

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь

Е. Н. Кроткова

«24» 11 2022 г.

Регистрационный №073-0622



АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЦИЛИАРНЫХ ДИСКИНЕЗИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доцент Бобровничай В.И.,
канд. биол. наук, доцент Рубаник Л.В., канд. биол. наук
Асташонок А.Н., Петрученя А.В., Колюпанова Т.Б., д-р. мед. наук,
профессор Полещук Н.Н.

Минск, 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Е. Н. Кроткова

24.11.2022

Регистрационный № 073-0622

**АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЦИЛИАРНЫХ
ДИСКИНЕЗИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В. И. Бобровничай, канд. биол. наук, доце. Л. В. Рубаник, канд. биол. наук А. Н. Асташонок, А. В. Петрученя, Т. Б. Колюпанова, д-р. мед. наук, проф. Н. Н. Полещук

Минск 2022

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкции) изложен алгоритм, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику первичной цилиарной дискинезии (коды МКБ-10: Q33.8, Q89.3, J98.0) с болезнями наследственной (кистозный фиброз (код МКБ-10: E84), отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (коды МКБ-10: D80-D83), бронхиальная астма (код МКБ-10: J45) и др.), врожденной (врожденные аномалии [пороки развития] органов дыхания (коды МКБ-10: Q30-Q34), врожденные аномалии [пороки развития] системы кровообращения (коды МКБ-10: Q20-Q21), и др.) или приобретенной (бронхоэктазия (код МКБ-10: J47) и др.) природы с вторичной цилиарной дискинезией.

Инструкция предназначена для врачей-педиатров, врачей-пульмонологов, врачей-оториноларингологов, врачей общей практики, врачей функциональной диагностики, врачей-лаборантов, врачей клинической лабораторной диагностики и других специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим рецидивирующими или хроническими заболеваниями дыхательной системы.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Изделия медицинской техники:

световой микроскоп;

атомно-силовой микроскоп;

электронный микроскоп;

бронхоскоп;

ультрамикротом, обеспечивающий получение ультратонких и полутонких срезов толщиной 30-100 нм;

стеклянные или алмазные ножи для ультрамикротома;

прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов;

термостат суховоздушный с диапазоном регулируемых температур (37-60° С) и точностью $\pm 0,4$ °С;

холодильник бытовой электрический;

весы лабораторные общего назначения 1 или 2-го класса точности;

дозаторы пипеточные механические переменного объема, комплект (1-10; 2-20; 20-200; 200-1000 мкл).

Изделия медицинского назначения:

лабораторная посуда (колбы, мерные цилиндры, чашки Петри);

полипропиленовые пробирки типа «эппендорф» вместимостью 1,5 см³;

капсулы или специальные контейнеры для заливки образцов в смолу;

цитологическая щетка (Зонд Юнона);

предметные стекла;

сеточки (гриды) для электронной микроскопии, на 200 квадратных ячеек, медные;

наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;

штативы для пробирок;

фильтровальная бумага;
 перчатки хирургические резиновые.
 Реактивы:
 краситель Романовского-Гимза для световой микроскопии;
 спирт этиловый различной концентрации (30; 50; 70; 96; 100°);
 фосфатно-солевой буфер (рН 7,2-7,4) или какодилатный буфер (рН 7,3-7,4);
 реактивы для фиксации образцов (2,5 % глутаровый альдегид, 1–2 % тетраоксид осмия);
 специальные смолы для заливки образцов;
 другие химические реактивы (ацетон, натрия гидроксид, кислота соляная, хлороформ);
 формвар (0,5–1 %) для приготовления специальной пленки на электронно-микроскопических сеточках;
 красители для электронной микроскопии: уранилацетат, цитрат свинца.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие у пациента клинико-anamnestических данных: круглогодичный, торпидный к лечению ринит, рецидивирующий или хронический экссудативный отит и/или синусит, рецидивирующий или хронический бронхит, бронхоэктазы с раннего детского возраста, полное или неполное обратное расположение внутренних органов, братьев и сестер пациента с первичной цилиарной дискинезией (далее — ПЦД), особенно если у них есть респираторные симптомы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Отнесение пациента к группе риска по первичной цилиарной дискинезии

Учитывается характерный семейный анамнез, клиническая картина и оценка по предиктивной шкале PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule) (таблица 1), включающая в себя 7 вопросов, каждому из которых присвоено определенное количество баллов.

