрації антимікробних препаратів, що використовуються для ТМЧ МТІР,були нещодавно переглянуті та підтверджені (див. Таблицю 3). 30 Критичні концентрації, визначені для певних препаратів другої лінії в середовищах МТІР, та процедури, що застосовуються для підготовки середовищ, що містять ці антимікробні препарати, наведені в *таблиці 11*.Випробовувати слід лише ті препарати другої лінії із встановленими критичними концентраціями з надійними та відтворюваними результатами.Критичні концентрації для нових та відновлених протитуберкульозних препаратів включають бедахілін, деламанід, лінезолід та клофазимін. Крім того, представлені переглянуті консенсусні критичні концентрації для фторхінолонів та амікацину. |
| Ізоніазид | 33,2 мкг |
| Рифампіцин | 332,0 мкг |
| Етамбутол | 1660,0 мкг |
| Розмістіть кожен препарат BACTEC МТІР SIRE на 4 мл стерильної дистильованої води для досягнення бажаної вихідної концентрації (Таблиця 6)Комплект BACTEC МТІР 960 ПЗА (кот. № 245128BD, № № GDF 106033) містить два ліофілізовані флакони піразинаміду та шість флаконів добавки ПЗА.Розмістіть кожен препарат BACTEC МТІР ПЗА з 2,5 мл стерильної дистильованої води для досягнення бажаної вихідної концентрації (Таблиця 9) |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 9. Об'єм відновлення та кінцеві концентрації для протитуберкульозних препаратів першої лінії*** |
| **Ліофілізований препарат** | **Доданий об’єм** | **Концентрація****відновлений препарат****мкг / мл** | **Об’єм додається до кожної пробірки МТІР** | **Кінцева концентрація в пробірках МТІР** |
| Ізоніазид | 4 мл | 8,3 | 100 | 1, мкг/ мл |
| Рифампіцин | 4 мл | 83 | 100 | 1, мкг/ мл |
| Етамбутол | 4 мл | 415 | 100 | 5,0 мкг/ мл |
| Піразинамід | 2,5 мл | 8000 | 100 | 100 мкг/ мл |

