

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Е.Л.Богдан

«26» *августа* 2020 г.

Регистрационный № 052-0620

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ БЕЗ БАКТЕРИОВЫДЕЛЕНИЯ НА
ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ГИСТОЛОГИЧЕСКОМ
БИОМАТЕРИАЛЕ ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ**
инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д.м.н. Скрягина Е.М., д.м.н., профессор Суркова Л.К., к.м.н.,
доцент Дюсьмикеева М.И., к.м.н., доцент Яцкевич Н.В., Николенко Е.Н.,
Залуцкая О.М.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра

_____ Е. Л. Богдан
26.08.2020
Регистрационный № 052-0620

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ БЕЗ БАКТЕРИОВЫДЕЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ В ГИСТОЛОГИЧЕСКОМ БИОМАТЕРИАЛЕ
ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук Е. М. Скрягина, д-р мед. наук, проф. Л. К. Суркова, канд.
мед. наук, доц. М. И. Дюсьмикеева, канд. мед. наук, доц. Н. В. Яцкевич,
Е. Н. Николенко, О. М. Залуцкая

Минск 2020

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм дифференциальной диагностики туберкулеза легких без бактериовыделения, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику туберкулеза легких, и заключается в проведении молекулярно-генетических исследований гистологического биоматериала парафиновых блоков, полученного при диагностической видеоторакоскопии (ВТС) и/или торакотомии, на основе определения возбудителя туберкулеза и его лекарственной чувствительности к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС).

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-фтизиатров, иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с туберкулезом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Изделия медицинской техники

1. Автоматизированная система для быстрой одновременной детекции генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)) микобактерий туберкулеза и устойчивости микобактерий к рифампицину.
2. Оборудование для гибридизации ДНК на стрипах с ДНК зондами.
3. Амплификатор в реальном времени с многоканальным лазером.
4. ПЦР-бокс (ПЦР — полимеразная цепная реакция).
5. Вортекс, шейкер, центрифуга на 10 000 об/мин и более.
6. Термошейкер для гибридизации и инкубации одновременно 12 ДНК стрипов для молекулярно-генетических исследований.
7. Водяная баня.
8. Холодильник, морозильная камера.
9. Весы аналитические точностью 0,01-0,1 мг.
10. Ультрафиолетовый облучатель.
11. Автоклав.
12. Вытяжной шкаф.
13. Твердотельный термостат.
14. Бокс биологической безопасности класса II тип А2.
15. Центрифуга на 3000g с антиаэрозольной защитой.

Расходные материалы.

1. Картриджи к автоматизированной системе для быстрой одновременной детекции ДНК микобактерий туберкулеза и устойчивости микобактерий к рифампицину.
2. Тест-системы для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности микобактерий туберкулеза к рифампицину, изониазиду, аминогликозидам/циклопептидам, фторхинолонам методом гибридизации с ДНК зондами.
3. Тест-системы для молекулярно-генетической идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида и определения их чувствительности к макролидам и аминогликозидам.

4. Стерильный изотонический раствор хлорида натрия, 4 %-й раствор серной кислоты, осаждающая суспензия, применяемая для молекулярно-генетических исследований, N-ацетил – L-цистеин с гидроокисью натрия (NaLC-NaOH).

5. Фосфатный буфер.

6. Наконечники одноразовые пластиковые объемом 0,5-250, 200-1000 мкл с аэрозольным барьером и без него.

7. Стерильные пробирки; стерильные контейнеры; дозаторы переменного объема на 0,5-10, 5-50, 20-200, 200-1000 мкл; стерильные пробирки; микропробирки для ПЦР – 200 мкл с индивидуальными крышками; пробирки центрифужные пластиковые типа «фалькон» – 15 мл.

8. Стерильные контейнеры.

9. Дозаторы переменного объема на 0,5-10, 5-50, 20-200, 200-1000 мкл.