Таблица 1 — Предиктивная клиническая шкала-опросник для установления клинически вероятной первичной цилиарной дискинезии

Вопрос	Ответ	Балл
Родился пациент доношенным или недоношенным?	Доношенный	2
Были ли у пациента респираторные симптомы в раннем неонатальном периоде (тахипноэ, кашель, пневмония)?	Да	2
Был ли пациент госпитализирован в отделение интенсивной терапии недоношенных?	Да	2
Имеется ли у пациента аномальное расположение внутренних органов (<i>situs inversus</i> или гетеротаксия)?	Да	4
Имеется ли у пациента врожденный дефект сердца?	Да	2
Имеется ли у пациента круглогодичный ринит?	Да	1

Продолжение таблицы 1

Вопрос	Ответ	Балл
Имеются ли у пациента хронические симптомы со стороны органа слуха: экссудативный отит, серозный отит, снижение слуха, перфорация барабанной перепонки?	Да	1
Общее количество баллов		

К группе риска по первичной цилиарной дискинезии относятся:

пациенты с рецидивирующим (хроническим) риносинуситом и рецидивирующим (хроническим) бронхитом с бронхоэктазами или без бронхоэктазов и сумме баллов по шкале PICADAR >5;

пациенты с рецидивирующими (хроническими) респираторными симптомами имеющих брата или сестру с ПЦД PICADAR >5;

пациенты с рецидивирующими (хроническими) респираторными симптомами, в семейном анамнезе которых имеются случаи мужского бесплодия, аномального расположения внутренних органов, хронических болезней респираторной системы.

У пациентов с суммой баллов по шкале PICADAR ≤ 5 проводится диагностический поиск других заболеваний с приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезией согласно клиническим протоколам, утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Пациентам из группы риска по ПЦД показана диагностическая бронхоскопия с целью взятия биоптата слизистых нижних отделов респираторного тракта для проведения электронно-микроскопического анализа и атомно-силовой микроскопии и получение мазка (соскоба) из верхних дыхательных путей для цитологического исследования.

Этап 2. Электронная микроскопия

Учет результатов электронно-микроскопического анализа проводится в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Форма оценки результатов электронно-микроскопического анализа биоптата слизистых респираторного тракта

Анализируемый параметр	Референсные показатели (норма)	Результат
Формула ресничек	(9x2)+2	<input type="checkbox"/> норма; <input type="checkbox"/> патология
Наружные динеиновые ручки реснички	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные в поле зрения; <input type="checkbox"/> норма
Внутренние динеиновые ручки	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные в поле зрения; <input type="checkbox"/> норма
Радиальные спицы	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> норма
Центральные микротрубочки	2	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные; <input type="checkbox"/> норма; <input type="checkbox"/> выше нормы (>2)
Нексиновые связки (мостики)	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> обнаружены

При выявлении в образце одного и более из вышеуказанных дефектов в ультраструктурной организации ресничек устанавливается диагноз ПЦД.

Внимание !

1) При наличии рецидивирующего (хронического) риносинусита с рецидивирующим (хроническим) бронхитом с бронхоэктазами или без бронхоэктазов, зеркального расположения внутренних органов или гетеротаксией и суммарного балла по шкале PICADAR ≥ 10 диагноз ПЦД правомочен даже при отрицательном результате электронной микроскопии.

2) При отсутствии ультраструктурных изменений в строении ресничек рекомендован генетический анализ для диагностики ПЦД.

В случае отсутствия ультраструктурных или генетических нарушений, характерных для ПЦД, проводится анализ с помощью цитологического метода и атомно-силовой микроскопии для верификации приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии.

Этап 3. Цитологическое исследование

Анализируется эксфолиативный биоматериал слизистых оболочек верхних дыхательных путей по параметрам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 — Форма оценки результатов цитологического исследования слизистых респираторного тракта верхних дыхательных путей

Клеточный состав слизистых респираторного тракта	Референсные значения (норма)	Результат
Реснитчатые эпителиоциты (РЭ)	65–80 %	
Бокаловидные клетки (БК)	1–20 %	
Соотношение РЭ к БК	5:1	
Не реснитчатые клетки	1–5 %	
Плоский (метаплазированный) эпителий	0	
Лейкоциты (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, базофилы)	0,1–1,0 %	

Если в анализируемом материале все показатели цитограммы находятся в пределах нормы — приобретенная (вторичная) цилиарная дискинезия исключается. При изменении любого из показателей цитограммы материал пациента далее исследуется с помощью атомно-силовой микроскопии для верификации приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии.

