

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

27
2015 г.

Регистрационный № 173-1/15



**АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
НЕТУБЕРКУЛЁЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

д.м.н. Скрягина Е.М., Залуцкая О.М., д.м.н., профессор Суркова Л.К.,
Кралько В.Я., Лобик В.И.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
27.11.2015
Регистрационный № 173-1115

**АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р мед. наук Е.М. Скрягина, О.М. Залуцкая, д-р мед. наук, проф.
Л.К. Суркова, В.Я. Кралько, В.И. Лобик

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм выделения и идентификации нетуберкулезных микобактерий (НТМ), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику микобактериоза. Суть заключается в одновременном использовании молекулярно-генетических, бактериологических, иммунохроматографических методов, позволяющих дифференцировать микобактерии туберкулеза (МБТ) и нетуберкулезные микобактерии для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий.

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров, врачей-терапевтов, врачей-пульмонологов, врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с микобактериозом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Аппарат для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину

2. Бокс биологической безопасности 2-го класса

3. Вытяжной шкаф.

4. Автоматизированная система для детекции микобактерий.

5. Термостат.

6. Вортекс-шейкер 250–3000 об./мин.

7. Амплификатор.

8. ПЦР-бокс.

9. Термошейкер 250–3000 об./мин.

10. Центрифуга на 12000 об./мин и более.

11. Твердотельный термостат.

12. Автоклав.

13. Холодильник.

14. Дозаторы переменного объема.

Расходные материалы:

1. Пробирки центрифужные стерильные объемом 50 мл из полипропилена высокой плотности с коническим дном

2. Картриджи к аппарату для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину.

3. Материалы расходные к автоматизированной системе для детекции микобактерий.

4. Тест-системы для молекулярно-генетической идентификации микобактерий.

5. N-ацетил-L-цистеин.

6. NaOH.

7. Фосфатный буфер

8. Пробирки культуральные стеклянные.

9. Пипетки пастеровские стерильные объемом 1 и 3 мл.

10. Наконечники одноразовые пластиковые разного объема с аэрозольным барьером и без него.

11. Перчатки одноразовые без талька.

12. Пакеты для автоклавирования.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- длительно протекающие респираторные заболевания при исключении туберкулеза легких;

- хронические болезни легких в настоящее время или в анамнезе;

- туберкулез в анамнезе;

- пневмокониозы или контакт с промышленной пылью;

- ВИЧ-инфекция;

- нарушения иммунитета после трансплантации органов;

- аутоиммунные заболевания.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют..

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1 этап — микроскопическое исследование 3 образцов мокроты на кислотоустойчивые бактерии (КУБ).

2 этап — молекулярно-генетическое исследование (МГИ) 1 образца мокроты с использованием аппарата для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину.

3 этап — культуральное исследование 2 образцов мокроты на плотных питательных средах и с использованием автоматизированной системы для детекции микобактерий.

4 этап — выделение чистой культуры микобактерий. Предварительная идентификация.

5 этап — молекулярно-генетическая идентификация микобактерий.

1-й этап — микроскопическое исследование 3 образцов мокроты на КУБ

1. Пациент под контролем медработника собирает 3 образца мокроты в пробирки центрифужные стерильные объемом 50 мл из полипропилена высокой плотности с коническим дном.

2. Образцы мокроты доставляют в бактериологическую лабораторию ПТО для исследования.

3. Микроскопическое исследование мазка мокроты по Цилю–Нильсену выполняют в соответствии с Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).

Длительность исследования — 2 ч.

Возможно получение следующих результатов исследования:

- отрицательный результат — КУБ не обнаружены;

- положительный результат — КУБ обнаружены (КУБ 3–9 в 100 полях зрения, КУБ 1+, КУБ 2+, КУБ 3+).

2-й этап — молекулярно-генетическое исследование 1 образца мокроты с использованием аппарата для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину

1. Картридж к аппарату для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину маркируют в соответствии с номером исследуемого образца.

2. К 0,7 мл мокроты добавляют двойной объем (1,4 мл) реагента, используемого для деконтаминации и разжижения исследуемого образца.

3. Пробирку интенсивно встряхивают 10–20 раз или перемешивают на вихре в течение 10 с.

4. Образец инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин, затем вновь интенсивно встряхивают 10–20 раз или перемешивают на вихре в течение 10 с.

