

УДК 616-03:08/614-2

РЕОРГАНИЗАЦИЯ СЕТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ: ОПЫТ БЕЛАРУСИ*Е.М. Скрягина, О.М. Залуцкая, О.М. Калечиц**ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Беларусь***REORGANIZATION OF THE TB LABORATORY NETWORK IN THE CONTEXT OF HIGH PREVALENCE OF MULTI-DRUG RESISTANCE: THE EXPERIENCE OF BELARUS***E.M. Skryahina, O.M. Zalutskaya, O.M. Kalechits***Лучшие практики**

От редакции: Представляем Вашему вниманию статью наших белорусских коллег, в которой обобщен их опыт реорганизации лабораторной сети противотуберкулезных учреждений. В статье приводятся данные сравнительных исследований различных методов микробиологических исследований, проведенных в Беларуси, описана перестройка лабораторной сети, направленная на концентрацию исследований в хорошо оснащенных центрах с управляемым и контролируемым качеством исследований.

Резюме

Результаты исследования по надзору за лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ) в Республике Беларусь показали, что уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов составил 32,7%, среди ранее леченных – 76,6%. (В Российской Федерации 21,9% и 58,5%). Уровень ШЛУ составил 1,7%, и 16,5% соответственно. Была усовершенствована лабораторная служба Республики Беларусь с созданием хорошо оснащенной 3-х уровневой сети во главе с Республиканской референс-лабораторией (РРЛ), функционирующей на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии». В результате реорганизации лабораторной службы бактериологическая верификация туберкулеза выросла с 43,8% в 2007 г. до 76,0% в 2012 г. Внедрение в практику автоматизированных систем и молекулярно-генетических методов детекции МБТ и определения лекарственной чувствительности позволили сократить сроки диагностики туберкулеза в 2-3 раза, своевременно назначить адекватный режим химиотерапии, снизить частоту развития МЛУ МБТ. Авторами предложен алгоритм лабораторной диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости МБТ с использованием ускоренных методов.

Reorganization of the TB laboratory network in the context of high prevalence of multi-drug resistance: the experience of Belarus

E.M. Skryahina, O.M. Zalutskaya, O.M. Kalechits

Republican scientific-practical center of pulmonology and Phthisiology, Minsk, Belarus

Resume

The results of the observation study of drug resistance of Mycobacteria tuberculosis (TB) in Belarus Republic showed that the incidence of multi drug resistance (MDR) among newly revealed patients was 32,7%, among previously treated – 76,6% (in Russian Federation – 21,9% and 58,5% respectively). Extensively drug-resistant tuberculosis was 1,7% and 16,5% respectively. The laboratory service of Belarus Republic was improved by foundation of highly equipped 3-dimensional network with the head Republic Reference Laboratory (RRL), which functions on the basis of the State establishment “Republic scientific-practical center of pulmonology and phthisiology”. Reorganization of laboratory service resulted in increase of bacteriological verification of tuberculosis from 43,8% in 2007 to 76,0% in 2012 year. Implementation into practice the automated systems and molecular-genetic methods of MDR TB detection and de-termination of drug sensitivity allowed 2-3 fold reduction of the time needed for TB diagnostics, to prescribe in proper time the adequate chemotherapy regimen, decrease the incidence of MDR TB development. Authors suggested the algorithm of laboratory diagnostics of tuberculosis and drug resistance MDR using shortcut methods.

Введение

Эпидемическая ситуация по туберкулезу в мире продолжает оставаться напряженной. Особенно настораживает тенденция к нарастанию доли лекарственно устойчивых форм туберкулеза. По данным ВОЗ за 2012 год, в мире насчитывается 310000 (220000-400000) случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), среди которых доля пациентов с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ) составляет 9% (6,7 – 11,2%) [6]. Республика Беларусь занимает одно

из первых мест среди стран Европейского региона ВОЗ по высокому уровню распространенности МЛУ-ТБ [8].

Результаты исследования по надзору за лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ), проведенного в республике в сотрудничестве с ВОЗ [6, 7], показали, что уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов составил 32,7%, среди ранее леченных -76,6%. Уровень ШЛУ среди вновь выявленных пациентов составил 1,7%, среди ранее леченных - 16,5% [9]. В Российской Федерации уровень распространения штаммов МБТ с МЛУ среди впервые выявленных пациентов составил 21,9%, среди ранее леченных - 58,5% [4].

Мероприятия по обеспечению качества работы

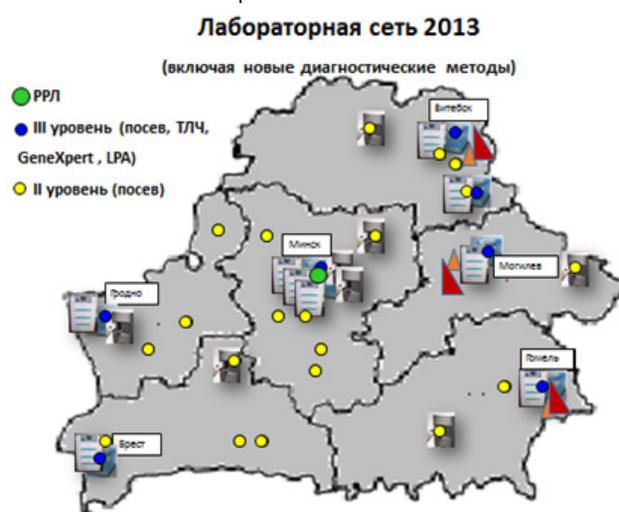


Рисунок 1. Лабораторная сеть (включая новые диагностические методы) в Республике Беларусь по диагностике туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм.

