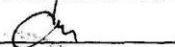


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

«14» ~~августа~~ 2017 г.



Регистрационный № 022-0417

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПЛЕВРИТОВ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ:

Котович Дмитрий Светославович, д.м.н. Скрыгина Елена Михайловна,
Лобик Валентина Ивановна.

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
14.04.2017
Регистрационный № 022-0417

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПЛЕВРИТОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ: Д.С. Котович, д-р мед. наук Е.М. Скрягина, В.И. Лобик

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики туберкулезных плевритов, основанный на использовании молекулярно-генетического метода микробиологической диагностики туберкулеза GeneXpert MTB/Rif. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику плеврального выпота у пациентов с высоким риском наличия туберкулеза. Метод заключается в молекулярно-генетическом исследовании ткани биопсийного материала (пораженных участков париетальной плевры) и быстрого определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (далее — МБТ).

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров, врачей-онкологов, врачей-хирургов, врачей-патологоанатомов, врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с плевральным выпотом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

- бокс биологической безопасности (далее — БББ) II класса;
- система GeneXpert Dx;
- встряхиватель лабораторный (шейкер);
- центрифуга лабораторная 3000g с охлаждением, с герметично закрывающимися центрифужными стаканами, препятствующими образованию аэрозоля;
- таймер;
- холодильник, позволяющий поддерживать температуру от +2 до +6°C.

Материалы:

- пипетки пластиковые стерильные одноразовые;
- пробирки центрифужные 50 мл типа «фалькон» из полипропилена высокой плотности с завинчивающейся крышкой, с «юбкой», конические градуированные стерильные;
- штативы для пробирок центрифужных;
- пипетки Пастера пластиковые градуированные, 3 мл, стерильные;
- контейнер с воронкой для слива надосадочной жидкости;
- пакеты для автоклавирования одноразовые;
- ступка фарфоровая с пестиком;
- песок стерильный;
- пинцет;
- салфетки из нетканого материала;
- средство дезинфицирующее с туберкулоцидным эффектом;
- картриджи с реагентами к системе GeneXpert Dx;
- одноразовые перчатки без талька;
- респиратор;

- халат хирургический одноразовый;
- маркер перманентный.

Реагенты и химические вещества:

Реагент	Условия хранения
Картридж Xpert MTB/RIF	Комнатная температура
Sample Reagent (SR)	Комнатная температура
Раствор NaOH-натрия цитрат стерильный	В темноте, комнатная температура, не более 1 недели
Буфер фосфатный, 0,067 М/л, pH = 6,8 стерильный	От +2 до +8°C, не более 1 недели

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клинико-рентгенологическая симптоматика, проявляющаяся наличием плеврального выпота, требующая дифференциальной диагностики туберкулезного плеврита и других заболеваний, сопровождающихся развитием плеврального выпота.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Соответствуют таковым для применения метода и включают противопоказания для проведения видеоассистированной торакокопии (далее — ВАТС) с биопсией легкого.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1 этап — ВАТС, прицельная биопсия париетальной плевры.

2 этап — молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани биопсийного материала париетальной плевры, позволяющее обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину.

Этап 2 проводится в бактериологической лаборатории.

ВАТС, прицельная биопсия париетальной плевры

1. При клинико-рентгенологической симптоматике, проявляющейся наличием плеврального выпота, требующей дифференциальной диагностики туберкулезного плеврита и других заболеваний, сопровождающихся развитием плеврального выпота, выполняется ВАТС с прицельной биопсией пораженных участков париетальной плевры.

2. Образец ткани площадью не менее 2 см² доставляется в микробиологическую лабораторию в стерильном контейнере для молекулярно-генетического исследования, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину.

Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани биопсийного материала плевры

1. Образцы биопсийного материала извлекаются из контейнера с помощью пинцета.

2. Образец ткани гомогенизируется в стерильной фарфоровой ступке с помощью пестика, с добавлением небольшого количества стерильного песка.

3. К образцу гомогенизированной ткани добавляется равный объем 4% раствора NaOH и выдерживается экспозиция в течение 15–23 мин.

4. Убедиться, что крышка пробирки плотно закручена. Содержимое пробирки тщательно перемешивается, переворачивая ее несколько раз.

5. После звукового сигнала таймера пробирка помещается в штатив, добавляется в фосфатный буфер до объема 50 мл.

6. Внутри БББ пробирка помещается в центрифужный стакан, крышки стаканов плотно закручиваются. При необходимости уравнивания используются пробирки «фалькон» с водой или этиловым спиртом.