30 Технічний звіт про критичні концентрації для тесту мудикаментозної чутливості для препаратів, що застосовуються при лікуванні туберкульозу, стійкого до лікарських засобів. [Женева: World Health Organization;2018 (WHO/CDS](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf)/TB/2018.5) (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf> доступ 1 травня 2018 року).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **3.4 Приготування розчинів протитуберкульозних препаратів** ***3.4.1 Використання ліофілізованих препаратів***Обмежена кількість ліофілізованих протитуберкульозних препаратів доступна у виробника. Однак, коли вони стають доступними, слід дотримуватися процедур, наданих виробником, але важливо забезпечити, щоб кінцеві концентрації тестування були такими ж, як рекомендовані ВООЗ (табл. 10). |  | ***3.4.2 Використання чистих лікарських порошків***У таблиці 11 наведено огляд виробників, які надають чисті порошки. З метою приготування та стерилізації розчинів протитуберкульозного препарату проводять необхідні розведення таким чином, що при додаванні 0,1 мл (100 мкл) до 7 мл середовища МТІР бажана концентрація випробувань досягається виходячи з кількості середовища в мілілітрах. Вказівки щодо підготовки рекомендованих критичних концентрацій наведені в таблиці 12. |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 10. Об'єм відновлення та кінцеві концентрації для ліофілізу для протитуберкульозних препаратів другої лінії, доступних із BD*** |
| **Ліофілізований препарат** | **BD****каталог****№** | **GDF****каталог****№** | **флакон** | **Доданий об’єм** | **Концентрація****відновленого препарату мкг / мл** | **Об’єм****додано****до кожного****МТІР****пробірка** | **Кінцева концентрація в пробірках МТІР** |
| Моксифлоксацин | 215404 | 106585 | 249 | 3 млРозвести1:4 | 8320,75 | 100100 | 1,0 мкг / мл(ККТ)0,25 мкг / мл(КК) |
| Левофлоксацин | ТБД | ТБД | 249 | 3 мл | 83 | 100 | 1,0 мкг / мл |
|  Бедахілін a | 215406 | ТБД | 170 | 2 мл | 83 | 100 | 1,0 мкг / мл |
| Деламанід | Не застосовується | Не застосовується | - | - | - | - | 0,06 мкл / мл |
| Амікацин | 215350 | 106586 | 332 | 4 мл | 83 | 100 | 1,0 мкг / мл |
| Стрептоміцин b | 245123 | 106028 | 332 | 4 мл | 83 | 100 | 1,0 мкг / мл |
| Лінезолід | Не застосовується | Не застосовується | - | - | - | - | 1,0 мкг / мл |
| Клофазимін | Не застосовується | Не застосовується | - | - | - | - | 1,0 мкг / мл |
| A бедахілін на даний момент не доступний. Для бедахіліну для приготування вихідних розчинів, робочих розчинів та використовуваних кінцевих планшетів або пробірок слід використовувати тільки полістирол або скло. b Номери каталогів стрептоміцину відносяться до повного набору SIRE |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 11.  Наявність чистих порошків від GDF та інших виробників***  |
| **Препарат** | **Опис та інгредієнти** | **Каталог виробника №** | **GDF****Каталог****№** | **Кількість** | **Зберігання** |
| Левофлоксацин | >98/o ВЕРХ | Sigma- Aldrich (28266-IG) | 106560 | 1 г | 2-8C |
| Моксифлоксацин | Чиста субстанція | Sigma- Aldrich (32477-50MG) | 106314a | 50 мг | РТ |
| Бедаквілін | Фумарат бедаквілвна12 мг фурамату БДКсіль еквівалентна10 мг основи БДК | Доступнобезкоштовно: Програма реагентів НЦЗ СНІДу([https://www.aidsreagent.](https://www.aidsreagent.org/register.cfm)org/register.cfm) | Недоступно | 40 мг | 2-8C |
| Лінезолід | Чиста субстанція **>** 98% активність | (1) Sigma (PZ0014-5MG)(2) Caymen Chemical(CAS 65800-03-3) | Очікує розгляду | 5 мг 10 мг | РТ РТ |
| Клофазимін | Чиста субстанція | Sigma-Aldrich (C8895-1G) | Очікує розгляду | 1,0 г 2-8С |
| Деламанід | Чиста субстанція | Доступ:(1) MTA з Otsuka (обмежений доступ)(2) Adooq Bioscience([http://adooq.com/](http://adooq.com/delamanid.html)[delamanid.html](http://adooq.com/delamanid.html)) (A12864-10) | Недоступно | 10 мг | 2-8C |
| Амікацин | Амікацинова дисульфатна сільактивність: 674-786 мкгна мг (на основістрептоміцину) | Sigma-Aldrich (A1774-250MG) | 106318b | 250 мг | 2-8C |
| Стрептоміцин | Стрептоміцину сульфатАктивність **>** 720 мкг намг (на основістрептоміцину) | Sigma- Aldrich (S6501-5G) | 106311c | 5,0 г | 2-8C |
| aGDF каталог 1 грам МоксифоксацинуaGDF каталог 5 грам АмікацинуcGDF каталог дигідрострептоміцин |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 12. Концентрації та розчини, необхідні для приготування протитуберкульозних препаратів другої лінії для використання з системою BACTEC МТІР 960*** |
| **Кінцева концентрація протитуберкульозного препарату (мкг / мл)** | **Вихідний розчин і розчинник** | **Подальші розведення у стерильній****дистильованій воді (СДВ)****(ДМСО слід застосовувати для****клофазиміну та бедахіліну)** |
| Левофлоксацин (1,0) | * Розчинити 10 мг ЛФК у 2,5 мл стерильного 0,1 М NaOHa. – 4000 мкг/мл (Розчин A)
* Розвести 1 мл розчину A до кінцевого об'єму 5 мл СДВ (розчин B) 800 мкг / мл
 | Додати 1,05 мл розчину С до 8,95 мл СДВ b.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Моксифлоксацин (0,25) Критична концентрація | * Розчинити 10 мг МФК у 5 мл стерильного 0,1 М NaOHa. (2000 мкг / мл (розчин А)
* Розвести 1 мл розчину A до кінцевого об'єму 10 мл СДВ (розчин B)
* 200 мкг/ мл
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл СДВ b.**21 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Моксифлоксацин (1,0) Клінічна критична точка | * Розчинити 10 мг МФК у 2,5 мл стерильного 0,1 М NaOHa. 4000 мкг / мл (розчин А)
* Розвести 1 мл розчину A до кінцевого об'єму 5 мл СДВ (розчин B) 800 мкг / мл
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл СДВ b.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Бедахілін c (1,0) | * Розчинити 12 мг фумаратних солей БДХ (еквівалентно 10 мг основи БДХ) у 2,5 мл стерильного ДМСО. 4000 мкг / мл (розчин А)
* Розвести 1 мл розчину A до кінцевого об'єму 5 мл ДМСТО (розчин B) 800 мкг / мл
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл **ДМСО** **b**.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Лінезолід (1,0) | * Розчинити ЛЗД у 10 мл СДВ. 1000 мкг / мл (розчин А)
* Розвести 4 мл розчину A до кінцевого об'єму 5 мл СДВ . 800 мкг / мл (розчин B)
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл СДВ.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Клофазимін (1,0) | * Розчинити 10 мг клофазиміну у 2,5 стерільного ДМСО.
* (Розчин А - 4000 мкг/мл)
* Розвести 1 мл розчину A до кінцевого об'єму 5 мл ДМСО - 800 мкг/ мл (розчин B)
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл **ДМСО** d**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Кінцева концентрація протитуберкульозного препарату (мкг / мл)** | **Вихідний розчин і розчинник** | **Подальші розведення у стерильній****дистильованій воді (СДВ)****(ДМСО слід застосовувати для****клофазиміну та бедахіліну)** |
| Деламанід (0,06) | * Розчинити 10 мг ДЛМ у 2,5 стерільного ДМСО.
* Розвести стерильною водою до кінцевого об'єму 10 мл - 1000 мкг / мл (Розчин А)
* Розвести 1 мл розчину A з 9 мл СДВ (розчин B) 100 мкг / мл
 | Додати 0,5 мл розчину B до 9,5 мл СДВ.**5 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Амікацин (1,0) | * Припустима активність 0,71 (варіюється між партіями)
* Розчинити 140 мг амікацину у 10 мл стерильної дистильованої води - 10000 мкг/ мл (розчин A)
* Розвести 1 мл розчину A з 9 мл СДВ (розчин B) 1000 мкг / мл
* Розвести 4 мл розчину B до кінцевого об'єму 5 мл СДВ (розчин C)
* 800 мкг/ мл
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл СДВ.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |
| Стрептоміцин (1,0) | * Припустима активність 0,71 (варіюється між партіями)
* Розчинити 140 мг стрептоміцину у 10 мл стерильної дистильованої води - 10000 мкг/ мл (розчин A)
* Розвести 1 мл розчину A з 9 мл СДВ (розчин B) 1000 мкг / мл
* Розвести 4 мл розчину B до кінцевого об'єму 5 мл СДВ (розчин C) 800 мкг/мл
 | Додати 1,05 мл розчину B до 8,95 мл СДВ.**84 мкг/ мл (робочий розчин)** |

NaOH, гідроксид натрію.

a Використовуйте стерильну дистильовану воду.

b для 1М NaOH: розчинити 40 г NaOH в 1 л дистильованої або деіонізованої води (або розчинити 4,0 г в 10 мл); розвести до 1:10 для досягнення

Дозування 0,1 м.

c Для бедахіліну для приготування вихідних розчинів, робочих розчинів та використовуваних кінцевих планшетів або пробірок слід використовувати тільки полістирол або скло.

d Використовуйте ДМСО як розчинник для клофазиміну та бедахіліну замість дистильованої води, щоб уникнути осадів препарату

**Примітка:** Схема підготовки, показана в *таблиці 11*, може бути змінена за потребою. Однак остаточну концентрацію кожного протитуберкульозного препарату не слід змінювати.

