

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневиц  
2017 г.

Регистрационный № 106-1117

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛОИНВАЗИВНЫХ  
ВИДЕОАССИСТИРОВАННЫХ ОПЕРАТИВНЫХ  
ВМЕШАТЕЛЬСТВ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент Яцкевич Наталья Викторовна, д.м.н., профессор Гуревич  
Геннадий Львович, д.м.н. Скрягина Елена Михайловна, д.м.н., профессор  
Суркова Лариса Константиновна, к.м.н. Дюсьмикеева Марина Игоревна,  
Котович Дмитрий Светославович, Николенко Елена Николаевна

Минск, 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
01.12.2017  
Регистрационный № 106-1117

**АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛОИНВАЗИВНЫХ  
ВИДЕОАССИСТИРОВАННЫХ ОПЕРАТИВНЫХ  
ВМЕШАТЕЛЬСТВ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Н.В. Яцкевич, 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  
М.И. Дюсьмикеева, Д.С. Котович, Е.Н. Николенко

Минск 2017

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм диагностики туберкулеза и других заболеваний легких, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику туберкулеза и других заболеваний легких. Метод заключается в гистологическом, иммуногистохимическом, молекулярно-генетическом и гистобактериологическом исследовании ткани резекционного материала легкого и быстром определении лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (далее — МБТ).

Инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, врачей-фтизиатров, врачей-онкологов, врачей-хирургов, врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями легких в стационарных условиях.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

**Оборудование:** гистопроцессор; аппарат для парафиновой заливки; микротом; аппарат для окраски гистологических срезов; аппарат для покрытия предметных стекол; микроскоп; криостат; автоматизированная система для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину; оборудование для 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 выполнении молекулярно-генетического исследования; 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 3000 g с антиаэрозольной защитой; автоматизированная бактериологическая система для ускоренной бактериологической диагностики МБТ; гомогенизатор ткани; таймер.

**Расходные материалы:** формалин; реагенты для окраски гистологических препаратов: алюмокалиевые квасцы, гематоксилин, йодноватокислый калий, хлоралгидрат; раствор Конго красный, основной фиксирующий буфер, спиртовой дифференцирующий буфер, гематоксилин Майера; подкисленная вода (уксусная кислота), альциановый синий (по Моури), раствор периодной кислоты, реагент Шиффера, раствор натрия бисульфита; раствор Вейгерта В, раствор Вейгерта А, пикрофуксин Ван-Гизон; раствор карболфуксина, раствор серной кислоты, раствор метиленового синего; раствор хромовой кислоты, метенамин-серебра, тетрабората натрия, тиосульфата натрия, хлорного золота, светового зеленого. Картриджи с реагентами к автоматизированной системе для проведения 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, фторхинолонам методом гибридизации с ДНК-

зондами; стерильный изотонический раствор хлорида натрия; 4 %-й раствор серной кислоты; осаждающая суспензия, применяемая при молекулярно-генетическом исследовании; N-ацетил-L-цистеин с гидроокисью натрия (NaLC-NaOH); фосфатный буфер; стерильный песок; наконечники одноразовые пластиковые объемом 0,5–250, 200–1000 мкл с аэрозольным барьером и без него; 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**

Заболевания и патологические состояния, характеризующиеся клинико-рентгенологической симптоматикой, проявляющейся легочной диссеминацией, округлыми образованиями и очагово-инфильтративными изменениями в легких, требующей дифференциальной диагностики туберкулеза и других заболеваний легких, в частности при отсутствии возбудителя туберкулеза в мокроте.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Включают противопоказания для проведения видеоассистированной торакоскопии (далее — ВАТС) с резекцией легкого:

- легочная гипертензия;
- выраженный обструктивный синдром;
- тяжелые сердечно-сосудистые заболевания;
- наличие выраженного плеврального спаечного процесса.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Технология использования алгоритма включает следующие этапы:

Первый этап. ВАТС и интраоперационное срочное гистологическое исследование ткани резекционного материала легкого.

Второй этап. Гистологическое, иммуногистохимическое исследование резекционного материала легкого.

Третий этап. Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани резекционного материала легкого, позволяющее обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину. Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани резекционного материала легкого методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам (далее — ПТЛС) первого и второго ряда.

Четвертый этап. Гистобактериологическое исследование: посев гомогената ткани резекционного материала легкого для выделения и идентификации культуры МБТ на плотную и жидкую среды, тест лекарственной чувствительности (далее — ТЛЧ) выделенной культуры МБТ к ПТЛС.

Пятый этап. Молекулярно-генетическое исследование выделенной культуры МБТ методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда.

Третий–пятый этапы проводятся в бактериологических лабораториях III уровня (лаборатории областных противотуберкулезных учреждений здравоохранения (ПТУ) и республиканская референс-лаборатория).

Пятый этап проводится при неопределенном результате на третьем этапе.

