

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц

Д.Л. Пиневиц 2017 г.

Регистрационный № 105-1117

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД И АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ
МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА НА ОСНОВЕ
ОДНОВРЕМЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИХ И УСКОРЕННОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор Гуревич Геннадий Львович, д.м.н. Скрягина Елена
Михайловна, д.м.н. профессор Суркова Лариса Константиновна, к.м.н.,
доцент Яцкевич Наталья Викторовна, Николенко Елена Николаевна,
Залуцкая Оксана Михайловна

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

01.12.2017

Регистрационный № 105-1117

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД И АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ
МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА
НА ОСНОВЕ ОДНОВРЕМЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И УСКОРЕННОГО
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. Г.Л. Гуревич, д-р мед. наук Е.М. Скрыгина, д-р
мед. наук, проф. Л.К. Суркова, канд. мед. наук, доц. Н.В. Яцкевич,
Е.Н. Николенко, О.М. Залуцкая

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод и алгоритм диагностики рифампицин-устойчивого/мультирезистентного туберкулеза (далее — РУ-ТБ/МЛУ-ТБ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, и заключается в одновременном проведении на одном образце клинического материала: микроскопического исследования мазка по Цилю–Нильсену, молекулярно-генетического теста, позволяющего обнаружить ДНК *M.tuberculosis* (далее — МБТ) и определить устойчивость МБТ к рифампицину, молекулярно-генетического метода гибридизации с ДНК-зондами, позволяющего выявить устойчивость МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам (далее — ПТЛС) первого и второго ряда, посева и теста лекарственной чувствительности (далее — ТЛЧ) с использованием автоматизированной бактериологической системы.

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

Оборудование: автоматизированная система для проведения быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину; оборудование для проведения гибридизации ДНК на стрипах с ДНК-зондами; амплификатор в реальном времени с многоканальным лазером; ПЦР-бокс; вортекс; шейкер; центрифуга на 10000 об./мин и более; термошейкер для гибридизации и инкубации одновременно 12 ДНК стрипов при молекулярно-генетических исследованиях; водяная баня; холодильник; морозильная камера; весы аналитические точностью 0,01–0,1 мг; ультрафиолетовый облучатель; автоклав; вытяжной шкаф; твердотельный термостат; бокс биологической безопасности класса II типа А2; центрифуга на 3000g с антиаэрозольной защитой; автоматизированная бактериологическая система для ускоренной бактериологической диагностики МБТ.

Расходные материалы:³картриджи к автоматизированной системе для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину; тест-системы для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности МБТ к рифампицину, изониазиду, аминогликозидам/циклопептидам, ³фторхинолонам методом гибридизации с ДНК-зондами, тест-системы для молекулярно-генетической идентификации нетуберкулезных микобактерий (далее — НТМ) до вида; стерильный изотонический раствор хлорида натрия; 4 %-й раствор серной кислоты; осаждающая суспензия, применяемая при молекулярно-генетических исследованиях, N-ацетил-L-цистеин с гидроокисью натрия (NaLC-NaOH) фосфатный буфер; наконечники одноразовые пластиковые объемом 0,5–250, 200–1000 мкл с аэрозольным барьером и без него; 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 стерильные контейнеры дозаторы переменного объема на 0,5–10, 5–50, 20–200, 200–1000 мкл; одноразовые перчатки без талька; халат хирургический одноразовый; респиратор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- туберкулез легких у пациента, у которого установлен контакт с пациентом с РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, в т. ч. при необходимости начала повторного лечения после неэффективного курса терапии;

- туберкулез в сочетании с ВИЧ;

- рецидив туберкулеза;

- положительный результат посева мокроты пациента при подозрении развития у него РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, но не ранее чем в конце второго месяца лечения лекарственно-чувствительного туберкулеза (далее — ЛЧ-ТБ).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Комплексный метод должен выполняться на одном и том же образце клинического материала: мокроты, в т. ч. индуцированной, промывных вод бронхов, плевральной жидкости, спинномозговой жидкости или промывных вод желудка (не более 10 мл).