10. Одноразовые перчатки без талька.

11. Халат хирургический одноразовый.

12. Респиратор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Заболевания и патологические состояния, характеризующиеся наличием клинико-рентгенологических и гистологических проявлений при исследовании свежих биоптатов ткани легких, требующих проведения дифференциальной диагностики туберкулеза и других заболеваний легких, при отсутствии возбудителя туберкулеза в мокроте и в свежих биоптатах ткани легкого, полученных при ВТС и/или торакотомии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап I. Выделение ДНК микобактерий туберкулеза из парафиновых блоков с гистологическим биоматериалом

1. Парафиновый блок на нескольких слоях фильтровальной бумаги помещают на 8–18 ч (на ночь) в термостат при температуре 65 °С.

2. Остатки парафина из биологического материала удаляют проводкой через ксилол: две смены ксилола по 30 мин в термостате при температуре 37 °С.

3. Остатки ксилола удаляют этанолом: две смены 96 %-го этанола по 10 мин; две смены 70 %-го этанола по 10 мин.

4. Полученный биоматериал промывают дистиллированной водой: две смены воды по 5–7 мин.

Этап II. Проведение быстрой одновременной детекции ДНК микобактерий туберкулеза и устойчивости микобактерий к рифампицину, выделенных из гистологического биоматериала депарафинизированных блоков

1. Гистологический биоматериал депарафинизированных блоков измельчается с помощью стерильного скальпеля или ножниц и пинцета.

2. К образцу добавляется 0,5–1,0 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия и при необходимости 2–3 г стерильного песка.

3. Образец гомогенизируется в стерильной фарфоровой ступке или в гомогенизаторе тканей.

4. Часть полученной гомогенной суспензии образца гистологического биоматериала переносится в коническую пробирку на 50 мл.

Полученная гомогенная суспензия (не более 10 мл) подвергается обработке NaCl-NaOH в соотношении 1:1 для разжижения пробы, ее деконтаминации, гомогенизации и концентрации при центрифугировании при 3000g в течение 15 мин для получения осадка. Из осадка готовят мазок для окраски по Цилю – Нильсену. Осуществляют окрашивание и исследование мазка.

Ресуспендированный в 3 мл фосфатного буфера осадок разделяют на 3 аликвоты (по 1,0 мл) для молекулярно-генетических исследований.

5. Картридж к автоматизированной системе для быстрой одновременной детекции ДНК микобактерий туберкулеза и устойчивости микобактерий к рифампицину маркируется в соответствии с номером исследуемого образца гистологического биоматериала.

6. В коническую пробирку с завинчивающимся колпачком переносится 0,7 мл гомогенизированного образца гистологического биоматериала.

Необходимо избегать переноса кусочков гистологического биоматериала, которые не были гомогенизированы.

7. Двойной объем (1,4 мл) реагента, используемого для деконтаминации и разжижения исследуемого образца при молекулярно-генетического исследования, позволяющего обнаружить ДНК микобактерий туберкулеза и определить устойчивость микобактерий к рифампицину, переносится в пробирку, содержащую 0,7 мл гомогенизированного гистологического биоматериала.

8. Пробирка интенсивно встряхивается 10–20 раз или перемешивается на вортексе в течение не менее 10 с.

9. Образец инкубируется 10 мин при комнатной температуре и затем вновь интенсивно встряхивается 10–20 раз или перемешивается на вортексе в течение не менее 10 с.

10. Образец инкубируется при комнатной температуре в течение 5 мин.

11. В картридж переносится 2 мл обработанного образца.

12. Картридж загружается в автоматизированную систему для молекулярно-генетического исследования в полном соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

13. Учет и интерпретация результата.

Продолжительность молекулярно-генетического исследования гомогената гистологического биоматериала, позволяющего обнаружить ДНК микобактерий туберкулеза и определить устойчивость микобактерий к рифампицину, составляет менее 2-х ч.