Этап 4. Атомно-силовая микроскопия

Устанавливается наличие/отсутствие в образцах слизистых верхних и нижних дыхательных путей поверхностных структурных нарушений клеток на основании параметров, указанных в таблице 4.

Таблица 4 — Типы дефектов в организации цилиарного эпителия и его ресничек, выявляемых с использованием атомно-силовой микроскопии

Тип нарушений реснитчатого аппарата эпителиоидных клеток	Результат исследования (n, %)
Щеточная кайма на апикальной поверхности эпителиоцитов	<input type="checkbox"/> наличие (норма); <input type="checkbox"/> отсутствие (патология)
Длина реснички	<input type="checkbox"/> норма (8–10 мкм); <input type="checkbox"/> патология (<8 или >10 мкм)
Толщина реснички	<input type="checkbox"/> норма (0,15–0,30 мкм); <input type="checkbox"/> патология (<0,15 или >0,30 мкм)

Выявление одного из указанных нарушений, при отсутствии электронно-микроскопических и/или генетических дефектов характерных для ПЦД, свидетельствует о приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии. Диагностический поиск других заболеваний с приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезией проводится согласно клиническим протоколам, утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Методология взятия и обработки материала для исследования цитологическим, электронно-микроскопическим и атомно-силовым методами представлены в приложении А. Этапность реализации алгоритма схематично отражена в приложении Б.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не выявлено. Ошибки могут быть обусловлены:

неправильным взятием нужного количества столбика ткани (биоптата) (менее 1 мм³) и временем его фиксации;

использованием просроченных или неправильно хранившихся реагентов;

неправильным разведением реактивов, приготовлением заливочных смол, несоблюдением температурного режима при выполнении методики;

при отсутствии или недостаточном количестве (менее 10) в анализируемом образце структурных элементов анализируемой ткани.

Во избежание возникновения ошибочных результатов необходимо строго соблюдать все методические правила как при выполнении биопсии, так и проведении исследований.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Взятие и обработка материала для исследования цитологическим, электронно-микроскопическим и атомно-силовым методами

Взятие и обработка мазков из верхних дыхательных путей для цитологического исследования

Взятие соскобного материала проводят без предварительного очищения пациентом верхних дыхательных путей. Процедура включает следующие этапы:

- 1) запрокидывание головы пациента под углом 90°;
- 2) введение в полость носа стерильной цитологической щетки («зонда Юнона») на расстоянии 1,5–2 см;
- 3) мягкое прокручивание цитощеткой носового хода (не менее трех раз по часовой стрелке);
- 4) нанесение и равномерное распределение биоматериала путем прокатывания по обезжиренному предметному стеклу, маркировка;
- 5) высушивание препарата в течение 5–10 мин с последующей его фиксацией 96 % этиловым спиртом в течение 5 мин;
- 6) окрашивание по методу Романовского-Гимза в течение 20 мин, с последующей отмывкой дистиллированной водой.

Взятие и пробоподготовка биоматериала из нижних дыхательных путей для исследования электронно-микроскопическим методом и с помощью атомно-силовой микроскопии

Используется аппарат для гибкой бронхоскопии с рабочим каналом не менее 2,0 мм. Процедура взятия материала проводится в стерильных условиях операционного зала. Пациента, лежащего на спине, обезболивают с помощью общей анестезии. Затем бронхоскоп вводят через нижний носовой ход в нижнюю носовую раковину, далее — в гортань до трахеи и/или главного бронха.

Для взятия биопсийного материала и последующего исследования с помощью атомно-силовой микроскопии используют щеточку для цитологии диаметром 1,2 и длиной 10 мм, рабочей длиной изделия 1150 мм. После введения осуществляют мягкое прокручивание цитощеткой не менее трех раз по часовой стрелке, извлекают ее и наносят материал путем прокатывания по обезжиренному покровному стеклу. Далее материал фиксируют 96 % этиловым спиртом в течение 5 мин.

Для взятия биопсийного материала с целью электронно-микроскопического исследования используют щипцы диаметром 1,2–1,8 мм, их подводят перпендикулярно к месту взятия, открывают бранш, упирают в слизистую трахеи или бронха, закрывают бранш, затем извлекают щипцы с фрагментом биологического материала для исследования.

