

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л.Пиневиц

_____ 201 8 г.

Регистрационный № 172-1218



**МЕТОД ПЦР-ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д.м.н. Елена Михайловна Скрягина, д.м.н., профессор, член-корреспондент
НАН Беларуси Геннадий Львович Гуревич, Виктория Яковлевна Кралько,
д.м.н., профессор Лариса Константиновна Суркова, к.м.н., доцент Олег
Михайлович Калечиц, к.м.н., доцент Наталья Викторовна Яцкевич, к.м.н.
Дмитрий Светославович Котович

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич

14.12.2018

Регистрационный № 172-1218

**МЕТОД ПЦР-ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА**

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., чл.-кор. НАН Беларуси
Г. Л. Гуревич, В. Я. Кралько, д-р мед. наук, проф. Л. К. Суркова, канд. мед. наук,
доц. О. М. Калечиц, канд. мед. наук, доц. Н. В. Яцкевич, канд. мед. наук
Д. С. Котович

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза в резецированных участках легкого методом ПЦР-гибридизационного анализа (метод), который может быть применен в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов, страдающих туберкулезом легких с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Он снизит частоту реактивации туберкулеза и летальных исходов, что позволит получить определенный социальный и экономический эффект.

Метод предназначен для врачей-фтизиатров, врачей-торакальных хирургов, врачей-онкологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с легочным туберкулезом в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Медицинские изделия для открытых и видеоэндоскопических хирургических вмешательств на органах дыхания.

2. Вода высокой степени чистоты для молекулярных исследований и фермент Taq-полимераза.

3. Оборудование, необходимое для первичного разжижения-деконтаминации образцов мокроты (бокс биологической безопасности и безопасные центрифуги).

4. Термоциклер.

5. Качающаяся платформа (программируемый термошейкер) и водяная баня.

6. Термоблок.

7. Соникатор.

8. Микроцентрифуга.

9. Реакционные пробирки.

10. Прибор для гибридизации.

11. Холодильник, морозильник.

12. Микропипетки и наконечники для пипеток, пробирки для ПЦР-анализа.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рецидив туберкулеза легких при отсутствии рентгенологической динамики и прекращения бактериовыделения на фоне лечения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не выявлено.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. До деконтаминации образцы ткани легкого должны храниться в стерильном пластиковом контейнере при температуре от 2 до 8 °С. Транспортировка образцов при комнатной температуре должна быть выполнена в максимально короткие

сроки — в течение 48 ч (для образцов, используемых для деконтаминации — не более 4 сут).

2. После деконтаминации и ресуспендирования бактериального осадка фосфатным буфером образцы хранятся при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ максимально 5 сут до выделения ДНК.

3. Обработка образцов NALC (муколитический агент)/NaOH согласно CDC «Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory».

4. Ресуспендирование клеточного осадка в 1–1,5 мл фосфатного буфера.

5. Выделение ДНК.

Рабочая площадь должна быть чистой от контаминирующей ДНК.

Выделение ДНК из деконтаминированных клинических образцов или культивированного материала набором реагентов GenoLyse kit.

6. Амплификация:

- Подготовить реагенты, необходимые для амплификации (Амплификационная смесь, Amplification Mixes A и B (AM-A и AM-B)).

- После оттаивания быстро осадить смеси AM-A и AM-B и осторожно перемешать, пипетируя вверх и вниз. Пипетировать в условиях, чистых от контаминирующей ДНК. Растворы ДНК следует вносить в отдельной комнате.

- Объем реагентов для каждого образца: 10 мл амплификационной смеси AM-A; 35 мл амплификационной смеси AM-B; 5 мкл раствора ДНК; конечный объем 50 мкл.

- Определить количество образцов (количество анализируемых проб + контрольные образцы); подготовить необходимое количество пробирок.

- Подготовить мастермикс, содержащий AM-A и AM-B смеси реагентов, аккуратно, но тщательно перемешать (не на вортексе).

- Аликвотировать по 45 мкл в каждую подготовленную ПЦР-пробирку и добавить в одну аликвоту 5 мкл воды.

- В отдельном помещении внести в каждую аликвоту по 5 мкл раствора ДНК.

Запустить программу амплификации термоциклера.

Таблица — Варианты программ термоциклера для амплификации ДНК при выполнении ПЦР-гибридизации.

