

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

2019 г.

Регистрационный № 096-0619

АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК И УСТОЙЧИВОСТИ К
РИФАМПИЦИНУ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ ПЦР
В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Инструкция по применению

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

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Дюсьмикеева М.И., д.м.н., профессор Гуревич
Г.Л., к.м.н., доцент Яцкевич Н. В., к.м.н. Котович Д.С., Николенко Е.Н.,
д.м.н. Скрягина Е.М.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

28.06.2019

Регистрационный № 069-0619

**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК И УСТОЙЧИВОСТИ
К РИФАМПИЦИНУ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ
ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. М. И. Дюсьмикеева, д-р мед. наук, проф.
Г. Л. Гуревич, канд. мед. наук, доц. Н. В. Яцкевич, канд. мед. наук Д. С. Котович,
Е. Н. Николенко, д-р мед. наук Е. М. Скрягина

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм диагностики туберкулеза органов дыхания (кроме туберкулеза легких), туберкулеза других органов (далее — внелегочного туберкулеза), а также определения лекарственной устойчивости возбудителя, основанный на использовании молекулярно-генетического метода микробиологической диагностики туберкулеза. Метод заключается в исследовании нереспираторных образцов и тканевого материала с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволяет обнаружить ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) и быстро определить лекарственную устойчивость МБТ (к рифампицину). Алгоритм может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику внелегочного туберкулеза.

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 внелегочным туберкулезом в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) отделениях дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Лабораторное оборудование:

бокс биологической безопасности (БББ) II класса;
автоматизированная система для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину;
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 °С.

Медицинские изделия:

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 надсадочной 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 автоматизированной системе для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину;
 одноразовые перчатки без талька;
 респиратор;
 халат хирургический одноразовый;
 маркер перманентный.

Реактивы:

Реагент	Условия хранения
Sample Reagent (SR)	Комнатная температура
Дитиотреитол- <i>dl</i>	От 2 до 8 °С
Раствор NaOH-натрия цитрат стерильный	В темноте, комнатная температура, не более 1 недели
N-ацетил-L-цистеин	От 2 до 8 °С
Буфер фосфатный 0,067 М/л, рН = 6,8 стерильный	От 2 до 8 °С, не более 1 недели

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Туберкулез органов дыхания (МКБ1-10 — А15.4-А15.9; А16.3-А16.9), в т. ч.е туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (А15.4, А16.3), туберкулез гортани, трахеи и бронхов (А15.5, А16.4), туберкулезный плеврит (А15.6, А16.5); туберкулез нервной системы (А17); туберкулез других органов (А18), в т. ч. туберкулез костей и суставов (А18.0); туберкулез мочеполовых органов (А18.1); туберкулезная периферическая лимфаденопатия (А18.2); туберкулез кишечника, брюшины и брыжеечных лимфатических узлов (А18.3); туберкулез кожи и подкожной клетчатки (А18.4); туберкулез глаза (А18.5); туберкулез уха (А18.6); туберкулез надпочечников (А18.7); туберкулез других уточненных органов (А18.8); милиарный туберкулез (А19).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение биологического материала.

1.1. При клинико-рентгенологической симптоматике, требующей диагностики внелегочного туберкулеза, до операции получают биологический материал (нереспираторные образцы), выполняют биопсию пораженного органа, в т. ч. видеоассистированную торакоскопию (ВАТС) с прицельной биопсией пораженных участков.

1.2. Материалом для исследования являются нереспираторные образцы (гной из холодных абсцессов, пунктаты лимфатических узлов, плевральная, спинно-мозговая, синовиальная или асцитическая жидкость, моча) и тканевой материал (резецированные ткани, грануляции, соскобы синовиальных оболочек, лимфатические узлы).

1.3. Нереспираторные образцы и/или кусочки ткани из основного очага поражения и окружающих тканей (очаги-отсевы) до их фиксации забирают с максимальным соблюдением правил асептики.

Минимальный объем материала для плевральной, спинно-мозговой, синовиальной или асцитической жидкости — 3 мл, крови — 5–10 мл.

Материал помещают в стерильный флакон без консервантов и немедленно доставляют в лабораторию.

1.4. Кровь необходимо доставлять в специальных пробирках, содержащих цитрат или гепарин.