7. Центрифужные стаканы устанавливаются в центрифугу.

8. Убедиться, что на центрифуге выставлены значения 3700 rpm (об./мин) (rcf 3000 g), температура +5°C, время — 15 мин.

9. Пробирки центрифугируются при 3000 g в течение 15 мин.

10. Центрифужные стаканы открываются только внутри БББ. Пробирка с образцом извлекается, помещается в штатив. Открытие пробирки осуществляется спустя 5 мин после осаждения аэрозоля.

11. После открытия пробирки надосадочная жидкость осторожно удаляется в контейнер с воронкой, содержащий дезинфицирующее средство, не оставляя в пробирке ничего, кроме осадка. Необходимо убедиться, что осадок не был потерян во время сливания. Крышка пробирки плотно закрывается.

12. Если в процессе сливания надосадочной жидкости произошла контаминация внешней поверхности пробирки, ее необходимо протереть салфеткой, смоченной в дезинфицирующем средстве.

13. Добавляется не более 2 мл фосфатного буфера;

14. Открывается крышка контейнера с образцом, пипеткой измеряется объем образца.

15. Пипеткой добавляется к образцу SR в соотношении 2:1 (2 части SR к 1 части образца).

16. После плотного закрытия контейнера крышкой, энергично встряхивается 10–20 раз (одно движение назад и вперед является одним встряхиванием) или встряхивается на вортексе в течение по крайней мере 10 с.

17. Образец инкубируется в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем энергично встряхивается 10–20 раз или встряхивается на вортексе в течение по крайней мере 10 с.

18. Образец дополнительно инкубируется при комнатной температуре в течение 5 мин.

19. Тест следует начинать не позднее чем через 4 ч после внесения образца в картридж.

20. Картридж маркируется номером образца на боковой стенке картриджа. Не допускается постановка меток на крышке картриджа и нарушение 2D штрих-кода на картридже.

21. Далее открывается крышка картриджа, затем контейнер с образцом.

22. При помощи входящей в набор пипетки разжиженный образец набирается до отметки на пипетке. Если объем образца недостаточный, он не может быть использован для анализа.

23. 2 мл образца помещается в камеру картриджа для образца.

24. Картридж загружается в прибор для проведения молекулярно-генетического исследования в полном соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

25. Учет и интерпретация результата.

Продолжительность молекулярно-генетического исследования гомогената ткани легкого, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину, составляет менее 2-х ч.

Возможно получение следующих результатов молекулярно-генетического исследования гомогената ткани легкого:

- отрицательный результат: ДНК МБТ не обнаружена;
- положительный результат: ДНК МБТ обнаружена с устойчивостью к рифампицину (Rif +) (маркер множественно лекарственно устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ) или без устойчивости к рифампицину (Rif -).

Если исследование образца ткани не может быть проведено в день получения пробы в контейнер с образцом необходимо добавить равное по объему количество (не менее 1 мл) стерильного физиологического раствора, чтобы предотвратить высыхание ткани. Хранить материал в таком виде возможно не более 48 ч в холодильнике при температуре от +2 до +6°C.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

После диагностической ВАТС могут возникнуть следующие осложнения (до 4% случаев):

- замедленное расправление легкого (более 3-х сут);
- экссудативный плеврит;
- ограниченный пневмоторакс;
- внутриплевральное кровотечение.

Возможные ошибочные результаты

Ошибочные результаты при дифференциальной диагностике туберкулезного плеврита и плеврального выпота вследствие других заболеваний могут быть получены при нарушении условий взятия тканевого материала (не соблюдение стерильных условий), при неинформативности биоптата из-за «погрешности» и неадекватного забора материала.

Хранить биопсийный и операционный материал следует при температуре от +2 до +6°C в течение 1–2 дней. Транспортировка материала должна производиться в течение 1–2 ч в стерильном контейнере.

Указание мер безопасности

Использование бактериологических и молекулярно-генетических методов включает гомогенизацию, деконтаминацию и концентрацию ткани биопсийного либо резекционного материала легкого. Гомогенизация ткани легкого представляет потенциальный риск образования инфекционного аэрозоля, содержащего МБТ, что ведет к риску инфицирования, возможной перекрестной контаминации образцов и к ложноположительному результату. Первичная обработка биопсийного или резекционного материала должна проводиться

в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности: обязательное использование боксов биологической безопасности II класса, респираторов, перчаток, медицинских халатов в соответствии Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.03.2013 № 377).