Детальніше про зважування протитуберкульозних препаратів, обчислення їх активності та зберігання розчинів див. у Додатку D.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **3.5 Розрахунок коефіцієнта розведення для середовища МТІР** Коефіцієнта розведення для середовища МТІР розраховується наступним чином:7,0 мл середовища + 0,8 мл добавки SIRE + 0,5 мл інокуляту = 8,3 мл.Додайте 0,1 мл розчину з протитуберкульозним препаратом до 8,3 мл середовища: це дає розведення робочого розчину 1:84. Цей коефіцієнт розведення слід враховувати при підготовці робочого розчину протитуберкульозного препарату.**3.6 Додавання протитуберкульозного препарату до середовища** Щоб підготувати набір пробірок МТІР для ТМЧ, візьміть необхідну кількість пробірок МТІР і позначте кожну пробірку відповідною інформацією, яка визначатиме назву та концентрацію антимікробного препарату, який перевіряється, та ім’я пацієнта. Асептично додати 0,1 мл (100 мл) правильно розчиненого та розведеного розчину досліджуваного препарату у кожну марковану пробірку МТІР. Важливо завжди додавати досліджуваний розчин 0,1 мл за один раз і додавати правильну кількість кожного досліджуваного розчину в кожну пробірку. Будь-яке незначне коливання кількості доданої в пробірки може покращити результати.Використовуйте добре відкалібровану мікропіпетку, щоб зробити кожне додавання в пробірки. Один і той же наконечник мікропіпети може бути використаний для додавання одного і того ж досліджуваного розчину до декількох пробірок МТІР, але для кожного випробовуваного протитуберкульозного препарату слід використовувати окремий наконечник піпетки або мікропіпети.. Не додайте розчин протитуберкульозного препарату в пробірку для контролю росту. Після додавання розчину добре перемішайте.**3.7 Підготовка мікобактеріальної інокуляції** ТМЧ слід проводити з використанням лише культур, що свіжо вирощені у рідких та твердих середовищах. Зростання не повинно бути забруднене бактеріями або мікобактеріями, крім *М. tuberculosis* (тобто не повинно бути ніяких нетуберкульозних мікобактерій). Чистоту |  | культури можна перевірити, використовуючи штам *Ziehl – ​​Neelsen* для АФБ на позитивний ріст. Якщо є підозра на забруднення, нанесіть пробну суспензію на планшет з кров'яним агаром. Якщо кров’яний агар недоступний, використовуйте шоколадний агар або агар для інфузії мозку та серця. Інкубуйте при температурі 35 ° С ± 1 ° С протягом 48 годин і перевірте на ріст. Якщо з’являється ріст, суспензія забруднена, і тест на чутливість не слід проводити. Якщо на кров’яному агарі не спостерігається ріст, і суспензія інокуляту виглядає мутною, перевірте мазок Ziehl–Neelsen на наявність нетуберкульозних мікобактерій.Швидкі тести, як на молекулярній, так і на антигенній основі, можуть бути використані для остаточної диференціації *М. tuberculosis* від нетуберкульозних мікобактерій.31 Важливо встановити чистоту культури перед проведенням ТМЧ, особливо якщо є підозра на зараження.**Заходи безпеки:** Поводження з культурами, доповнення та маніпуляції слід проводити всередині БСК. Слід дотримуватися рекомендацій ВООЗ щодо цих процедур або встановлених національних рекомендацій. Використовувати належним чином стерилізовані та контрольовані якістю реагенти та асептичні методи впродовж усієї процедури ТМЧ.***3.7.1 Використання інокуляту з трубки МТІР***Важливо, щоб позитивна пробірка МТІР використовувалася для встановлення ТМЧ протягом рекомендованих часових рамок для позитивності, як описано нижче.* День позитивної пробірки МТІР, визначений інструментом, вважається Днем 0. Зростання ще не готове до ТМЧ.
* Пробірку потрібно інкубувати принаймні ще 1 день до використання ТМЧ (її можна інкубувати в інкубаторі при 37 ° С ± 1 ° С). Перший день починається після інкубації пробірки протягом 1 дня.
* Позитивну пробірку можна використовувати для ТМЧ до п’ятого дня після інкубації (тобто в день 1, 2, 3, 4 або 5). Пробірка, яка була позитивною більше 5 днів, повинна
 |

31 Впровадження діагностики туберкульозу: рамки політики. [Женева: World Health Organization; 20](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612_eng.pdf?ua=1&ua=1)15 [(WHO/HTM/TB/](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612_eng.pdf?ua=1&ua=1)2015.11; <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162712/1/9789241508612_eng>. pdf?ua=1&ua=1, доступ 10 жовтня 2018 року).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| бути субкультивирована у свіжу пробірку МТІР, яка була доповнена ростом добавки МТІР 960; Потім її слід інкубувати в інструменті, поки вона не стане позитивною. Цю пробірку можна використовувати з першого дня до 5 дня, як описано вище.* Якщо в пробірці в день 1 або 2 відбувся ріст, добре перемішайте пробірку, енергійно струшуючи або вихровуючи протягом 2–3 хвилин, щоб розбити будь-які скупчення. Залиште пробірку непорушеною приблизно на 5–10 хвилин, щоб більші скупчення осіли на дні. Ретельно збирайте супернатант (використовуючи стерильну піпетку для перенесення, розміщену трохи нижче поверхні рідини, в чистій стерильній ємності, і використовуйте нерозведений пробірки для пробірки з середовищем, що містить протитуберкульозний препарат. Якщо зростання відбувається на 3, 4 або 5 дні, добре перемішайте пробірку, щоб розбити скупчення, вручну або за допомогою вихрового змішувача.
* Залиште пробірку непорушеною на 5–10 хвилин, щоб більші скупчення осіли на дні.

**Примітка: Для піразинаміду залиште пробірку непорушеною протягом 15-20 хвилин.*** Перенесіть (використовуючи стерильну піпетку для перенесення трохи нижче поверхні рідини) 1,0 мл супернатанту в чисту стерильну ємність, що містить 4,0 мл стерильного сольового розчину, і добре перемішайте вміст. Використовуйте це розведення 1: 5 досліджуваної культури для інокуляції досліджуваної середовища в пробірках, що містять протитуберкульозний препарат.

***3.7.2 Використання інокуляту для росту в твердому середовищі*** Важливо використовувати свіжий ріст із твердого середовища, наприклад, нахил Левенштайна-Йенсена; зростання вважається свіжим, якщо його використовувати протягом 15 днів після появи на середовищі. Інокулят, зроблений за рахунок старшого росту, може призвести до ненадійних результатів.* Додайте 4 мл стерильного сольового розчину (0,85% хлориду натрію) у короткі скляні пляшки ємністю 15 мл із скляними кульками 2–3 мм (приблизно 8–10 кульок).
* Отримайте репрезентативну частину росту шляхом зішкрібання якомога більшої кількості колоній. Будьте обережні, щоб не зішкрібати будь-яке середовище, оскільки залишкове середовище дасть помилкові показання помутніння.
 |  | * Перенесіть наріст у пробірку за допомогою звичайного сольового розчину та скляних кульок. Міцно закрутить ковпачок і прокручуйте пробірку за допомогою вихору протягом 1-2 хвилин, щоб розірвати будь-які скупчення. Якщо вихору немає, ретельно перемішайте вручну, щоб гомогенізувати суспензію. Помутніння суспензії повинно бути більше, ніж стандарт McFarland № 1,0.
* Залиште суспензію непорушеною на 30 хвилин, щоб великі скупчення бактерій осіли.
* Використовуйте піпетку, щоб обережно перенести супернатант суспензії в іншу стерильну пробірку (обережно виділіть рідину трохи нижче поверхні рідини). Уникайте перенесення будь-якого росту, який осів на дно.
* Залиште пробірку непорушною протягом 15 хвилин.
* з допомогою піпетки обережно видалити супернатант, не порушуючи осад; перенесіть супернатант в іншу стерильну пробірку. Помутніння цієї суспензії повинно бути вище, ніж стандарт помутніння McFarland 0.5.
* Відрегулюйте помутніння цієї суспензії до стандарту McFarland 0.5, додавши стерильний сольовий розчин, і відрегулюйте, зробивши візуальне порівняння. Не знижуйте помутніння нижче цього стандарту. (Див. Додаток B для отримання інформації щодо підготовки стандартів McFarland)
* Розведену вищевказану суспензію до 1: 5 додайте 1,0 мл суспензії до 4,0 мл стерильного сольового розчину. Добре перемішайте і використовуйте в якості інокулята для пробірок із середовищем, що містить протитуберкульозний препарат.

