BACTEC MGIT 960

Организация рабочего процесса. Преаналитический этап исследования

BD

BACTEC MGIT 960

Бактериологическая лаборатория должна иметь лицензию на право работы с возбудителями инфекционных заболеваний III-IV групп патогенности,

BD

Меры безопасности.

- К работе с инфекционным материалом допускаются только квалифицированные лабораторные работники.
- При работе инфекционным материалом необходимо использовать средства индивидуальной защиты;
- Все манипуляции с диагностическим материалом должны выполняться в ламинарном боксе II класса защиты, в стерильных условиях;
- В работе должна использоваться центрифуга с антиаэрозольной защитой;
- По окончании работы рабочие помещения, использованная посуда и оборудование, а также отработанный диагностический материал подвергаются дез. обработке.

BD

Перечень дополнительного оборудования и расходных материалов

- Бокс биологической безопасности II-класса защиты
- Антиаэрозольная центрифуга
- Паровой стерилизатор (автоклав)
- Автоматические пипетки с переменным объемом 200 мкл, 1000 мкл, 5000 мкл или степпер
- Вортекс
- Центрифужная пробирка объемом 50 мл
- Пипетка Пастера стерильная градуированная 1-3,5 мл
- Стекло предметное

BD

Виды диагностического материала

- Мокрота, отделяемое верхних дыхательных путей, полученное после аэрозольных ингаляций, промывные воды бронхов
- Все виды материала, получаемого при бронхоскопии
- Экссудаты
- отделяемое ран и свищей
- Промывные воды желудка (преимущественно у детей)
- Спинномозговая жидкость
- операционный материал (без примеси крови)

ИССЛЕДОВАНИЮ НЕ ПОДЛЕЖИТ КРОВЬ И МОЧА!

BD

ПРАВИЛА ЗАБОРА МАТЕРИАЛА НА ИССЛЕДОВАНИЕ

Доставка диагностического материала

- Доставляется диагностический материал в сопровождении специально обученного медицинского работника (если это не возможно, необходимо обучить водителя).
- В лабораторию диагностический материал доставляется в специальных контейнерах (желательно термоконтейнерах)
- Необходимо иметь 2 контейнера (1 оставляется в лаборатории с пробами, 2-забирается после дез.обработки)

Никогда не пользуйтесь одним контейнером для доставки, т.к. время экспозиции для дез.обработки не менее 20 минут

- Помимо направления на всю партию диагностического материала оформляется сопроводительный лист (2 экземпляра)
- Сопроводительные документы (направления, сопроводительный лист) доставляются отдельно от проб

BD

Доставка диагностического материала

Доставленный диагностический материал принимает лабораторный работник, учитываются следующие параметры:

- целостность доставленных флаконов
- Количество, согласно сопроводительному листу
- Наличие всех подписей
- Правильность заполнения направлений

После чего, лаборант расписывается в сопроводительном листе, один экземпляр которого передает ответственному за доставку

При нарушении одного из параметров доставки материал исследованию не подлежит!

BD

Критерии направления больных на культуральное исследование МБТ с использованием жидких питательных сред и прибора BACTEC MGIT 960.

- Впервые выявленные больные туберкулезом (до начала химиотерапии).
- Дифференциально-диагностические больные (если необходимо).
- Больные с распространенным и остропрогрессирующим процессом.
- При рецидивах туберкулеза (до начала химиотерапии).
- При менингитах и других формах внелегочного туберкулеза (начала химиотерапии).
- При необходимости для контроля химиотерапии.

BD

Доставка диагностического материала

Собранный диагностический материал необходимо в течении двух часов доставить в бактериологическую лабораторию!

Если это невозможно:

- Мокроту и ПБВ можно хранить при t +4-6*С до двух суток
- Требовательный к хранению материал (эксудаты, спинномозговая жидкость) может сохраняться при t +4-6*С до 8 часов

Замораживать диагностический материал перед доставкой не рекомендуется, т.к. требуется быстрая заморозка при t -25-30*С и размораживать материал разрешается только 1 раз

BD

BACTEC MGIT 960

Этапы исследования

1. Пробоподготовка
2. Посев
3. Микроскопия мазков из осадка
4. Оценка результатов культивирования
5. Постановка теста на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам.