5. Образец инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин.

6. 2 мл обработанного образца переносят в картридж.

7. Картридж загружают в прибор для исследования.

8. Учитывают и интерпретируют результаты.

Длительность исследования — 2 ч.

Возможно получение следующих результатов исследования:

- отрицательный результат — ДНК МБТ не обнаружена;

- положительный результат — ДНК МБТ обнаружена с или без устойчивости к рифампицину.

9. Проводят предварительную интерпретацию результатов микроскопического и молекулярно-генетического исследования:

КУБ+ МГИ+ — наличие в образце МБТ (МБТ+НТМ);

КУБ– МГИ+ — наличие в образце МБТ (МБТ+НТМ);

КУБ+ МГИ– — наличие в образце НТМ;

КУБ– МГИ– — не исключено наличие в образце НТМ и МБТ.

3-й этап — культуральное исследование 2 образцов мокроты на плотных питательных средах и с использованием автоматизированной системы для детекции микобактерий

Культуральное исследование (посев) выполняют в соответствии с Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).

Возможно получение следующих результатов исследования:

- отрицательный результат — культура микобактерий не выделена;

- положительный результат — культура микобактерий выделена.

4-й этап — выделение чистой культуры микобактерий. Предварительная идентификация

1. Оценивают скорость роста микобактерий на плотных и в жидкой питательной средах. Среднее время детекции роста МБТ на плотных питательных средах составляет 25–30 дней, быстрорастущих НТМ — менее 5 дней. Среднее время детекции роста МБТ в жидкой среде составляет 7–14 дней, быстрорастущих НТМ — менее 3 дней.

2. Оценивают характер роста МБ, выросших на плотных питательных средах. Для МБТ характерны сухие, морщинистые, кремовые, плохо суспендирующиеся колонии. Для НТМ характерны гладкие, влажные, хорошо суспендирующиеся колонии. Для некоторых видов НТМ характерно образование пигмента (желтого, оранжевого).

3. Оценивают характер роста МБ, выросших в жидкой питательной среде. Обычно в жидкой среде МБТ растут в виде зерен или белых хлопьев на дне пробирки, при этом прозрачность среды может почти не меняться. Для НТМ характерен рост, вызывающий помутнение среды.

4. Проводят микроскопическое исследование мазка выделенной культуры по Цилю–Нильсену. Оценивают морфологию, кислотоустойчивость бактерий, наличие корд-фактора, который является характерной особенностью МБТ.

5. Проводят иммунохроматографическую (ИМХ) идентификацию микобактерий на основании обнаружения белка МРТ64 (МРВ64), что свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к комплексу *M. tuberculosis*.

6. Проводят предварительную интерпретацию результатов микроскопического и иммунохроматографического исследования:

Корд-фактор+ ИМХ+	– наличие в образце МБТ;
Корд-фактор+ ИМХ–	– не исключено наличие в образце МБТ;
Корд-фактор– ИМХ–	– наличие в образце НТМ;
Корд-фактор– ИМХ+	– не исключено наличие в образце МБТ и НТМ.

5-й этап — молекулярно-генетическая идентификация микобактерий

Идентификация микобактерий молекулярно-генетическим методом проводится с использованием тест-системы для молекулярно-генетической идентификации микобактерий в соответствии с инструкцией по применению тест-системы.

1. Выделяют ДНК микобактерий из культуры, выросшей на плотной или в жидкой питательной среде.

2. Проводят амплификацию с биотинилированными праймерами для получения ампликонов с уникальной для каждого вида МБ последовательностью нуклеотидов.

3. Проводят множественную обратную гибридизацию на стрипах.

4. Оценивают результат с использованием шаблона профиля гибридизации, входящего в состав набора.

Возможно получение следующих результатов исследования: МБТ, определение вида НТМ.