**Заходи безпеки*** Переконайтесь, що культура, що випробовується, чиста і не містить мікобактерій або бактерій. Якщо є якісь сумніви, перевірте, зробивши мазок АФБ і проклавши петлю культури на планшеті з бактеріальним середовищем, наприклад, кров'яним агаром. Змішані культури  *M. tuberculosis* та інших мікобактерій або заражаючих бактерій дають помилку X, або помилковий результат, що демонструє стійкість.
* Завжди використовуйте свіжі культури. Старі культури можуть мати низьку життєздатність і можуть дати помилкові результати чутливості або інші помилкові результати.
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| * Суспензія для культури повинна бути добре диспергованою та однорідною. Інокулят з великими скупченнями може дати помилкові результати.
* Перевищена інокуляція може призвести до помилкових результатів стійкості або до помилки X400.
* Недостатня інокуляція може призвести до помилкових результатів стійкості або до помилки X200.

***3.7.3 Інокуляція та інкубація***Позначте кількість необхідних пробірок виходячи з кількості та концентрацій препаратів, які тестуються для кожної досліджуваної культури. Позначте одну пробірку як «контроль росту» (тобто без протитуберкульозного препарату) та одну на кожну концентрацію кожного досліджуваного препарату.***3.7.4 Додавання та інокуляція середовища МТІР*** Процедуру слід проводити наступним чином.* Асептично додайте 0,8 мл добавки BACTEC 960 SIRE або добавки BBL ОАДК у кожну з пробірок МТІР. Добре перемішайте.
* Асептично додайте 0,1 мл (100 мл) тестуваного протитуберкульозного препарату у відповідну мітку пробірки МТІР. Добре перемішайте.
* Останнім етапом має бути інокуляція досліджуваної культури. Асептично додайте 0,5 мл добре перемішаної суспензії (інокуляту) у кожну пробірку, що містить протитуберкульозний препарат. Не додайте інокулят в контрольну пробірку.
* Для контролю спочатку розведіть суспензію досліджуваної культури до 1: 100, додавши 0,1 мл суспензії досліджуваної культури до 10,0 мл стерильного сольового розчину.
* **Для ТМЧ ПЗА готують контроль росту 1:10 шляхом додавання 0,5 мл суспензії досліджуваної культури до 4,5 мл стерильного сольового розчину.**
* Добре перемішайте, перевернувши пробірку 5–6 разів або використовуючи вихровий змішувач. Додати 0,5 мл цієї розведеної суспензії в контрольну пробірку.
* Якщо складно виміряти 0,1 мл точно, зробіть два розведення в 10 разів, взявши 0,5 мл суспензії і додавши її до 4,5 мл
 |  | стерильного фізіологічного розчину. Кожне десятикратне розведення слід ретельно перемішати.* Міцно закрутить ковпачки на всіх пробірках і добре перемішайте інокульований бульйон, обережно перевернувши пробірку кілька разів.

**3.8. Носії ТМЧ** Покладіть інокульовані пробірки у відповідний носій. Першою пробіркою в носії завжди повинна бути контрольна пробірка (тобто пробірка, яка не містить протитуберкульозного препарату).Носії для пробірок, використовувані в системі BACTEC МТІР 960, доступні в описаних нижче конфігураціях.* 2 пробірки: це дозволяє випробувати одну концентрацію одного препарату; вона містить пробірку для протитуберкульозного препарату та контрольну пробірку.
* 3 пробірки: цей набір дозволяє випробувати два препарати або дві різні концентрації одного і того ж препарату разом з контрольною пробіркою.
* 4 пробірки: цей набір дозволяє випробувати три препарати або три різні концентрації одного і того ж препарату разом з контрольною пробіркою.
* 5 пробірки: цей набір дозволяє випробувати чотири препарати або чотири різні концентрації одного і того ж препарату разом з контрольною пробіркою.

***3.8.1 Введення носія ТМЧ в прилад МТІР*** Прилад BACTEC МТІ 960 підтримує постійну температуру 37 ° C ± 1 ° C всередині шафи, де розміщуються пробірки для інкубації.Для запуску тесту на чутливість штрих-код на носії сканується, а потім носій поміщається в прилад, використовуючи функцію введення для тесту на чутливість. (Детальнішу інформацію див. у керівництві користувача щодо пристрою та інструкціях щодо ТМЧ) Переконайтесь, що пробірки розміщені в правильному порядку на носі, дотримуючись інструкцій виробника.Програмне забезпечення запрограмоване для інтерпретації результатів лише для тих встановлених носіїв, які раніше були введені в прилад. Налаштування за замовчуванням, які зазвичай використовуються для тестування протитуберкульозних препаратів першої лінії, не застосовуються при |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| тестуванні препаратів другої лінії. Однак існує можливість ввести носій як такий, що містить невідомий препарат або «Не визначений препарат». У цьому випадку прилад контролюватиме зростання та значення ОР всіх пробірок у наборі. Після того, як ОР контролю досягає 400 ОР або більше, прилад припиняє тест і відмічає його як завершений, але не інтерпретує результати. Результати потрібно інтерпретувати вручну.Крім того, деякі користувачі вводять набори другої лінії як для препаратів SIRE, але кодують кожну пробірку, щоб вказати, який препарат він насправді містить; наприклад, замість стрептоміцину пробірка може фактично містити капреоміцин або замість ізоніазиду може бути використаний інший препарат. Коли тест буде завершений, прилад надасть роздруківку, інтерпретуючи результати так, ніби використовувались стрептоміцин та ізоніазид, але користувачеві потрібно буде розшифрувати роздруківку, вставивши правильну назву препарату. Такий підхід не рекомендується через ризик помилок транскрипції під час кодування чи декодування назви препаратів.**Заходи безпеки*** До приладу та принтеру МТІР 960 повинна постійно подаватися електроенергія. Якщо існує загроза перерви, резервне джерело електроенергії повинно мати можливість автоматично забезпечувати постачання електроенергії.
* Напруга має бути постійною і не повинна коливатися.

