

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.



Регистрационный № 118-1115

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И РАКА ЛЕГКОГО**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

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

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ:

д.м.н. Скрягина Елена Михайловна, д.м.н., профессор Суркова Лариса
Константиновна, к.м.н. Яцкевич Наталья Викторовна, Залуцкая Оксана
Михайловна, д.м.н., профессор Курчин Вячеслав Петрович, д.б.н., доцент
Смолякова Раиса Михайловна

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

27.11.2015

Регистрационный № 118-1115

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
И РАКА ЛЕГКОГО**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Е.М. Скрягина, д-р мед. наук, проф. Л.К. Суркова, канд. мед. наук Н.В. Яцкевич, О.М. Залуцкая, д-р мед. наук, проф. В.П. Курчин, д-р биол. наук, доц. Р.М. Смолякова

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод дифференциальной диагностики туберкулеза и рака легкого, который заключается в одновременном гистологическом, гистобактериологическом и молекулярно-генетическом исследовании ткани биопсийного либо резекционного материала легкого и быстрого определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ).

Инструкция предназначена для врачей-фтизиатров, врачей-онкологов, врачей-хирургов, врачей-бактериологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с туберкулезом и раком легкого.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Аппарат для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину.
2. Амплификатор в реальном времени с многоканальным лазером.
3. Оборудование для гибридизации ДНК на стрипах с ДНК-зондами.
4. Вортекс-шейкер 250–3000 об./мин
5. Центрифуга на 12000 об./мин и более.
6. Водяная баня.
7. Холодильник
8. Весы аналитические точностью 0,01–0,1 мг
9. Морозильная камера
10. Бокс биобезопасности II класса.
11. УФ-лампа.
12. Автоклав.
13. Вытяжной шкаф.
14. Твердотельный термостат.
15. Гомогенизатор ткани.

Расходные материалы:

1. Картриджи с реагентами к аппарату для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину.
2. Тест-системы для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к рифампицину и фторхинолонам (в режиме реального времени) — ТУ ВУ 600052478.001-2011, ТУ ВУ 600052478.002-2015.
3. Тест-системы для ускоренной молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, аминогликозидам/циклопептидам, фторхинолонам.
4. Стерильный изотонический раствор хлорида натрия.
5. 4%-й раствор серной кислоты
6. Осаждающая суспензия, используемая в молекулярно-генетических исследованиях.
7. Стерильный песок.
8. Наконечники одноразовые пластиковые объемом 0,5–250; 200–1000 мкл с

аэрозольным барьером и без него

9. Стерильные пробирки.

10. Стерильные контейнеры.

11. Дозаторы переменного объема на 0,5–10; 5–50; 20–200; 200–1000 мкл.

12. Одноразовые перчатки без талька.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клинико-рентгенологическая симптоматика, проявляющаяся легочной диссеминацией, округлыми образованиями и очагово-инфильтративными изменениями в легких, требующая дифференциальной диагностики туберкулеза и рака легкого.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказания включают таковые для видеоассистированной торакоскопии (ВАТС) с биопсией легкого:

- легочная гипертензия;
- выраженный обструктивный синдром;
- тяжелые сердечно-сосудистые заболевания;
- выраженный плевральный спаечный процесс.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1 этап — ВАТС и/или торакотомия и срочное гистологическое исследование ткани биопсийного либо резекционного материала легкого.

2 этап — молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани биопсийного либо резекционного материала легкого, позволяющее обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину.

3 этап — гистобактериологическое исследование: посев гомогената ткани биопсийного либо резекционного материала легкого для выделения и идентификации культуры МБТ.

4 этап — выделение ДНК из чистой культуры МБТ.

5 этап — полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации фрагментов генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью и детекции продуктов амплификации.

Этапы 2–5 проводятся в бактериологической лаборатории противотуберкулезных учреждений здравоохранения (далее — ПТУ).