Технология использования метода включает следующие этапы:

1-й этап. Микроскопия мазка и исследование образца молекулярно-генетическим тестом, позволяющим обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину (скрининговые тесты).

Микроскопическое исследование является обязательным для определения у пациента статуса бактериовыделения с целью госпитализации в специализированное отделение противотуберкулезного учреждения.

2-й этап. Молекулярно-генетическое исследование того же образца в случаях выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ+) в мазке методом гибридизации с ДНК-зондами с использованием тест-систем, позволяющих определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда.

Тест-системы для гибридизации с ДНК-зондами 2-й версии (v.2) можно использовать для образцов клинического материала вне зависимости от результатов микроскопии.

3-й этап. Посев того же образца в жидкую среду (в автоматизированной бактериологической системе), на плотную среду и ТЛЧ выделенной культуры к ПТЛС первого и второго ряда.

По клиническим показаниям ТЛЧ выделенных культур МБТ с использованием молекулярно-генетического метода гибридизации с ДНК-зондами, позволяющего определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда, можно проводить в случае отсутствия результатов ТЛЧ на предыдущих этапах диагностики (1 и 2-й этапы).

Алгоритм диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ с использованием комплексного метода

Для выделения МБТ используются стандартизованные методики, регламентированные Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза, приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013.

1-й этап. Микроскопия мазка и исследование образца молекулярно-генетическим тестом, позволяющим обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину.

Образец клинического материала, полученный от пациента, подвергается обработке NaLC-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; окрашивают и исследуют мазок.

Ресуспендированный в 3 мл фосфатного буфера осадок разделяют на 3 аликвоты (по 1,0 мл).

1.1. Материал 1-й аликвоты исследуется молекулярно-генетическим тестом, позволяющим обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину в соответствии с инструкцией производителя.

1.2. Материал 2-й аликвоты используется для молекулярно-генетического исследования методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда.

1.3. Материал 3-й аликвоты засевают в жидкую питательную среду (в автоматизированной бактериологической системе), на плотную среду.

В дальнейшем алгоритм исследования определяется с учетом полученных результатов микроскопии и молекулярно-генетического теста, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину в течение первого дня исследования.

Возможны следующие варианты результатов скрининговых тестов:

- 1) КУБ+, МБТ+, наличие устойчивости к рифампицину (Rif+)
- 2) КУБ+, МБТ +, отсутствие устойчивости к рифампицину (Rif-)
- 3) КУБ+, МБТ +, неопределенный результат (Rif ?)
- 4) КУБ+, МБТ-
- 5) КУБ-, МБТ+, Rif+
- 6) КУБ-, МБТ+, Rif-
- 7) КУБ-, МБТ+, Rif ?
- 8) КУБ-, МБТ-
- 9) КУБ+, недействительный результат «скринингового» молекулярно-генетического теста (Н).
- 10) КУБ-, Н.

2-й этап. Молекулярно-генетическое исследование образца клинического материала (2-й аликвоты) методом гибридизации с ДНК-зондами.

2.1. Образец клинического материала с КУБ+, выявленными в окрашенных по Цилю–Нильсену мазках, исследуется молекулярно-генетическим методом

гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда (2-я аликвота).

2.1.1. В случае выявления МБТ, чувствительных к рифампицину по результатам «скринингового» молекулярно-генетического теста, 2-я аликвота исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого ряда для выявления МБТ, устойчивых к изониазиду.

2.1.2. В случае выявления МБТ, устойчивых к рифампицину по результатам «скринингового» молекулярно-генетического теста, 2-я аликвота исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда.

2.2. Тест-системы v.2 можно использовать для образцов клинического материала с КУБ- в мазках в соответствии с инструкцией производителя.

2.2.1. В случае отрицательного результата микроскопии и выявления МБТ с чувствительностью к рифампицину «скрининговым» молекулярно-генетическим тестом 2-я аликвота исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого ряда, для выявления устойчивости к изониазиду (тест-система v.2).

2.2.2. При отрицательном результате микроскопии и выявлении устойчивости к рифампицину 2-я аликвота исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда (тест-система v.2).