**Первый этап. ВАТС и интраоперационное срочное гистологическое исследование ткани резекционного материала легкого**

1. При наличии клинико-рентгенологической симптоматики, проявляющейся легочной диссеминацией, округлыми образованиями и очагово-инфильтративными изменениями в легких, требующей дифференциальной диагностики туберкулеза и других заболеваний легких, невозможности установления диагноза клинико-рентгено-томографическими и лабораторно-инструментальными методами осуществляется ВАТС с резекцией легкого.

2. Образец ткани размером не менее 4 см в максимальном диаметре и толщиной (расстояние от поверхности плевры) 3 см доставляется в патоморфологическую лабораторию в стерильном контейнере, где проводится интраоперационное срочное гистологическое исследование на криостатном микротоме.

**Второй этап. Гистологическое, иммуногистохимическое исследование резекционного материала легкого.**

1. Проводится рутинное гистологическое исследование с традиционной окраской гематоксилин-эозином.

2. При необходимости выполняются дополнительные методы окраски по Цилю–Нильсену (для выявления кислотоустойчивых бактерий), Ван-Гизону (для выявления фиброза), альциановым синим (по Моури) (ШИК-реакция) (при подозрении альвеолярного протеиноза), а также Грокотту (при подозрении микоза).

3. Иммуногистохимическое исследование выполняется при подозрении лимфангиолейомиоматоза ( $\alpha$ -гладкомышечный актин, антиген меланоцитов НМВ-45), гистиоцитоз X (CD1a, S100, CD207).

При гистологическом диагнозе «туберкулез» или «подозрение туберкулеза» часть резекционного материала легкого доставляется в специализированную бактериологическую лабораторию ПТУ в стерильном контейнере для молекулярно-генетического исследования, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда, а также бактериологического анализа для выделения и идентификации культуры МБТ, ТЛЧ выделенной культуры МБТ к ПТЛС первого и второго ряда.

**Третий этап. Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани резекционного материала легкого.**

**1. Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани резекционного материала легкого, позволяющее обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину.**

1.1. Образец ткани легкого измельчается с помощью стерильного скальпеля или ножниц и пинцета.

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

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

1.4. Часть полученной гомогенной суспензии образца ткани переносится в коническую пробирку на 50 мл.

Полученная гомогенная суспензия (не более 10 мл) 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, мазок окрашивают и исследуют.

Ресуспендированный в 4 мл фосфатного буфера осадок разделяют на 4 аликвоты (по 1,0 мл) для молекулярно-генетического исследования, посева на питательные среды, проводят гистобактериологический анализ.

1.5. Картридж к автоматизированной системе для проведения быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину маркируется в соответствии с номером исследуемого образца ткани.

1.6. Гомогенизированный образец ткани (0,7 мл) переносится в коническую пробирку с завинчивающимся колпачком.

Необходимо избегать переноса кусочков ткани, которые не были гомогенизированы.

1.7. Двойной объем (1,4 мл) реагента, используемого для деконтаминации и разжижения образца при молекулярно-генетическом исследовании, позволяющем обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину, переносится в пробирку, содержащую 0,7 мл гомогенизированной ткани.

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

1.9. 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.

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

1.11. Обработанный образец (2 мл) переносится в картридж.

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

1.13. Учет и интерпретация результата.

Продолжительность молекулярно-генетического исследования гомогената ткани легкого, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину, составляет менее 2 ч (при традиционном бактериологическом исследовании — в среднем 36 дней).

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-).

**2. Молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани резекционного материала легкого методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС.**

В случае выявления МБТ, чувствительных к рифампицину (по результатам третьего этапа, пункт 1), вторая аликвота (третий этап, пункт 1.4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого ряда для выявления МБТ, устойчивых к изониазиду.

В случае выявления МБТ, устойчивых к рифампицину (по результатам третьего этапа пункта 1), вторая аликвота (третий этап, пункт 1.4) исследуется молекулярно-генетическим методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого и второго ряда в соответствии с инструкцией производителя.

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  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Четвертый этап. Гистобактериологическое исследование: посев гомогената ткани резекционного материала легкого для выделения и идентификации культуры МБТ.**

1. Третья и четвертая аликвоты (третий этап, пункт 1.4) подвергаются гистобактериологическому исследованию (выделение культуры МБТ из тканевого материала) в бактериологических лабораториях ПТУ. Бактериологическое исследование выполняется в соответствии с Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).