Режимы	Клинические образцы	Культивированные образцы
15 мин $95\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 цикл	1 цикл
30 сек $95\text{ }^{\circ}\text{C}$	20 циклов	10 циклов
2 мин $65\text{ }^{\circ}\text{C}$	20 циклов	10 циклов
25 с $95\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 циклов	20 циклов
40 с $50\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 циклов	20 циклов
40 с $70\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 циклов	20 циклов
8 мин $70\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 цикл	1 цикл
Нагрев	$\leq 2,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$	$\leq 2,2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$

Продукты амплификации могут храниться при температуре от 8 до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7. Гибридизация.

Подготовка. Прогреть водяную баню с шейкером до 45 °С (максимально допустимое отклонение температуры ± 1 °С). Растворы НУВ и STR перед применением нужно предварительно прогреть до температуры от 37 до 45 °С. В реагентах не должно быть осадка.

В подходящей пробирке развести концентрат конъюгата (CON-C) и концентрат субстрата (SUB-C) в соотношении 1:100 в соответствующем буфере.

Хорошо перемешать и довести до комнатной температуры.

Из расчета на каждый стрип добавить 10 мкл концентрата к 1 мл соответствующего буфера.

Внести по 20 мкл денатурирующего раствора (DEN) в угол каждой ячейки.

Добавить в раствор по 20 мкл продукта амплификации, перемешать пипетированием и инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

Осторожно добавить в каждую ячейку по 1 мл предварительно нагретого гибридизационного буфера (НУВ).

Аккуратно покачать ванночку до получения гомогенного окрашивания.

Поместить стрипы в ячейки. Стрипы должны быть полностью погружены в раствор, лицевой стороной (определяемой по цветной полосе на нижнем конце) вверх.

Поместить ванночку на водяную баню с шейкером и инкубировать 30 мин при температуре 45 °С.

Скорость встряхивания водяной бани должна обеспечивать жидкости постоянное перемешивание.

Полностью аспирировать гибридизационный буфер.

Добавить 1 мл раствора для жесткой промывки (STR) в каждый стрип и инкубировать 15 мин при температуре 45 °С в водяной бане с шейкером.

При комнатной температуре полностью удалить раствор для жесткой промывки.

Отмыть каждый стрип в 1 мл промывающего раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера.

Добавить по 1 мл разведенного конъюгата (см. выше) в каждый стрип и инкубировать 30 мин на платформе шейкера.

Удалить раствор и промыть каждый стрип дважды по 1 мин в 1 мл промывающего раствора (RIN) и один раз 1 мин в 1 мл дистиллированной воды.

Добавить по 1 мл разведенного субстрата (см. выше) в каждый стрип и инкубировать без встряхивания, защищая от света.

В зависимости от условий теста (например, температуры в комнате) время инкубации субстрата, пока полоски не станут четко видимыми, может варьировать от 3 до 20 мин.

Как только полоски станут четко видимыми, остановить реакцию быстрым двукратным промыванием дистиллированной водой.

Пинцетом удалить стрипы из ванночки и высушить их между двумя слоями фильтровальной бумаги.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Обсеменение здоровой ткани легкого микобактериями туберкулеза в ходе забора биологического материала.

2. Внутрибольничная трансмиссия туберкулезной инфекции в ходе неправильной транспортировки биологического материала.

3. Контаминация материала на этапах забора, транспортировки в лабораторию и на этапе микробиологической лаборатории в результате нарушения правил выполнения данных этапов.

4. Инфицирование медицинского персонала при нарушении соблюдения мер инфекционного контроля и неиспользовании или неправильном использовании средств индивидуальной защиты.

Пути устранения возможных осложнений

1. Инфекционный контроль при разделении потоков пациентов (для исключения трансмиссии инфекции до забора биологического материала).

2. Соблюдение основных технических принципов выполнения торакальных хирургических вмешательств с целью предотвращения образования инфекционного аэрозоля, снижение, риска обсеменения здоровой ткани легкого микобактериями туберкулеза и возникновения послеоперационных осложнений.

3. Соблюдение основных технических принципов работы с диагностическим материалом в микробиологической лаборатории, что снижает риск контаминации биологического препарата и получения ошибочных результатов метода.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Использование бактериологических и молекулярно-генетических методов включает гомогенизацию, деконтаминацию и концентрацию ткани биологического материала (резецированных участков легочной ткани). Гомогенизация ткани легкого представляет потенциальный риск образования инфекционного аэрозоля, содержащего возбудитель туберкулеза, что может приводить к опасности инфицирования, перекрестной контаминации образцов и ложным результатам метода. Обработка биологического материала должна производиться в лабораториях, соответствующих требованиям инфекционного контроля и безопасности: обязательное использование боксов биологической безопасности 2 класса, респираторов, перчаток, медицинских халатов в соответствии с Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).