**3.9 Тривалість тестування** Коли носій набору ТМЧ вводиться як невідомий препарат, прилад постійно контролює тестовий набір. Протокол припиняється, коли контроль досягає 400 ОР або більше (протягом 4–13 днів). Після завершення тестування прилад вказує, що результати готові. Потім носій видаляється, його штрих-код сканується, а звіт друкується. У звіті будуть показані значення ОР для всіх пробірок у наборі, але не буде інтерпретовано результатів. Система управління даними мікробіології EpiCenter (Becton Dickson) може бути корисною для ТМЧ для препаратів другої лінії, включаючи допомогу в інтерпретації результатів та надання рекомендацій щодо збільшення періоду інкубації, якщо це необхідно. |  | **3.10 Інтерпретація та звітування про результати** Результати інтерпретуються так, як описано нижче.* **Стійкий:** штам описується як стійкий, коли значення ОР контролю досягає 400 або більше, а значення ОР в пробірці з досліджуваним препаратом становить 100 або більше.
* **Чутливий:** штам описується як чутливий, коли значення ОР для контролю досягає 400 або більше, а значення ОР в пробірці, що містить досліджуваний агент, становить менше 100.
* **помилки X:** повідомлення про помилку X вказує, що результати не визначені, коли виникають певні умови, які можуть вплинути на тест, такі як:

1. Помилка X400: ця помилка виникає, коли ОР контролю досягає 400 або більше менш ніж за 4 дні. Якщо це відбувається, прилад припиняє тестування. Ця помилка вказує на те, що досліджувана культура забруднена або перенаселена. У таких ситуаціях тест слід повторити з чистою, активно зростаючою і правильно розведеною культурою, яка підтверджена як комплекс *М. tuberculosis;*2. Помилка X200: ця помилка виникає, якщо в інокуляті міститься лише мала кількість життєздатних організмів. У цьому випадку контроль не досягне необхідної кількості ОР протягом 13 днів; це вказує на недостатню інокуляцію культури. Оскільки тривалість протоколу встановлена ​​13 днів, прилад припинить тестування в цей час. Переконайтесь, що використовується свіжа культура, що активно росте, і що суспензія була ретельно підготовлена.***3.10.1 Важливі міркування**** Коли BACTEC МТІР 960 вперше представлений в лабораторії, доцільно порівнювати результати МТІР 960 з результатами іншого методу ТМЧ, який вже використовується з твердими або рідкими середовищами. Також важливо при впровадженні нового тесту забезпечити відтворення результатів тесту. Відтворюваність обговорюється в Додатку С.
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Деякі стійкі штами ростуть дуже повільно в середовищі МТІР, і результатів можливо не досягти протягом 13 днів, використовуючи стандартний інокулят. У таких випадках, для досягнення результатів, що підлягають звітності, кількість використовуваного інокуляту слід збільшувати за рахунок зменшення розведення суспензії культури (наприклад, шляхом використання без розведення пробірки МТІР, які є позитивними на 2 або 3 день, або шляхом використання пробірки, які є позитивними на 4 або 5 день з розведенням 1: 2). Коли інтерпретація має стійкість, візуально перевіряйте середовище та переконайтесь, що досліджувана культура не забруднена (шукайте помутніння, після чого покладіть 1 краплю середовища на планшет з кров'яним агаром або на планшет з поживним агаром). Якщо культура тесту - нетуберкульозні мікобактерії або *M. tuberculosis*, але вона змішана або забруднена нетуберкульозними мікобактеріями або іншими бактеріями, то вона помилково може вважатися стійкою. Зробіть мазок Ziehl–Neelsen і знайдіть скупчення та вузол, характерні для туберкульозного комплексу.Якщо є несподівані результати або моностійкість до випробуваного препарату, найкраще перевірити чистоту інокулята та повторити ТМЧ за необхідності для перевірки стійкості. Доцільно включити експрес-тест для виявлення комплексу *М. tuberculosis*. Деякі швидкі тести дають результати протягом 15 хвилин (бічний зсув |  | тест на антиген) до декількох годин (молекулярні тести, зокрема АОЗ).Про результати потрібно повідомити, як тільки вони будуть доступні. Коли результати повідомляються, важливо включити використаний метод, перевірений препарат та його концентрацію. Загалом результати повідомляються як «Ч»(чутливий) або «С»(стійкий). Однак у деяких ситуаціях, наприклад, при тестуванні моксифлоксацину, препарат перевіряють у різних концентраціях для встановлення рівня стійкості. У таких випадках можливе повідомлення про чутливість у різних тестових концентраціях при інтерпретації «Ч» та низького рівня або високого рівня стійкості.**3.11 Контроль якості** Важливо періодично здійснювати контроль якості ТМЧ. Найкращою практикою є проведення штаму контролю якості з кожною випробуваною партією. *M. tuberculosis* H37Rv можна використовувати для контролю якості, оскільки він чутливий до всіх протитуберкульозних препаратів. Це може бути корисно включати випробування стійкого штаму в кожній партії, навіть якщо штам є високостійким, що може дозволити виявити основні помилки при приготуванні вихідних лікарських розчинів. Детальну інформацію про тестування та перевірку контролю якості див. у додатку С. |

|  |
| --- |
| **4. Додатки** |
| **Додаток А. Зберігання вихідних культур** Усі клінічні ізоляти та референтні штами мікобактерій, що використовуються для контролю якості, повинні зберігатися в умовах, що зберігають їх життєздатність та специфічні характеристики штаму. Щоб уникнути серійного субкультирування, що може призвести до генетичного дрейфи та зміни фенотипних характеристик штамів, доцільно зберігати аликвоти культур одноразового використання в кріопробірках при - 70 ° C; вони можуть зберігатися протягом 10-12 років або довше. Життєздатність туберкульозних бацил знижується набагато швидше при –20 ° С, ніж при –70 ° С. Важливо також зазначити, що важка бактеріальна суспензія підтримує життєздатність довше. Для відродження заморожених культур, особливо тих, що зберігалися тривалий час, важливо субкультурувати в дуже багатому середовищі. Як правило, рідке середовище підтримує відродження краще, ніж тверде середовище. Суспензії штамів, які використовуються для контролю якості, слід зберігати при температурі –70 ° C та використовувати протягом 1 року. Через 1 рік життєздатність може знизитися.**1. Обладнання та матеріали, необхідні для зберігання вихідних культур**Для зберігання вихідних культур необхідне наступне обладнання:* кріопробірки з кришкою з різьбою (тобто із зовнішнім різьбою на корпусі пробірки);
* морозильна камера, яка може підтримувати температуру щонайменше від -20 ° C або -60 ° C до -70 ° C; краща температура для зберігання становить -70 ° C;
* один із таких середовищ суспензії:

а) збагачений АДК бульйон Middlebrook 7H9, приготований відповідно до інструкцій виробника;б) 10% знежиреного молока, автоклавоване при 110 ° С протягом 10 хвилин;в) 5% гліцерину в 0,85% розчині хлориду натрію, автоклавували при 110 ° С протягом 10 хвилин.**2. Процедура*** Використовуйте лише культури, що свіжо вирощені на твердих середовищах або рідких середовищах. Якщо культура старше 3 тижнів, субкультуру проводять на свіжому нахилі, і інкубують при 37 ° С. Як тільки
 |  | * з’являється як хороший ріст, використовуйте цю культуру для приготування суспензії.
* Вишкребіть якомога більше колоній з твердого середовища та зробіть однорідну суспензію, використовуючи один із згаданих вище середовищ. Асептично перенесіть приблизно 1,5 мл у декілька 2 мл кріопробірок. Якщо кріопробірки не доступні, можна використовувати пробірки Еппендорфа 1,5 мл.
* Щойно вирощена культура МТІР також може бути використана для перенесення в кріопробірки для замороженого зберігання. Міцно закрутить ковпачки, позначте пробірки з датою приготування та інформацією про культуру. Перенесіть підготовлені кріопробірки у відповідний контейнер для зберігання (наприклад, крібокс), який потім передають у морозильну камеру для тривалого зберігання.
* Зберігайте записи про вироблені культури та дати їх заморожування.

**Додаток B. Стандарти помутніння Макфарленда** Вже готові стандарти помутніння Макфарленда можуть бути доступні у продажу.Якщо комерційні стандарти відсутні, дотримуйтесь описаної нижче процедури.* Приготуйте у воді 1% розчин хімічно чистої сірчаної кислоти, повільно додаючи 1,0 мл сірчаної кислоти до 99,0 мл води. ОБЕРЕЖНО: Завжди додавайте сірчану кислоту у воду.
* Приготуйте у воді 1% розчин хімічно чистого хлориду барію, додавши 1 г хлориду барію до 100 мл води.
* Змішайте 1,0 мл розчину хлориду барію з 99,0 мл розчину сірчаної кислоти в чистій, правильно промитій колбі. Добре перемішайте і перекладіть в 1 або 2 чисті пробірки.
* Ущільнюйте пробірки скотчем або воском. Ця пробірка дорівнює стандарту Макфарланда № 1.
* Додайте 0,5 мл розчину хлориду барію до 99,5 мл сірчаної кислоти або 5 мл води до 5 мл добре змішаної суспензії стандарту Макфарленда № 1. Ущільнюйте пробірку. Це дасть стандарт Макфарленда 0,5.
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| * Точні вимірювання мають вирішальне значення для досягнення працездатних стандартів Макфарланда. Порівнюючи помутніння суспензії на культуру із стандартом Макфарланда, переконайтесь, що і стандарт Макфарланда, і випробувальна суспензія були добре струшені. Використовуйте один і той же тип і розмір пробірки як для тесту, так і для стандарту Макфарланда.
 |  | У таблиці 1 наведено інформацію про різні кількості хлориду барію (BaCl2) та сірчаної кислоти (H2SO4), необхідних для досягнення норм помутніння Макфарланда для використання з іншими бактеріями, крім мікобактерій, та їх співвідношення з кількістю бактерій на мілілітр. Кількість мікобактерій (тобто кількість колонієутворюючих одиниць) буде відрізнятися для *M. tuberculosis*, оскільки *М. tuberculosis* утворює скупчення, а на помутніння впливає розмір і форма бактерій. |

|  |
| --- |
| ***Таблиця 1.* Кількість хлориду барію та сірчаної кислоти, необхідних для досягнення різних норм помутніння Макфарланда та їх співвідношення з кількістю E*scherichia coli*  на мілілітр суспензії** |
| **Номер стандарту помутніння Макфарланда** | **Об’єм (мл)** | **Кількість****бактерій /мл****(x 108)** |
| **BaCl2****(1% концентрація)** | **H2SO4****(1% концентрація)** |
| 0,5 | 0,5 | 99,5 | 1,5 |
| 1 | 1,0 | 99,0 | 3 |
| 2 | 2,0 | 98,0 | 6 |
| 3 | 3,0 | 97,0 | 9 |
| 4 | 4,0 | 96,0 | 12 |
| 5 | 5,0 | 95,0 | 15 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Додаток C. Тестування контролю якості** Штам контрою якості: *M. tuberculosis* H37Rv (Американська колекція типових культур 27294) рекомендується використовувати для тестування контролю якості.Якщо еталонного штаму американської колекції типів культури неможливо отримати, замість цього може бути використаний добре охарактеризований штам, отриманий із ізоляту пацієнта, повністю сприйнятливого до протитуберкульозних препаратів першої лінії. Переважно використовувати штам, який був повністю секвенсований і показав, що має дикий тип для всіх відомих генів, асоційованих із стійкістю до туберкульозу.Після виготовлення стандартизованої суспензії її слід заморожувати при температурі -70 ° С ± 10 ° С. Він може зберігатися до 1 року без істотного зниження життєздатності. |  | **1. Підготовка мікобактеріальної суспензії** * Субкультура еталонного штаму на декількох нахилах Левенштайна-Йенсена.
* Інкубуйте нахили при 37 ° С ± 1 ° С.
* Візуально спостерігайте за ростом. Зростання має з’явитися протягом 10-15 днів після субкультури. Як тільки буде хороший, злитий і чистий ріст, використовуйте його для виготовлення суспензії. Зріст слід використовувати якомога швидше (тобто протягом 10-15 днів). Старіші культури не дають достовірних результатів.
* Видаліть наріст з нахилу, обережно вичісуючи колонії стерильною петлею або стерильним шпателем, виготовленим з дерев’яних паличок аплікатора. Будьте вкрай обережні, щоб не зішкрібати жодне культуральне середовище, яке дасть помилкові виміри помутніння.
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| * Перенесіть в пробірку А, стерильну скляну пробірку з кришкою з різьбою, що містить 4 мл стерильного бульйону Middlebrook 7H9 та скляні кульки 1-2 мм (приблизно 6-10 кульок); скляні кульки допоможуть розбити будь-які скупчення. Також можна використовувати стерильну звичайну сольову або стерильну деіонізовану воду.
* Прокручуйте пробірку близько 1-2 хвилин. Переконайтесь, що суспензія добре диспергована і має помутніння більше, ніж стандарт Макфарланда № 1.
* Залиште суспензія непорушною протягом 30 хвилин.
* За допомогою піпетки обережно перенесіть супернатант в **пробірку В**, іншу стерильну скляну пробірку з кришкою з різьбою. Уникайте перенесення осаду. Ця підвіска повинна мати більш високу помутніння, ніж стандарт Макфарланда № 1.
* Залиште **пробірку B** непорушною протягом 15 хвилин.
* обережно перенесіть супернатант з пробірки В в пробірку С, іншу стерильну скляну пробірку з кришкою з різьбою; уникайте перенесення осаду.
* візуально відрегулюйте помутніння суспензії в пробірці C до стандарту помутніння Макфарланда № 1,0 або 0,5, залежно від того, що потрібно, додаючи бульйон Middlebrook 7H9, стерильний сольовий розчин або деіонізовану воду; добре перемішати. Якщо суспензія занадто мутна, перенесіть частину суспензії в іншу стерильну пробірку і відрегулюйте помутніння. Це буде робоча підвіска для тестування контролю якості. Цю суспензію можна заморожувати невеликими аликвотами (1-2 мл) у відповідних пробірках або флаконах при –70 ° C ± 10 ° C. Заморожену суспензію можна використовувати до 1 року. Після відтавання не заморожувати.