Возможно получение следующих результатов молекулярно-генетического исследования гомогената биоматериала депарафинизированных блоков:

Отрицательный результат: ДНК микобактерий туберкулеза не обнаружена.

Положительный результат:

а) ДНК микобактерий туберкулеза обнаружена с устойчивостью к рифампицину (Rif+) (маркер множественно лекарственно устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ));

б) ДНК микобактерий туберкулеза обнаружена без устойчивости к рифампицину (Rif-).

Этап III. Проведение гибридизации с ДНК зондами с использованием тест-систем, позволяющих определить устойчивость микобактерий туберкулеза к ПТЛС первого и второго ряда, выделенных из гистологического биоматериала депарафинизированных блоков

В случае выявления ДНК микобактерий туберкулеза, чувствительных к рифампицину по результатам второго этапа, вторая аликвота (этап II, п. 4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим определить устойчивость микобактерий туберкулеза к ПТЛС первого ряда для выявления микобактерий, устойчивых к изониазиду.

В случае выявления микобактерий туберкулеза, устойчивых к рифампицину по результатам этапа II, вторая аликвота (этап II, п. 4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим определить устойчивость микобактерий туберкулеза к ПТЛС второго ряда в соответствии с инструкцией производителя.

В случае, когда ДНК микобактерий туберкулеза не выявлена, вторая аликвота (этап II, п. 4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим провести идентификацию нетуберкулезных микобактерий до вида.

При выявлении ДНК нетуберкулезных микобактерий третья аликвота (этап II, п. 4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим определить устойчивость нетуберкулезных микобактерий к макролидам и аминогликозидам.

Если исследование гистологического биоматериала депарафинизированных блоков не может быть проведено в день получения биоматериала хранить материал в таком виде возможно не более 72 ч в холодильнике при температуре 4 ± 2 °С.

В случае выявления в биоматериале парафиновых блоков ДНК микобактерий туберкулеза устанавливается диагноз туберкулез легких, проводятся молекулярно-генетические исследования, позволяющие установить лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза к рифампицину и ПТЛС первого и второго ряда.

В случае выявления в биоматериале парафиновых блоков нетуберкулезных микобактерий устанавливается диагноз микобактериоз легких, проводится молекулярно-генетическое исследование методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим определить устойчивость нетуберкулезных микобактерий к макролидам и аминогликозидам и после чего назначается соответствующая схема терапии.

При отсутствии выявления в биоматериале парафиновых блоков микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий диагноза туберкулез

и микобактериоз легких исключаются, проводится дальнейшее дообследование пациента.

По результатам быстрых молекулярно-генетических методов, позволяющих установить лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза к рифампицину (маркер МЛУ-ТБ) и ПТЛС первого и второго ряда, определяется модель лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибочные результаты при диагностике туберкулеза могут быть обусловлены сложностью интерпретации полос гибридизации в случаях редких мутаций и при смешанной популяции микроорганизмов и получены при несоблюдении протоколов исследования, использовании тест-систем, картриджей и реактивов с истекшим сроком годности и хранившихся с несоблюдением температурного режима.

Необходимо точно следовать инструкции к используемому набору реагентов, не использовать реактивы после окончания срока годности и соблюдать условия их хранения.

С целью минимизации риска ДНК-контаминации образцов ампликонами (продукты ПЦР предыдущих реакций) требуется проведение комплекса мер, включающих тщательную уборку помещений, чистку всех рабочих поверхностей и оборудования, однонаправленное движение материала и персонала.

Указание мер безопасности

При проведении гомогенизации, центрифугирования, последующего выделения ДНК микобактерий туберкулеза необходимо соблюдение процедур безопасности. Все работы следует проводить в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности: обязательное использование вытяжного шкафа, боксов биологической безопасности класса II типа А2, респираторов, перчаток, медицинских халатов (в соответствии с «Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза» (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.03.2013 № 377)).