Возможно получение следующих результатов бактериологического исследования образца гомогената ткани легкого:

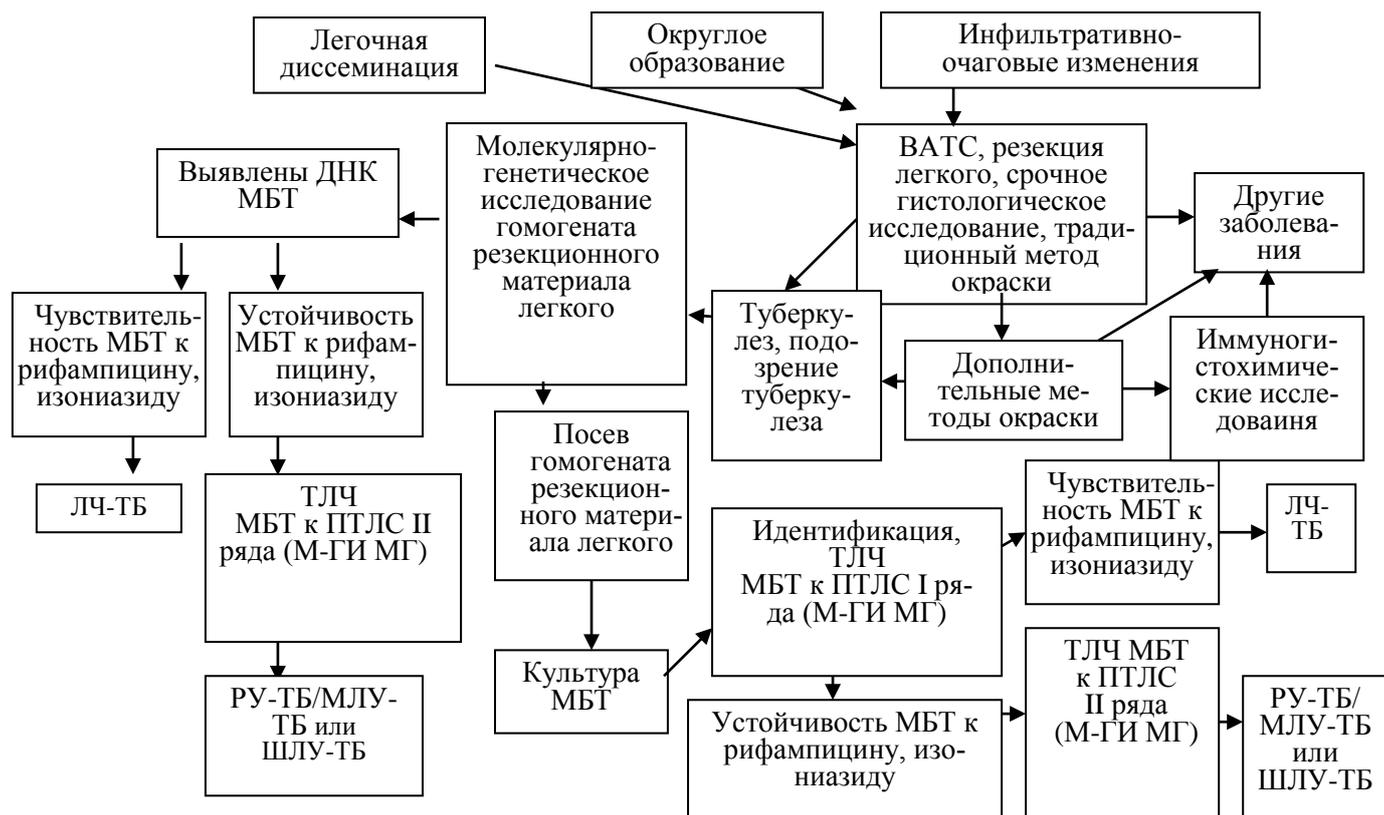
Отрицательный результат: культура МБТ не выделена.

Положительный результат: культура МБТ выделена.

**Пятый этап. Молекулярно-генетическое исследование выделенной культуры МБТ методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС.**

Пятый этап проводится при неопределенном результате на третьем этапе.

Молекулярно-генетическое исследование выделенной культуры МБТ проводится методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС первого ряда. При ее выявлении к рифампицину, изониазиду проводится молекулярно-генетическое исследование выделенной культуры МБТ методом гибридизации с ДНК-зондами, позволяющим определить устойчивость МБТ к ПТЛС второго ряда в соответствии с инструкцией.



М-ГИ МГ — молекулярно-генетический метод гибридизации с ДНК-зондами для определения устойчивости МБТ к ПТЛС первого и второго ряда

**Рисунок — Алгоритм диагностики заболеваний легких с использованием малоинвазивных видеоассистированных оперативных вмешательств**

Тестирование лекарственной чувствительности МБТ молекулярно-генетическими методами позволяет установить диагноз «лекарственно-чувствительный туберкулез» (ЛЧ-ТБ), «рифампицин-устойчивый туберкулез/МЛУ-ТБ» (РУ-ТБ/МЛУ-ТБ), «туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью» (ШЛУ-ТБ) (рисунок); проводится в бактериологических лабораториях III уровня (лаборатории областных ПТУ и республиканская референс-лаборатория), которые располагают необходимым для данного исследования оборудованием.

Для гистобактериологического и молекулярно-генетического исследования резекционный материал должен быть нативным, нефиксированным и стерильным.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

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

- замедленное расправление легкого (более 3 сут);
- экссудативный плеврит;

- ограниченный пневмоторакс;
- внутривнутриплевральное кровоотечение.

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).