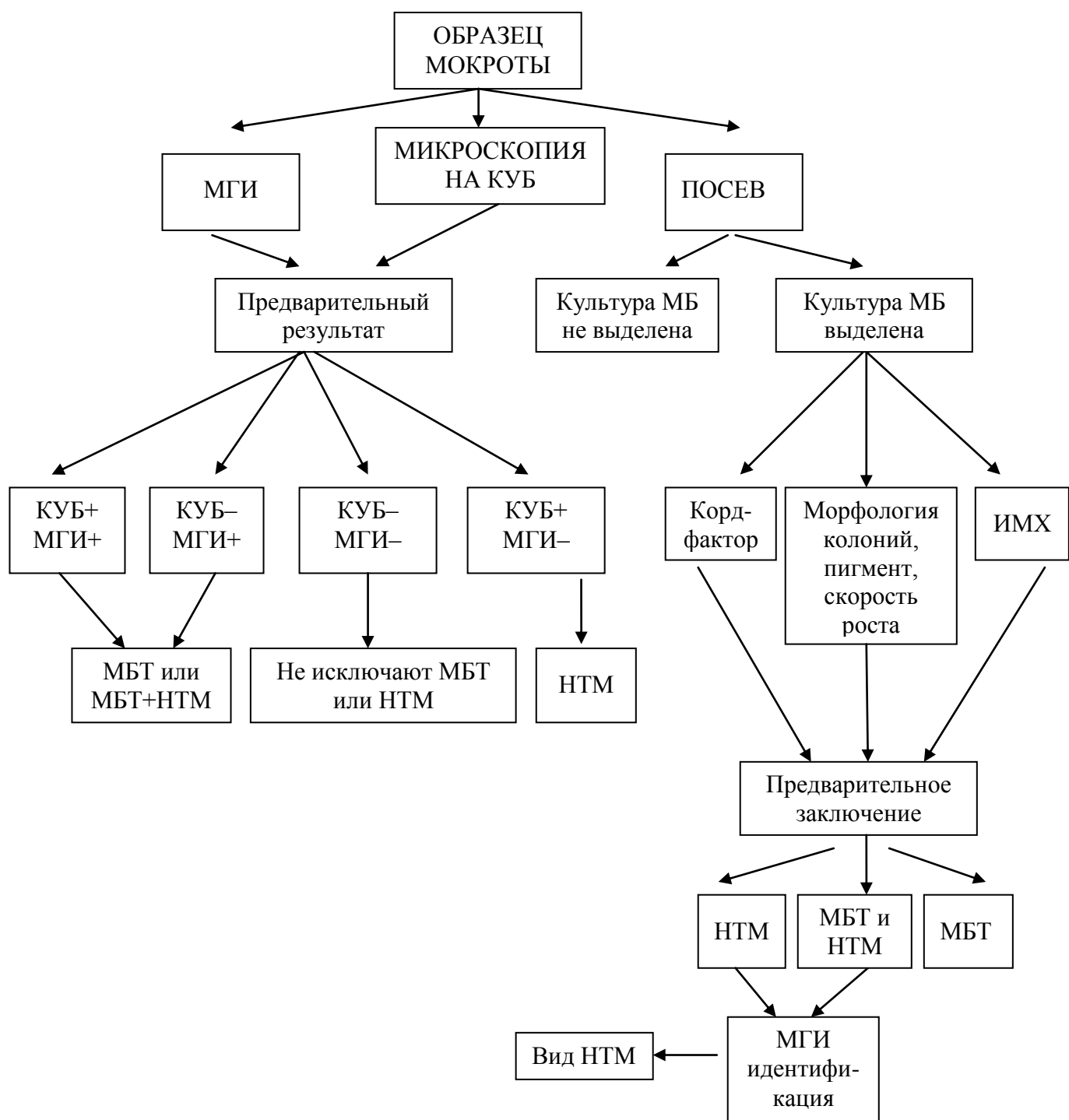


Рисунок — Алгоритм выделения и идентификации нетуберкулёзных микобактерий

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибочные результаты при выделении и идентификации НТМ могут быть получены при нарушении условий сбора (плохое качество мокроты) и хранения диагностического материала.

Хранить диагностический материал следует при $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ не более 72 ч. Транспортировка должна производиться с специальным контейнере.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Использование бактериологических и молекулярно-генетических методов включает гомогенизацию, деконтаминацию и концентрацию диагностического материала. Указанные процедуры связаны с потенциальным риском образования инфекционного аэрозоля, что ведет к риску инфицирования, возможной перекрестной контаминации образцов и ложноположительным результатам. Обработка диагностического материала должна проводиться в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности с использованием соответствующего оборудования (бокс биологической безопасности 2-го класса, вытяжной шкаф, автоклав) и средств индивидуальной защиты (респираторы, перчатки, медицинские халаты) в соответствии с Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).