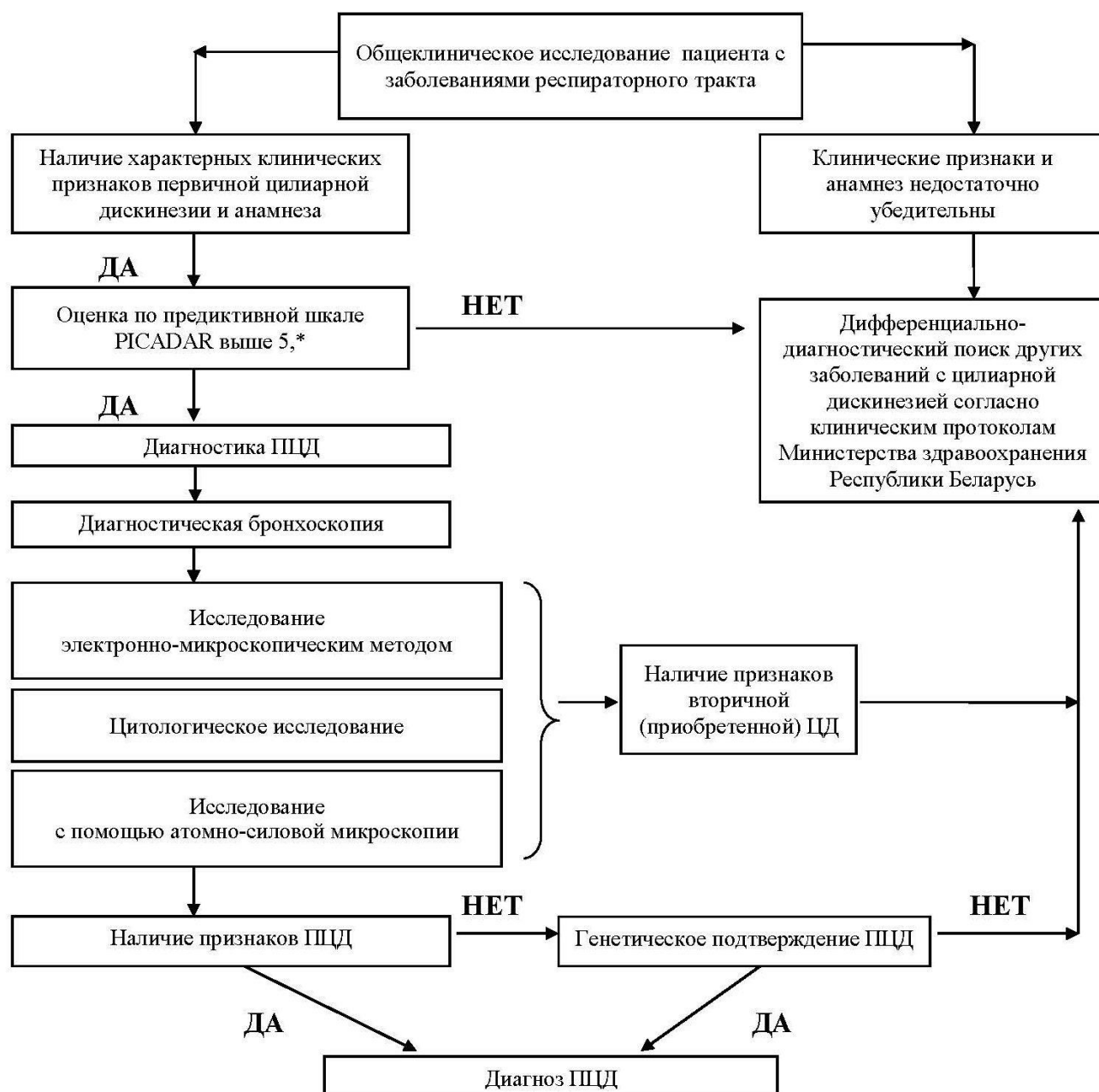
Материал фиксируется 2 ч в 2,5 % глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,4), постфиксируется 1 ч в 1 % OsO₄, обезвоживается в спиртах восходящей концентрации, далее заливается в специальные смолы для получения блоков для нарезки. Из блоков с использованием ультрамикротомы готовят ультратонкие срезы, монтируют их на

специальные медные сеточки с нанесенной формаваровой пленкой и затем окрашивают 1 % раствором уранилацетата и цитратом свинца. Образцы исследуют при помощи электронного микроскопа, оснащенного цифровой камерой при различных инструментальных увеличениях x8000-x100 000.

К материалу прилагается направление с указанием фамилии, имени и отчества пациента, пола и возраста, даты взятия и наименования материала, клинического диагноза.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Алгоритм исследования пациента для диагностики цилиарных дискинезий различного генеза



*При наличии синдрома Картагенера и суммарного балла по шкале PICADAR ≥ 10 диагноз ПЦД правомочен даже при отрицательном результате электронной микроскопии.