В среднем длительность 1 исследования при положительном результате 15-18 дней, максимальный протокол при отрицательном результате 42 дня

BD

BACTEC MGIT 960

Деконтаминация
(NALC-NaOH)

ДНК-диагностика
(2 - 4 ч)

Микроскопия
(1 ч)

Культивирование

Жидкие среды
(1-2 нед)

Плотные среды
(3-4 нед)

Идентификация

ДНК-диагностика
(2 – 4 ч)

Биохимические методы
(3-4 нед)

Определение чувствительности к АБ

Жидкие среды
(до 4 – 14 дней)

Плотные среды
(21 день)

Отчет

BD

BACTEC MGIT 960

ПРОБОПОДГОТОВКА

Пробоподготовка с использованием пробирки FALCON

BD

ПРОБОПОДГОТОВКА

Цель:

Выделить максимальное количество микобактерий.

Основные этапы пробоподготовки:

1. Деконтаминация
2. Концентрация
3. Нейтрализация

Важно:

- строго следовать рекомендациям BD в отношении процедуры деконтаминации
- Уровень контаминации, рекомендуемый CDC - 5%

BD

ПРОБОПОДГОТОВКА

Для обеспечения оптимальной производительности труда, соблюдения всех рекомендуемых параметров и предотвращения кросс-контаминации образцов рекомендуется одновременная обработка не более 10 образцов

BD

Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories

U.S. Department of Health and Human Services
Public Health Service

Centers for Disease Control
and Prevention

and

National Institutes of Health

Fourth Edition
April 1999

U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE
WASHINGTON: 1999

ПРОБОПОДГОТОВКА

Необходимые реактивы и расходные материалы:

- Пробирка полипропиленовая с завинчивающейся крышкой стерильная 50 мл (типа FALCON);
- Пипетка Пастера одноразовая, стерильная 3,5-5 мл;
- Емкость с дез.раствором для жидких инфицированных отходов;
- Контейнер для отработанных пробирок;
- Стерильный раствор BBL MycoPrep (раствор N-ацетил-цистеина с гидроксидом натрия и цитратом натрия);
- BBL MycoPrep Phosphate Buffer (Фосфатный буфер), стерилизованный и охлажденный заранее;

Необходимое оборудование:

- Ламинарный бокс II-класса защиты
- Антиаэрозольная центрифуга с охлаждением (ускорение не менее 3000 G)
- Вортекс
- Таймер

BD

BBL MycoPrep
Набор для деконтаминации образцов

NALC-NaOH = N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide

240862 — **10 x 75-мл раствора NALC-NaOH и 5 пакетов фосфатного буфера (pH 6.8)**

240863 — **10 x 150-мл раствора NALC-NaOH и 10 пакетов фосфатного буфера (pH 6.8)**

Раствор NaOH-цитрата

NALC ампула (2 - в 150 мл)

ПРОБОПОДГОТОВКА

Подготовительный этап:

1. Приготовление фосфатного буфера: растворить 1 пакет солевой основы в 0,5 л д. воды, разлить во флаконы, автоклавировать при 1 атм. (121*С) 15 мин., охладить, хранить при 4-8*С 7-10 дней
2. Подготовка раствора BBL MycoPrep:

Разбить ампулу, находящуюся внутри бутылки.

Тщательно перемешать. Использовать в течение 24 ч.

BBL MycoPrep – УДОБСТВО и ЭКОНОМИЧНОСТЬ

Преимущества

Стабильность раствора в течение 24 ч

В наборе содержится фосфатный буфер

Хранение пр комнатной температуре

Выгоды

Позволяет избежать сложностей, связанных с взвешиванием, перемешиванием

Экономия времени, безопасность персонала.

BD

Приготовление раствора NALC-NaOH или MycoPrep

NAOH-NaLC

- растворить 29 г. цитрата натрия в 1 л д. воды (раствор А)
- 40 g NaOH растворить в 1 л холодной воды (раствор В)
- Разлить во флаконы необходимым объемом (100-150 мл)
- Стерилизовать при 1 атм. (121 °С, 15 мин)
- Взвесить NALC в требуемом количестве (0,5 г на 100 мл готового р-ра NaOH-цитрат натрия)
- Перемешать равные количества раствора А и В
- Добавить NALC в раствор NaOH
- Перемешать
- Использовать в течение 24 ч

BBL MycoPrep

- Разбить ампулу NALC в бутылке с содержанием раствора NAOH
- Перемешать
- Использовать в течение 24 ч

BD

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ NaOH

- NaOH используется с целью разжижения и деконтаминации исследуемых материалов
- Конечная концентрация щелочи (гидроксида натрия) в образце должна составлять 1%
- Не рекомендуется использование NaOH в концентрации более 2% с целью деконтаминации, так как это может оказаться токсичным для ряда микобактерий.

