

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь
_____ Е. Н. Кроткова
« 24 » _____ 2022 г.
Регистрационный №073-0622

АЛГОРИТМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ЦИЛИАРНЫХ ДИСКИНЕЗИЙ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доцент Бобровничай В.И.,
канд. биол. наук, доцент Рубаник Л.В., канд. биол. наук
Асташонок А.Н., Петрученя А.В., Колюпанова Т.Б., д-р. мед. наук,
профессор Полещук Н.Н.

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен алгоритм, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику первичной цилиарной дискинезии (коды МКБ-10: Q33.8, Q89.3, J98.0) с болезнями наследственной (кистозный фиброз (код МКБ-10: E84), отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (коды МКБ-10: D80-D83), бронхиальная астма (код МКБ-10: J45) и др.), врожденной (врожденные аномалии [пороки развития] органов дыхания (коды МКБ-10: Q30-Q34), врожденные аномалии [пороки развития] системы кровообращения (коды МКБ-10: Q20-Q21), и др.) или приобретенной (бронхоэктазия (код МКБ-10: J47) и др.) природы с вторичной цилиарной дискинезией.

Инструкция предназначена для врачей-педиатров, врачей-пульмонологов, врачей-оториноларингологов, врачей общей практики, врачей функциональной диагностики, врачей-лаборантов, врачей клинической лабораторной диагностики и других специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим рецидивирующими или хроническими заболеваниями дыхательной системы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие у пациента клинико-anamnestических данных: круглогодичный, торпидный к лечению ринит, рецидивирующий или хронический экссудативный отит и/или синусит, рецидивирующий или хронический бронхит, бронхоэктазы с раннего детского возраста, полное или неполное обратное расположение внутренних органов, братьев и сестёр пациента с первичной цилиарной дискинезией (ПЦД), особенно если у них есть респираторные симптомы.

Dyskinesia Rule) (таблица 1), включающая в себя 7 вопросов, каждому из которых присвоено определенное количество баллов.

Таблица 1 – Предиктивная клиническая шкала-опросник для установления клинически вероятной первичной цилиарной дискинезии

Вопрос	Ответ	Балл
Родился пациент доношенным или недоношенным?	Доношенный	2
Были ли у пациента респираторные симптомы в раннем неонатальном периоде (тахипноэ, кашель, пневмония)?	Да	2
Был ли пациент госпитализирован в отделение интенсивной терапии недоношенных?	Да	2
Имеется ли у пациента аномальное расположение внутренних органов (<i>situs inversus</i> или гетеротаксия)?	Да	4
Имеется ли у пациента врожденный дефект сердца?	Да	2
Имеется ли у пациента круглогодичный ринит?	Да	1
Имеются ли у пациента хронические симптомы со стороны органа слуха: экссудативный отит, серозный отит, снижение слуха, перфорация барабанной перепонки?	Да	1
Общее количество баллов		

К группе риска по первичной цилиарной дискинезии относятся:

- пациенты с рецидивирующим (хроническим) риносинуситом и рецидивирующим (хроническим) бронхитом с бронхоэктазами или без бронхоэктазов и сумме баллов по шкале PICADAR > 5;
- пациенты с рецидивирующими (хроническими) респираторными симптомами имеющих брата или сестру с ПЦД PICADAR > 5;
- пациенты с рецидивирующими (хроническими) респираторными симптомами, в семейном анамнезе которых имеются случаи мужского бесплодия, аномального расположения внутренних органов, хронических болезней респираторной системы.

- сеточки (гриды) для электронной микроскопии, на 200 квадратных ячеек, медные;
- наконечники полимерные для дозаторов пипеточных;
- штативы для пробирок;
- фильтровальная бумага;
- перчатки хирургические резиновые.

Реактивы:

- краситель Романовского-Гимза для световой микроскопии;
- спирт этиловый различной концентрации (30°; 50°; 70°; 96°; 100°);
- фосфатно-солевой буфер (pH 7,2-7,4) или какодилатный буфер (pH 7,3-7,4);
- реактивы для фиксации образцов (2,5% глутаровый альдегид, 1-2% тетраоксид осмия);
- специальные смолы для заливки образцов;
- другие химические реактивы (ацетон, натрия гидроксид, кислота соляная, хлороформ);
- формвар (0,5-1%) для приготовления специальной пленки на электронно-микроскопических сеточках;
- красители для электронной микроскопии: уранилацетат, цитрат свинца.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ АЛГОРИТМА

Алгоритм включает следующие этапы:

1. Отнесение пациента к группе риска по первичной цилиарной дискинезии

Учитывается характерный семейный анамнез, клиническая картина и оценка по предиктивной шкале PICADAR (PrImary CiliAry

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен алгоритм, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику первичной цилиарной дискинезии (коды МКБ-10: Q33.8, Q89.3, J98.0) с болезнями наследственной (кистозный фиброз (код МКБ-10: E84), отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (коды МКБ-10: D80-D83), бронхиальная астма (код МКБ-10: J45) и др.), врожденной (врожденные аномалии [пороки развития] органов дыхания (коды МКБ-10: Q30-Q34), врожденные аномалии [пороки развития] системы кровообращения (коды МКБ-10: Q20-Q21), и др.) или приобретенной (бронхоэктазия (код МКБ-10: J47) и др.) природы с вторичной цилиарной дискинезией.

Инструкция предназначена для врачей-педиатров, врачей-пульмонологов, врачей-оториноларингологов, врачей общей практики, врачей функциональной диагностики, врачей-лаборантов, врачей клинической лабораторной диагностики и других специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим рецидивирующими или хроническими заболеваниями дыхательной системы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Наличие у пациента клинико-anamnestических данных: круглогодичный, торпидный к лечению ринит, рецидивирующий или хронический экссудативный отит и/или синусит, рецидивирующий или хронический бронхит, бронхоэктазы с раннего детского возраста, полное или неполное обратное расположение внутренних органов, братьев и сестёр пациента с первичной цилиарной дискинезией (ПЦД), особенно если у них есть респираторные симптомы.

У пациентов с суммой баллов по шкале PICADAR ≤ 5 проводится диагностический поиск других заболеваний с приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезией согласно клиническим протоколам, утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Пациентам из группы риска по ПЦД показана диагностическая бронхоскопия с целью взятия биоптата слизистых нижних отделов респираторного тракта для проведения электронно-микроскопического анализа и атомно-силовой микроскопии и получение мазка (соскоба) из верхних дыхательных путей для цитологического исследования.

2. Электронная микроскопия

Учет результатов электронно-микроскопического анализа проводится в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Форма оценки результатов электронно-микроскопического анализа биоптата слизистых респираторного тракта

Анализируемый параметр	Референсные показатели (норма)	Результат
Формула ресничек	$(9 \times 2) + 2$	<input type="checkbox"/> норма; <input type="checkbox"/> патология
Наружные динеиновые ручки реснички	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные в поле зрения; <input type="checkbox"/> норма
Внутренние динеиновые ручки	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные в поле зрения; <input type="checkbox"/> норма
Радиальные спицы	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> норма
Центральные микротрубочки	2	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> единичные; <input type="checkbox"/> норма; <input type="checkbox"/> выше нормы (>2)
Нексиновые связки (мостики)	+	<input type="checkbox"/> не обнаружены; <input type="checkbox"/> обнаружены

При выявлении в образце одного и более из вышеуказанных дефектов в ультраструктурной организации ресничек устанавливается диагноз ПЦД.

Внимание !

1) При наличии рецидивирующего (хронического) риносинусита с рецидивирующим (хроническим) бронхитом с бронхоэктазами или без бронхоэктазов, зеркального расположения внутренних органов или гетеротаксией и суммарного балла по шкале PICADAR ≥ 10 диагноз ПЦД правомочен даже при отрицательном результате электронной микроскопии.

2) При отсутствии ультраструктурных изменений в строении ресничек рекомендован генетический анализ для диагностики ПЦД.

В случае отсутствия ультраструктурных или генетических нарушений, характерных для ПЦД, проводится анализ с помощью цитологического метода и атомно-силовой микроскопии для верификации приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии.

3. Цитологическое исследование

Анализируется эксфолиативный биоматериал слизистых оболочек верхних дыхательных путей по параметрам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 – Форма оценки результатов цитологического исследования слизистых респираторного тракта верхних дыхательных путей

Клеточный состав слизистых респираторного тракта	Референсные значения (норма) (%)	Результат
Реснитчатые эпителиоциты (РЭ)	65-80%	
Бокаловидные клетки (БК)	1-20%	
Соотношение РЭ к БК	5:1	
Не реснитчатые клетки	1-5%	
Плоский (метаплазированный) эпителий	0	
Лейкоциты (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, базофилы)	0,1-1,0%	

Если в анализируемом материале все показатели цитограммы находятся в пределах нормы приобретенная (вторичная) цилиарная дискинезия исключается. При изменении любого из показателей цитограммы материал пациента далее исследуется с помощью атомно-силовой микроскопии для верификации приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии.