**2. Валідація процедури тестування**Кожного разу, коли в лабораторію буде запроваджено нову процедуру - наприклад, проведення ТМЧ з використанням рідкого середовища для протитуберкульозних препаратів першої чи другої ліній - важливо встановити, що нова процедура дає надійні результати; також важливо встановити, що результати відповідають результатам, отриманим за допомогою іншого методу, який уже добре встановлений і ретельно перевірений в лабораторії. Описана |  |  нижче процедура рекомендується для тестування валідації.**2.1 Процедура*****2.1.1 Порівняння нового методу з усталеним методом***Виберіть 10–15 культур, одна з яких повинна бути H37Rv. Культури слід вибирати з клінічних ізолятів, деякі з яких є повністю чутливими до всіх протитуберкульозних препаратів, а деякі з них, як відомо, стійкі до препаратів другої лінії, які тестуються. Якщо присутні культури з наднаціональної регіональної лабораторії, використовувані в останній раунд, використовуйте їх замість лабораторних ізолятів, оскільки ці культури будуть перевірені декількома лабораторіями, а судові результати вже будуть встановлені та будуть доступні.Якщо інформація про стійкість до збудників другої лінії відсутня, виберіть культури у пацієнтів, хвороба яких була стійкою до ізоніазиду, рифампіцину та, можливо, інших препаратів першої та другої лінії.Підготуйте свіжі субкультури, як описано раніше. Дотримуючись рекомендованих стандартних методик для ТМЧ, використовуйте вибрані культури для підтвердження тестування препаратів другої лінії. Випробуйте культури за допомогою нової процедури, а також за допомогою встановленої лабораторією процедури ТМЧ для препаратів другої лінії.Випробування з використанням еталонного методу та нового методу слід встановлювати одночасно з використанням тієї ж суспензії культури.Концентрації препаратів, використовуваних у тестах, повинні бути такими, які рекомендуються для кожної процедури; концентрація тесту може змінюватися залежно від того, яка процедура використовується.***2.1.2 Очікувані результати***Якщо ви порівнюєте результати ТМЧ за двома методами, а результати виявляються невідповідними, тест слід повторити, використовуючи обидва способи одночасно.Між результатами, отриманими за новим методом, та результатами, отриманими за встановленим методом (еталонним методом), повинно бути більше 90% згоди  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| (бажано 95%). Штам контролю якості (H37Rv) повинен бути випробуваний разом з кожною партією зразків і повинен виявляти повну чутливість до всіх досліджуваних препаратів.Якщо лабораторія не має встановленого еталонного методу, тоді валідація може бути проведена шляхом порівняння результатів нового випробування з результатами попереднього ТМЧ, отриманих з інших джерел для того ж агента. У цьому випадку можлива сувора перевірка на відтворюваність; процедура тестування на відтворюваність описана в наступному розділі.Результати ТМЧ повинні бути здатні чітко розмежовувати чутливі та стійкі штами, а також повинні допомогти лікарям призначити більш ефективну протитуберкульозну терапію.**3. Тестування на відтворюваність**Важливо встановити, що результати, отримані при тестуванні за допомогою нової процедури, можуть бути відтвореними - тобто про той самий результат буде повідомлено, якщо тест повторити кілька разів. Цей вид тестування встановлює відтворюваність тестової процедури, виконаної певним фахівцем. Якщо більш ніж один технік в лабораторії виконує ТМЧ, важливо встановити, що немає різниць у техніках, якими користуються різні фахівці.**3.1 Процедура**Виберіть приблизно 5-7 культур, одна з яких повинна бути H37Rv, 2-3 з яких повинні бути чутливими, а 2-3 з них повинні бути стійкими до перевірених препаратів.Налаштуйте тест на чутливість принаймні п'ять разів на всіх культурах.Повторне тестування слід робити в різні дні.Стандартні процедури, викладені в цьому керівництві, повинні дотримуватися ТМЧ для всіх культур, тобто тестування повинно проводитися на всіх культурах в одній партії в абсолютно однакових умовах і використовувати однакові процедури для всіх тестувань.Стандартизовані заморожені суспензії можуть використовуватися для повторного тестування, але бажано робити суспензію свіжої культури кожен раз, щоб також  |  | оцінити відтворюваність суспензійного препарату. Для ТМЧ з використанням рідких середовищ слід використовувати свіжий ріст середовища МТІР, як описано (див. Розділ 3).**3.2 Очікувані результати**Результати всіх повторних тестів культури повинні бути повністю узгоджені; якщо вони є, то процедури можна відтворити в лабораторії, яка проводила тести. Якщо в повторному тестуванні є якась невідповідність, то в процедурах є різні варіанти, і слід вжити коригуючих заходів. Якщо ТМЧ виконується більш ніж одним фахівцем в лабораторії, відтворюваність серед техніків повинна бути оцінена з метою досягнення повної згоди результатів.**Додаток D. Приготування та зберігання розчинів протитуберкульозних препаратів** Всі антимікробні препарати аналізують на стандартні одиниці активності; вони можуть відрізнятися від препарату до препарату, і від партії до партії. Таким чином, лабораторія повинна стандартизувати свої антимікробні розчини, використовуючи інформацію, надану виробником чи постачальником, та активність антимікробного порошку у партіях, які використовуються.Значення активності зазвичай постачається виробником і повинно бути включене в сертифікат аналізу; аналізи зазвичай проводяться за допомогою високоефективного рідинної хроматографії (ВЕРХ) та базуються на вмісті води (наприклад, за оцінкою за допомогою аналізу Карла Фішера або втраті ваги при висушуванні) та фракції солі / протиіонного іона (якщо з'єднання подається у вигляді солі замість вільної кислоти або основи). Потужність може бути виражена у відсотках або в одиницях мкг / мг (мас / мас). Якщо сертифікат не включений, спробуйте отримати необхідну інформацію від виробника. Якщо інформації про активність немає, її потрібно обчислити, проаналізуйте вміст води та визначте, чи представлений агент у формі солі, наприклад, фосфату, сульфату чи гідрохлориду. Ці фактори необхідно враховувати при визначенні активності. Інформацію завжди краще отримати від виробника чи постачальника, якщо активність не задана, або якщо якесь значення |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  невідоме або не може бути чітко визначено з сертифіката.