2.3. В случае отрицательных результатов микроскопии и «скринингового» молекулярно-генетического теста необходимо дополнительно провести посев и ТЛЧ образца клинического материала на плотной питательной среде.

3-й этап. Посев образца клинического материала (3-й аликвоты) в жидкую и на плотную среды, ТЛЧ выделенной культуры к ПТЛС первого и второго ряда.

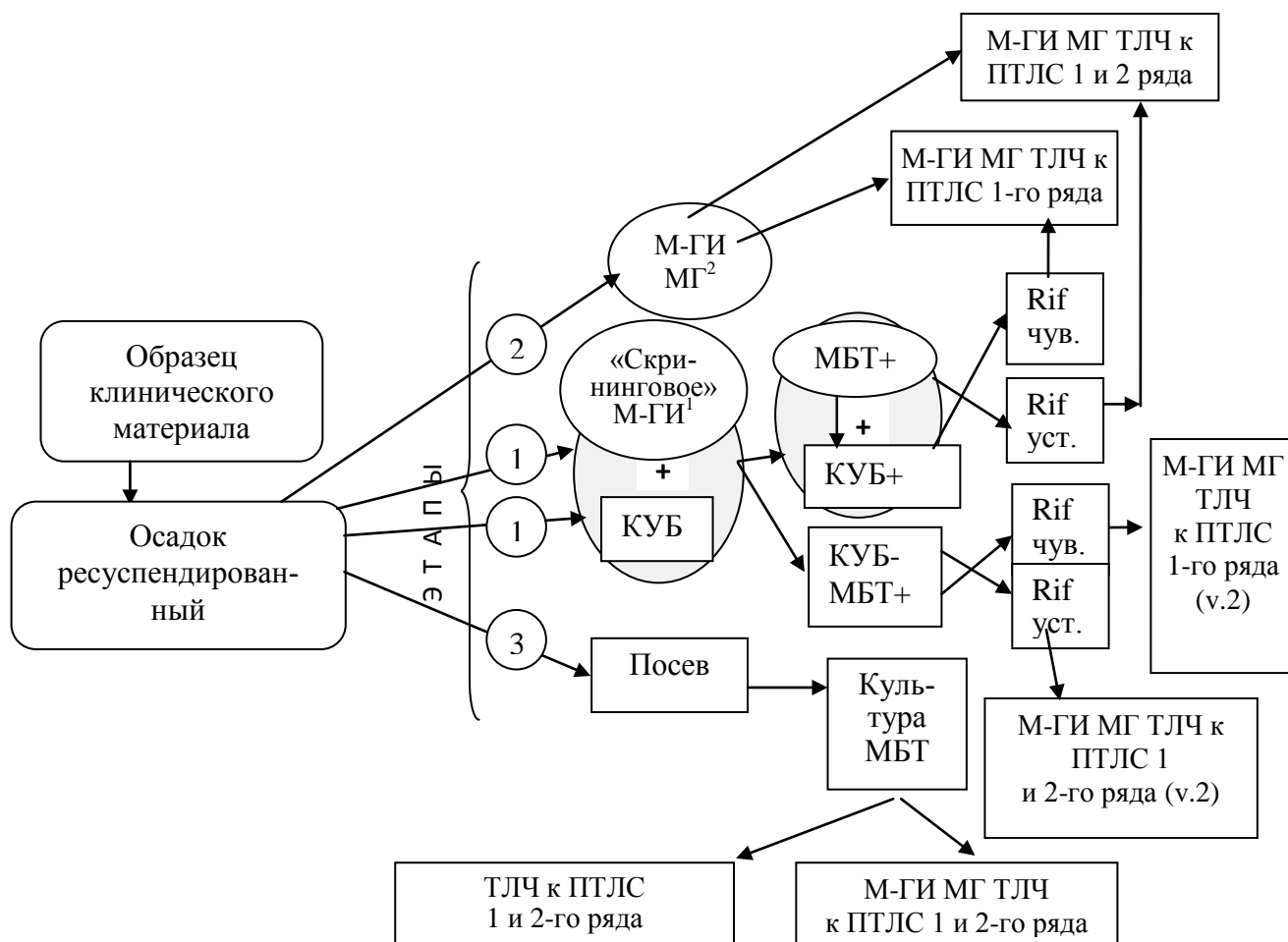
При выделении культуры в жидкой среде (в автоматизированной бактериологической системе) и на плотной среде проводят культурально-биохимические, иммунохроматографические исследования для исключения НТМ, а при их наличии — молекулярно-генетические исследования для идентификации до вида.