4. Атомно-силовая микроскопия

Устанавливается наличие/отсутствие в образцах слизистых верхних и нижних дыхательных путей поверхностных структурных нарушений клеток на основании параметров, указанных в таблице 4.

Таблица 4 – Типы дефектов в организации цилиарного эпителия и его ресничек, выявляемых с использованием атомно-силовой микроскопии

Тип нарушений реснитчатого аппарата эпителиоидных клеток	Результат исследования (n, %)
Щеточная кайма на апикальной поверхности эпителиоцитов	<input type="checkbox"/> наличие (норма); <input type="checkbox"/> отсутствие (патология)
Длина реснички	<input type="checkbox"/> норма (8-10 мкм); <input type="checkbox"/> патология (< 8 или >10 мкм)
Толщина реснички	<input type="checkbox"/> норма (0,15-0,30 мкм); <input type="checkbox"/> патология (< 0,15 или >0,30 мкм);

Выявление одного из указанных нарушений, при отсутствии электронно-микроскопических и/или генетических дефектов характерных для ПЦД, свидетельствует о приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезии. Диагностический поиск других заболеваний с приобретенной (вторичной) цилиарной дискинезией проводится согласно клиническим протоколам, утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Методология взятия и обработки материала для исследования цитологическим, электронно-микроскопическим и атомно-силовым методами представлены в приложении 1. Этапность реализации алгоритма схематично отражена в приложении 2.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не выявлено. Ошибки могут быть обусловлены:

неправильным взятием нужного количества столбика ткани (биоптата) (менее 1 мм^3) и временем его фиксации;

использованием просроченных или неправильно хранившихся реагентов;

неправильным разведением реактивов, приготовлением заливочных смол, несоблюдением температурного режима при выполнении методики;

при отсутствии или недостаточном количестве (менее 10) в анализируемом образце структурных элементов анализируемой ткани.

Во избежание возникновения ошибочных результатов необходимо строго соблюдать все методические правила как при выполнении биопсии, так и проведении исследований.

Взятие и обработка материала для исследования цитологическим, электронно-микроскопическим и атомно-силовым методами

– Взятие и обработка мазков из верхних дыхательных путей для цитологического исследования. Взятие соскобного материала проводят без предварительного очищения пациентом верхних дыхательных путей. Процедура включает следующие этапы: 1) запрокидывание головы пациента под углом 90°; 2) введение в полость носа стерильной цитологической щетки («зонда Юнона») на расстоянии 1,5-2 см; 3) мягкое прокручивание цитощеткой носового хода (не менее трех раз по часовой стрелки); 4) нанесение и равномерное распределение биоматериала путем прокатывания по обезжиренному предметному стеклу, маркировка; 5) высушивание препарата в течение 5-10 минут с последующей его фиксацией 96% этиловым спиртом в течение 5 минут; б) окрашивание по методу Романовского-Гимза в течение 20 минут, с последующей отмывкой дистиллированной водой.

– Взятие и пробоподготовка биоматериала из нижних дыхательных путей для исследования электронно-микроскопическим методом и с помощью атомно-силовой микроскопии.

Используется аппарат для гибкой бронхоскопии с рабочим каналом не менее 2,0 мм. Процедура взятия материала проводится в стерильных условиях операционного зала. Пациента, лежащего на спине, обезболивают с помощью общей анестезии. Затем бронхоскоп вводят через нижний носовой ход в нижнюю носовую раковину, и, далее – в гортань до трахеи и/или главного бронха.

Для взятия биопсийного материала и последующего исследования с помощью атомно-силовой микроскопии используют щёточку для