1-й этап — ВАТС и/или торакотомия и срочное гистологическое исследование ткани биопсийного либо 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 рака легкого, невозможности установления диагноза клинико-рентгено-томографическими и лабораторно-инструментальными методами осуществляется ВАТС и/или торакотомия с биопсией 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 срочное гистологическое исследование.

3. При гистологическом диагнозе «туберкулез» или «подозрение туберкулеза» часть биоптата легкого доставляется в специализированную бактериологическую лабораторию ПТУ в стерильном контейнере для молекулярно-генетического исследования, позволяющего обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину, гистобактериологического исследования для выделения и идентификации культуры МБТ.

2-й этап — молекулярно-генетическое исследование гомогената ткани биопсийного либо резекционного материала легкого, позволяющее обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину

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

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

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

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

Полученная гомогенная суспензия используется для посева на питательную среду для гистобактериологического исследования.

5. Картридж к аппарату для быстрой одновременной детекции ДНК МБТ и устойчивости МБТ к рифампицину маркируется в соответствии с номером исследуемого образца ткани.

6. 0,7 мл гомогенизированного образца ткани переносится в коническую пробирку с завинчивающимся колпачком для молекулярно-генетического исследования.

Необходимо избегать переноса кусочков ткани, которые не были гомогенизированы.

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

8. Пробирка интенсивно встряхивается 10–20 раз или перемешивается на вортексе не менее 10 с.

9. Образец инкубируется 10 мин при комнатной температуре и затем вновь интенсивно встряхивается 10–20 раз или перемешивается на вортексе не менее 10 с.

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

11. 2 мл обработанного образца переносится в картридж.

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

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-).

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 можно не более 48 ч в холодильнике при $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3-й этап — гистобактериологическое исследование: посев гомогената ткани биопсийного либо резекционного материала легкого для выделения и идентификации культуры МБТ

Часть полученного гомогената ткани легкого (2-й этап, п. 4) подвергается 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 исследуемого образца гомогената ткани легкого:

- отрицательный результат — культура МБТ не выделена;
- положительный результат — культура МБТ выделена.

4-й этап — выделение ДНК из чистой культуры МБТ

1. Пробирка объемом 1,5 мл маркируется в соответствии с номером исследуемого образца ткани, в нее вносится 250 мкл стерильной осаждающей суспензии, применяемой при молекулярно-генетических исследованиях.

2. Культура исследуемой МБТ в количестве 1-го бактериологического шпателя вносится в пробирку.

3. Проба, внесенная в осаждаемую суспензию, нагревается на водяной бане при 98°C 30 мин либо в твердотельном термостате при 95°C 20 мин.

4. После температурной обработки содержимое пробирок центрифугируется при 12000 об./мин 20 мин.

5. Полученная надосадочная жидкость переносится в новую пробирку, которая маркируется соответствующим образом.

Для дальнейших исследований экстрагированная ДНК хранится в течение суток при $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ либо 1 мес. при температуре -16°C и ниже. Перед исследованием ДНК тщательно ресуспензируется (20 с) на вортексе. Пробы с нерастворимым осадком отклоняются и не используются для дальнейших исследований.

5-й этап — ПЦР для амплификации фрагментов генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью и детекции продуктов амплификации

Определение лекарственной чувствительности МБТ к ПТЛС I–II ряда

молекулярно-генетическим методом (ПЦР в реальном времени или гибридизация с ДНК зондами) проводится с использованием тест-систем для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к ПТЛС (рифампицину, изониазиду, этамбутолу, аминогликозидам/циклопептидам, фторхинолонам) в полном соответствии с инструкцией по применению тест-систем, руководством к использованию тест-систем.

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

Для гистобактериологического и молекулярно-генетических исследований биопсийный или резекционный материал должен быть нативным, нефиксированным и стерильным.