Если в исследуемом образце может образоваться большой сгусток (например, в плевральной или асцитической жидкости), рекомендуется добавить к биологическому материалу в момент его сбора цитрат натрия.

1.5. Мочу (среднюю часть утренней порции, не менее 200 мл) собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Анализ мочи на микобактерии должен предусматривать обязательное трехкратное исследование. Моча доставляется в лабораторию в тот же день, использование консервантов не допускается.

1.6. Величина кусочка ткани для исследования из основного очага поражения и окружающих тканей составляет не менее 2 см². Образец ткани доставляется в микробиологическую лабораторию в стерильном контейнере.

Для разжижения и деконтаминации резекционные (тканевые) образцы предварительно обрабатывают реактивом *дитиотреитол-dl*.

При работе с резекционными (тканевыми) образцами необходима многократная отмывка от примесей крови в образцах хлористым аммонием при высоких оборотах центрифуги.

1.7. Если исследование биологического материала не может быть произведено в день получения пробы, в контейнер с образцами необходимо добавить равное по объему количество стерильного физиологического раствора (не менее 1 мл), чтобы предотвратить высыхание ткани. Хранить материал в таком виде возможно не более 48 ч в холодильнике при 4±2 °С.

В процессе транспортировки не допускается замораживание биологического материала и перегревание свыше 30 °С.

2. Молекулярно-генетическое исследование полученного биологического материала с использованием диагностической автоматизированной системы для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину включает следующие основные этапы:

2.1. Полученные образцы биологического материала извлекаются из контейнера.

2.2. Образцы гомогенизируются в стерильной фарфоровой ступке с помощью пестика с добавлением небольшого количества стерильного песка.

2.3. К образцу гомогенизированной ткани добавляется равный объем NaLC-NaOH (N-ацетил-L-цистеин с гидроокисью натрия) для разжижения пробы, ее деконтаминации, гомогенизации, и выдерживается экспозиция в течение 15–23 мин.

2.4. Следует убедиться, что крышка пробирки плотно закручена. Содержимое пробирки тщательно перемешивается (переворачивается несколько раз).

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

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

2.7. Центрифужные стаканы устанавливаются в центрифугу.

2.8. Следует убедиться, что на центрифуге установлены значения 3700 грм (об/мин) (rcf 3000 g), температура 5 °С, время 15 мин.

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

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

2.11. 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.

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

2.13. Добавляется не более 2 мл фосфатного буфера.

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

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

2.16. 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.

2.17. 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.

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

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

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

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

2.22. Образец 2 мл помещается в камеру картриджа для образца.

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

2.24. Интерпретация результатов молекулярно-генетического исследования нереспираторных образцов и гомогената ткани:

отрицательный результат: ДНК МБТ не обнаружена — дальнейшая тактика ведения пациента зависит от результатов обследования, посевов на МБТ и консультаций у специалистов. При необходимости пациент направляется на консультацию к фтизиатру;

положительный результат: ДНК МБТ обнаружена с устойчивостью к рифампицину (Rif+) (маркер множественно-лекарственно-устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ) или без устойчивости к рифампицину (Rif-) — пациент направляется на консультацию в противотуберкулезный диспансер.

Заключение

Молекулярно-генетический метод с использованием диагностической автоматизированной системы для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину рекомендован для выявления возбудителя ТБ с одновременным определением его устойчивости к рифампицину, которая является маркером МЛУ-ТБ.

Преимуществами данного метода являются минимальная вероятность контаминации и возможность его применения в «полевых условиях»: использование метода не требует оборудованной ПЦР-лаборатории и специально подготовленного персонала.

Для повышения эффективности диагностики внелегочного туберкулеза существует необходимость параллельного использования одновременно комплекса традиционных и ускоренных микробиологических и молекулярно-генетических методов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование молекулярно-генетического метода подразумевает строгое следование всем правилам организации и выполнения исследований в бактериологической лаборатории.

Ошибочные результаты при диагностике туберкулеза могут быть получены при нарушении условий взятия нереспираторных образцов и тканевого материала (несоблюдение стерильных условий), а также неинформативности биоптата из-за «погрешности» и неадекватного забора материала.

При точном соблюдении алгоритма исследования осложнения и ошибки исключены.