Антимікробний порошок повинен бути зважений на аналітичному балансі, який був відкалібрований. Доцільно точно зважити антимікробний препарат, а потім розчинити з'єднання у невеликому об'ємі відповідного розчинника (стерильна дистильована вода, ДМСО або NaOH) до коригування стерильною водою (або ДМСО для бедахіліну та клофазиміну), необхідних для отримання кінцевої концентрації.Розчини слід стерилізувати за допомогою мембранного фільтра (Примітка: фільтрація не рекомендується для бедахіліну) (наприклад, нітрат целюлози або змішаний ефір целюлози, що містить нітрат і ацетат) з розміром пор 0,22 мкм. Фільтри з паперу, азбесту або спеченого скла, які можуть поглинати значну кількість певних протитуберкульозних препаратів, не повинні використовуватися. Перші 10–15% відфільтрованого розчину необхідно викинути, оскільки спочатку деякі препарати можуть бути адсорбовані у фільтрі.**Розрахунки**Щоб обчислити необхідну кількість порошку, спочатку знайдіть питому активність препарату; потім включіть коефіцієнт активності до загальної зваженої суми.Наприклад, якби активність протитуберкульозного препарату становила 740 мкг / мг, коефіцієнт зважування становить:1000 мкг / 740 мкг = 1,35.Використовуйте одну з наступних формул для зважування кількості протитуберкульозного препарату в заданому обсязі розчинника, необхідного для досягнення бажаного вихідного розчину.Вага (мг) = |  | Зважте 22,9 мг препарату, використовуючи аналітичний баланс.Додайте порошок в колбу і добре перемішайте.Припустимо, ви чомусь зважите іншу кількість препарату, скажімо, 23,2 мг. У цьому випадку вам потрібно буде визначити об'єм розчинника, необхідного для отримання 415 мкг / мл, використовуючи формулу, показану нижче. |
|  | Об'єм (мл) = | Вага (мг) **х** Потужність (мкг / мг) |
|  | Концентрація (мкг / мл) |
|  | Для 23,2 мг препарату з активністю 904 мкг / мг, що потребує 415 мкг / мл вихідного розчину:23,2 × 904/415 = 50,5 мл розчинника.Для додаткової інформації див. *Тест на чутливість до мікобактерій, нокардій та аеробних актиноміцетів: затверджений стандарт.***Примітка:** Якщо ліофілізовані препарати доступні з комерційного джерела для ТМЧ для препаратів другої лінії, дотримуйтесь рекомендацій виробника.**Зберігання вихідних розчинів протитуберкульозних препаратів**Невеликі обсяги стерильних вихідних розчинів антимікробних препаратів слід розподіляти у стерильні поліпропіленові або поліетиленові флакони, що підходять для зберігання при низькій температурі, наприклад, кріопробірки; флакони слід ретельно герметизувати, маркувати, датувати та зберігати. Розчини протитуберкульозних препаратів слід заморожувати, бажано при температурі –70 ° С ± 10 ° С. Замерзання при температурі –20 ° С також прийнятне.Стійкість залежить від препаратів при різних температурах. Більшість вихідних розчинів препаратів можуть зберігатися при 70 ° С ± 10 ° С до 1 року (або до первинного терміну придатності, якщо це відбудеться до 1 року), не втрачаючи жодної значної активності. Агенти, що зберігаються при –20 ° C, можуть бути дещо менш стабільними; при цій температурі вони можуть зберігатися до 6 місяців (лише 3 місяці для бедахіліну a або до початкового терміну придатності. Краще зберігати більш концентровані розчини, ніж розведені розчини.Заморожені розчини слід розморожувати до кімнатної температури і негайно використовувати. Вони не повинні бути заморожені. Залишки слід викинути.A особисте спілкування: Leen Rigouts, ITM, Антверпен, Бельгія |
|  | Об'єм (мл) **х** Концентрація (мкг / мл) |  |
|  | Активність (мкг / мг) |  |
| Для засобу з активністю 904 мкг / мг, що вимагає 415 мкг / мл вихідного розчину в 50 мл розчинника: |  |
| 50 **x** 415 | = 22,9 мг препарату. |  |
| 904 |  |
| Фактична процедура приготування вихідного розчину 415 мкг / мл в 50 мл розчинника наведена нижче.У 100 мл колбу додають 50 мл розчинника. |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Важливі міркування**Зберігайте чисті препарати в прохолодному, сухому місці, бажано в ексикаторі, і холодильнику.Використовуйте лише чисту форму препаратів. Домішки призведуть до ненадійних результатів.Перевірте активність препарату та обчисліть загальну масу необхідного препарату, враховуючи фактично активний компонент препарату. Розрахунки кількості препарату, який слід зважити, можуть відрізнятися, оскільки активність препаратів змінюється від партії до партії.Зважуйте препарат (принаймні 2000 мкг) надзвичайно обережно, використовуючи надійний і калібрований високоякісний аналітичний баланс, відповідний для зважування невеликих кількостей.Перемішайте розчин, що містить препарат, надзвичайно ретельно та переконайтесь, що препарат повністю розчинилося перед його фільтруванням чи подальшим розведенням. |  | Усі препарати слід простерилізувати на фільтрі. Використовуйте полікарбонатний фільтр, щоб мінімізувати втрати препарату, викликані поглинанням у фільтр. Якщо фільтри з полікарбонату недоступні та потрібно використовувати інший вид, відкиньте перші 10-15% відфільтрованих розчинів, а решту розчину збирайте для використання.Якщо використовується самостерилізуючий розчин або водний вихідний розчин, всі подальші розведення слід проводити у воді, використовуючи стерильну воду та асептичні методи.Додайте в середовище точну кількість вихідного розчину.Слідкуйте за терміном придатності кожного засобу та розчину. Не використовуйте препарат після закінчення строку придатності.Запишіть використані ваги та зроблені розрахунки та розведення. |

За додатковою інформацією звертайтесь:

**Глобальна програма проти туберкульозу**

Всесвітня організація охорони здоров'я

Avenue Appia 20, CH-1211

Женева-27, Швейцарія

Інформаційно-ресурсний центр CDS / GTB:

Ел. пошта: tbdocs@who.int

Веб-сайт: [www.who.int/tb](http://www.who.int/tb)