При выявлении чувствительности к рифампицину «скрининговым» молекулярно-генетическим тестом на 1-м этапе комплексного метода проводят ТЛЧ к ПТЛС первого ряда. При выявлении устойчивости МБТ к рифампицину «скрининговым» молекулярно-генетическим тестом на 1-м этапе комплексного метода проводят ТЛЧ к ПТЛС первого и второго ряда.

По клиническим показаниям молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда (в т.ч. v.2), можно проводить ТЛЧ, выделенных на плотной и/или в жидкой питательных средах культур МБТ, для которых это исследование не выполнялось на предыдущих этапах диагностики, либо был получен данными методами неопределенный результат.

Комплексный метод не исключает посева мокроты, ТЛЧ выделенной культуры на плотной среде и осуществления микробиологической диагностики туберкулеза в соответствии с Клиническим руководством по диагностике и лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 601 от 30.05.2017).

Алгоритм ускоренной лабораторной диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ с использованием комплексного метода представлен на рисунке.



1 — «Скрининговое» М-ГИ — молекулярно-генетическое исследование для одновременного обнаружения ДНК МБТ и определения устойчивости МБТ к рифампицину; 2 — М-ГИ МГ — молекулярно-генетический метод гибридизации с ДНК-зондами для определения устойчивости МБТ к ПТЛС 1 и 2-го ряда

Рисунок — Алгоритм ускоренной лабораторной диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ с использованием комплексного метода

Интерпретация результатов комплексного метода.

Если результат чувствительности к рифампицину, определенный молекулярно-генетическим методом, не совпадает с фенотипическим культуральным методом, то ТЛЧ следует повторить молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС.

Консилиум по РУ-ТБ/МЛУ-ТБ может назначить лечение РУ-ТБ/МЛУ-ТБ до получения результатов повторного исследования.

При выявлении устойчивости МБТ к рифампицину только молекулярно-генетическим методом следует считать, что эта устойчивость истинная, но она не проявляется фенотипически. При выявлении устойчивости МБТ к рифампицину только культуральным фенотипическим методом и отсутствии устойчивости к рифампицину при молекулярно-генетическом исследовании устойчивость обусловлена мутацией не в гене *rpoB*. Это может быть установлено только при секвенировании МБТ, что не может быть осуществлено в практической лаборатории, поэтому устойчивость к рифампицину, выявленную только фенотипическим методом, следует учитывать как истинную.

По результатам быстрых молекулярно-генетических методов, позволяющих установить лекарственную чувствительность МБТ к ПТЛС первого и второго ряда, можно составить схему лечения ТБ, но дальнейшее ТЛЧ выделенной в жидкой среде культуры у пациентов с РУ-ТБ необходимо для выявления устойчивости ко всем ПТЛС, используемым в схеме лечения РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, что позволяет осуществить своевременную коррекцию лечения.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибочные результаты при проведении комплексной диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ могут быть обусловлены сложностью интерпретации полос гибридизации в случаях редких мутаций и при смешанной популяции микроорганизмов могут быть получены при несоблюдении протоколов исследования, нарушении условий сбора, хранения и транспортировки образца, 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 применять реактивы после окончания срока годности и соблюдать условия их хранения.

Хранить клинический материал следует при $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 1–2 дней. Транспортировка материала должна производиться в течение 1–2 ч в стерильном контейнере.

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

Меры безопасности

Первичная обработка клинического материала (разжижение, гомогенизация, центрифугирование), последующее выделение ДНК МБТ, манипуляции с культурой, тестирование лекарственной чувствительности МБТ к ПТЛС на питательных средах представляют потенциальный риск образования инфекционного аэрозоля и инфицирования персонала. При проведении этих работ 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 № 377 от 22.03.2013)).