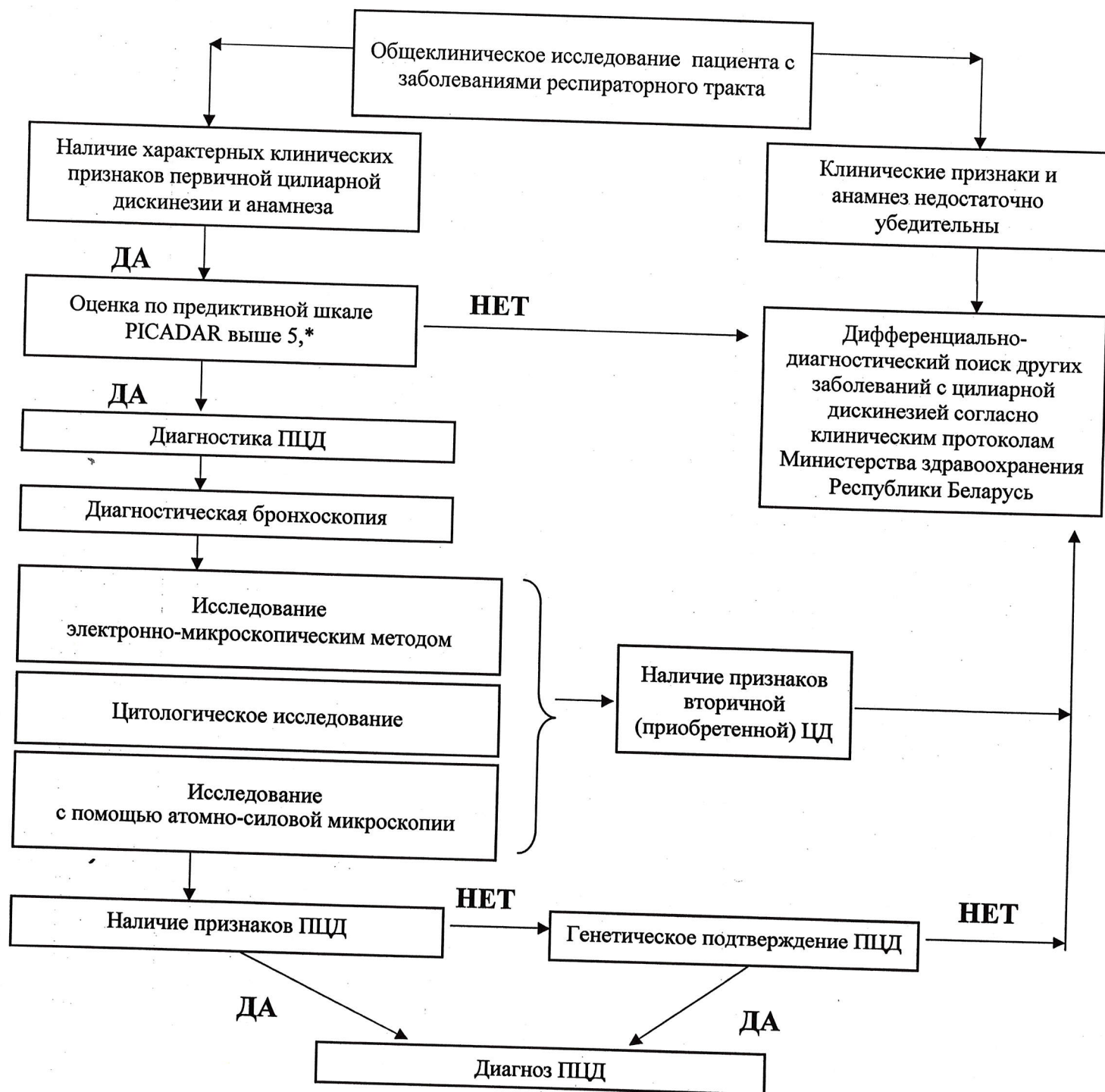
цитологии диаметром 1,2 мм и длиной щетки 10 мм, рабочей длиной изделия 1150 мм. После введения осуществляют мягкое прокручивание цитощеткой не менее трех раз по часовой стрелки, извлекают её и наносят материал путем прокатывания по обезжиренному покровному стеклу. Далее материал фиксируют 96% этиловым спиртом в течение 5 минут.

Для взятия биопсийного материала с целью электронно-микроскопического исследования используют щипцы диаметром 1,2-1,8 мм, их подводят перпендикулярно к месту взятия, открывают бранш, упирают в слизистую трахеи или бронха, закрывают бранш, затем извлекают щипцы с фрагментом биологического материала для исследования.

Материал фиксируется 2 часа в 2,5%-глютаровом альдегиде, приготовленном на 0,1 М Na-какодилатном буфере (pH 7,4), постфиксируется 1 час в 1% OsO₄, обезвоживается в спиртах восходящей концентрации, далее заливается в специальные смолы для получения блоков для нарезки. Из блоков с использованием ультрамикротомы готовят ультратонкие срезы, монтируют их на специальные медные сеточки с нанесенной формаваровой пленкой и затем окрашивают 1% раствором уранилацетата и цитратом свинца. Образцы исследуют при помощи электронного микроскопа, оснащенного цифровой камерой при различных инструментальных увеличениях x8000-x100 000.

К материалу прилагается направление с указанием фамилии, имени и отчества пациента, пола и возраста, даты взятия и наименования материала, клинического диагноза.

Алгоритм исследования пациента для диагностики цилиарных дискинезий различного генеза



*При наличии синдрома Картагенера и суммарного балла по шкале PICADAR ≥ 10 диагноз ПЦД правомочен даже при отрицательном результате электронной микроскопии.