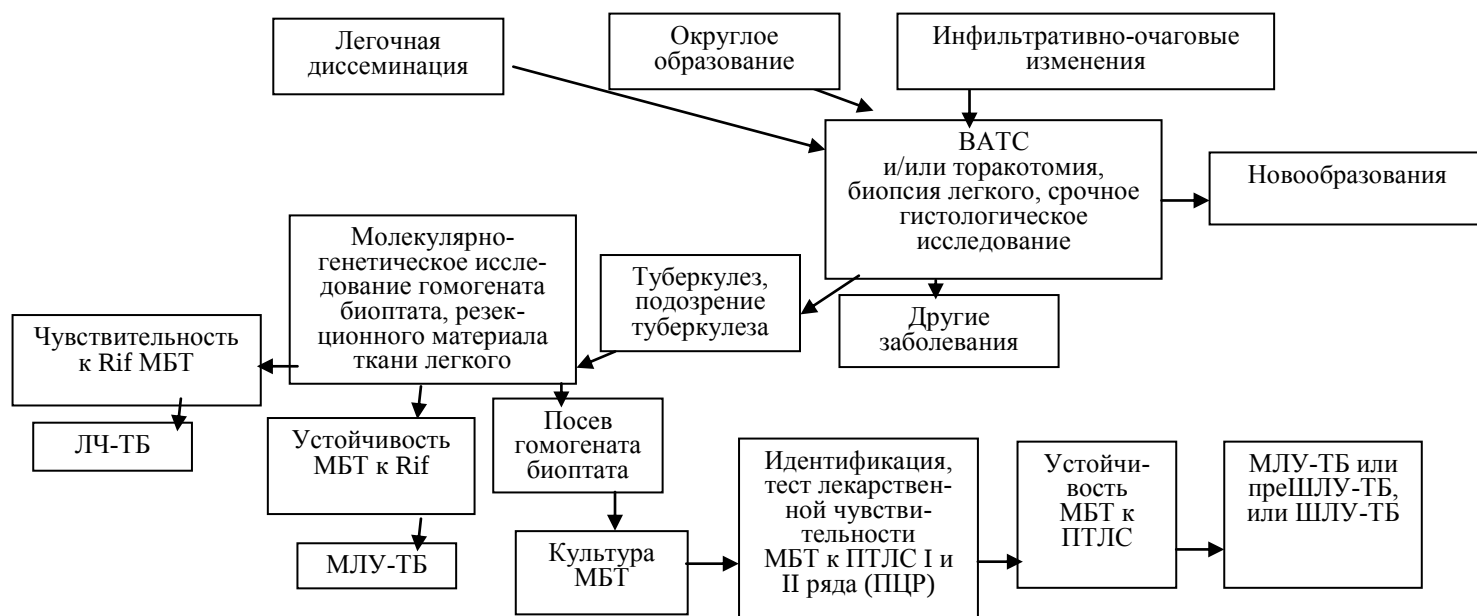


Рисунок — Алгоритм дифференциальной диагностики туберкулеза и рака легкого, проявляющихся легочными диссеминациями, округлыми образованиями и инфильтративно-очаговыми изменениями

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;
- внутриплевральное кровотечение.

Ошибочные результаты при комплексной дифференциальной диагностике туберкулеза и рака легкого могут быть получены при нарушении условий взятия

тканевого материала (несоблюдение стерильных условий), при неинформативности биоптата из-за «погрешности» и неадекватного забора материала.

Хранить биопсийный и операционный 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.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Использование бактериологических и молекулярно-генетических методов включает гомогенизацию, деконтаминацию и концентрацию ткани биопсийного либо резекционного материала легкого. Гомогенизация ткани легкого представляет потенциальный риск образования инфекционного аэрозоля, содержащего МБТ, что ведет к риску инфицирования, возможной перекрестной контаминации образцов и к ложноположительному результату. Первичная обработка биопсийного или резекционного материала должна проводиться в лабораториях, оснащенных в соответствии с требованиями инфекционного контроля и биобезопасности: обязательное использование вытяжного шкафа, боксов биологической безопасности 2-го класса, респираторов, перчаток, медицинских халатов (в соответствии Руководством по лабораторной диагностике туберкулеза — приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 377 от 22.03.2013).