ВАЖНО!

Для предотвращения перекрестной контаминации при работе в ламинарном боксе может быть открыта только одна пробирка с образцом!

BD

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ

- В каждой пробирке - 5-7 мл образца, если больше, то необходимо разделить его на 2 пробирки

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ

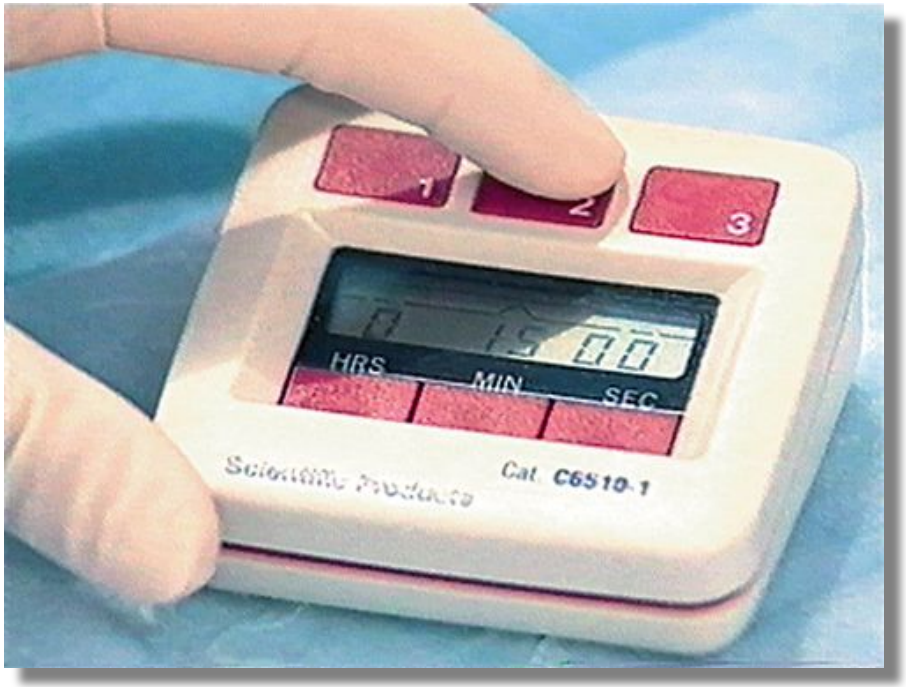
❷ Добавить равное количество (10 мл) <u>свежеприготовленного раствора</u> NALC-NaOH в пробирку с образцом и закрыть ее

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ

❸ Смешать содержимое пробирки с помощью Vortex в течение≈ 20 сек, <u>но не более</u> 30 сек (риск разрушить NaLC), можно перемешать содержимое пробирки вручную

BD

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ



❹ Оставить образец на 15 мин при комнатной температуре

BD

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ

- Добавить стерильный фосфатный буфер до 50 мл.
- Закрыть пробирку и осторожно перемешать содержимое.

Концентрация

- ❻ Поместить образцы в центрифугу на 15 мин при 3000 *g*

BD

Концентрация

- После центрифугирования необходимо вылить из пробирки всю жидкость. Исследуемый образец останется на дне пробирки (1-3 мл)

Нейтрализация

- Добавить 0.5-2 мл стерильного фосфатного буфера конечная pH образца 6,8 – 7.

Нейтрализация

❸ Ресуспендировать осадок, использовать суспензию для посева на жидкие и плотные среды, а также для приготовления мазка.

Пробоподготовка

Полученный материал необходимо использовать в следующем порядке:

1) посев в пробирки MGIT;
2) посев на плотные питательные среды;
3) приготовление мазков.

Если материал не используется немедленно, он должен быть заморожен при -20 С.

Материал рекомендуется сохранять по меньшей мере в течение 1-2 недель, так как он может понадобиться для повторного посева в случае контаминации.

BD