В задачи лабораторий I уровня входит выполнение микроскопии мазка на кислотоустойчивые бактерии (КУБ). Как правило, это лаборатории ЦРБ, где проводятся данные исследования для жителей всего района. Благодаря централизации исследований в крупных лабораториях нам удалось повысить результативность микроскопии мазка на КУБ с 0,5-0,7% в 2006-2009гг. до 1,5-2,5% в 2011-2012 гг.

Бактериологические лаборатории II уровня (городские и районные противотуберкулезные диспансеры (ПТД)) выполняют посев на МБТ. Бактериологические лаборатории III уровня (областные ПТД), кроме этого, проводят тесты на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) МБТ, оснащены автоматизированными системами для ускоренной детекции МБТ, а также оборудованием для молекулярно-генетических исследований. Быстрое выявление МЛУ-ТБ с использованием GeneXpert применяется и в лабораториях II уровня в районах с высокой заболеваемостью туберкулезом.

лабораторий входят в число приоритетных направлений в деятельности медицинских организаций. Опыт нашей работы показывает, что высокого качества исследований можно добиться только в крупных бактериологических лабораториях, укомплектованных подготовленными специалистами и оснащенных современными автоматизированными системами и оборудованием для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза [5].

Министерством здравоохранения проведена реорганизация и модернизация бактериологической службы республики с созданием 3-х уровневой лабораторной сети (рисунок 1).

Во главе созданной лабораторной сети стоит Республиканская референс-лаборатория (РРЛ), функционирующая на базе государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», выполняющая все виды исследований и осуществляющая на постоянной основе контроль качества бактериологических исследований, мониторинг лекарственной устойчивости МБТ, а также апробацию и внедрение новых методов диагностики. Качество тестов РРЛ на лекарственную чувствительность МБТ проверяется Супранациональной референс-лабораторией ВОЗ/ IUATLD в Стокгольме (Швеция). В результате реорганизации лабораторной службы бактериологическая верификация туберкулеза выросла с 43,8% в 2007 г. до 76,0% в 2012 г.

В последние годы в республике большое внимание уделяется внедрению в практику автоматизированных систем и молекулярно-генетических методов детекции МБТ и определения лекарственной чувствительности,

которые сокращают сроки диагностики туберкулеза в 2-3 раза по сравнению с традиционными методами, что позволяет клиницисту правильно установить диагноз туберкулеза, своевременно назначить адекватный режим химиотерапии, снизить частоту

развития МЛУ МБТ.

Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики туберкулеза представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики туберкулеза

Метод	Принцип метода	Чувствительность метода	Длительность исследования	Специфичность	Кратность	Результат исследования
Бактериологическое исследование (посев) с использованием плотных питательных сред	Обнаружение жизнеспособных микобактерий (колонии на поверхности питательных сред)	10-100 клеток в пробе	21-56 дней	Высокая	Двукратно с целью диагностики	Культура микобактерий выделена
						Культура микобактерий не выделена
					Ежемесячно двукратно при мониторинге лечения	Культура микобактерий выделена
						Культура микобактерий не выделена
Бактериологическое исследование (посев) с использованием автоматизированных систем (ВАС-ТЕС MGIT 960)	Обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса	10-100 клеток в пробе	5-42 дней	Высокая	Двукратно	Культура микобактерий выделена
						Культура микобактерий не выделена
GeneXpert	Обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса	100% для КУБ+ образцов, 70% для КУБ- образцов	2 часа	Не различает живые и мертвые клетки	Однократно	ДНК микобактерий обнаружена
						ДНК микобактерий не обнаружена
LPA (Хайн-тест)	Обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса	95% для КУБ+ образцов, 60% для КУБ- образцов	1-2 дня	Не различает живые и мертвые клетки	Однократно	ДНК микобактерий обнаружена
						ДНК микобактерий не обнаружена

Как видно из таблицы 1, ускоренные методы бактериологической диагностики туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм имеют существенные преимущества по длительности исследования по сравнению с традиционным исследованием (посевом) с использованием плотных питательных сред, не уступая последнему по достоверности полученных результатов. Для своевременной диагностики туберкулеза важно использовать такие методы, как GeneXpert и LPA, с помощью которых результат можно получить в течение одного дня. При наличии клинических признаков, характерных для туберкулеза

легких, положительный тест на ДНК микобактерий помогает врачу установить диагноз туберкулеза и начать лечение пациента, не дожидаясь результата посевов на плотных питательных средах.

Ускоренные методы бактериологической диагностики МБТ нами в последние годы широко используются для определения лекарственной чувствительности микобактерий. Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960 позволяет определить чувствительность МБТ к основным противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС): стрептомицину (S), изониазиду

(H), рифампицину (R), этамбутолу (E), пиазинамиду (Z), а также к ПТЛС резервного ряда: левофлоксацину (Lfx), (офлоксацину (Ofx)), капреомицину (Cm), канамицину (Km), моксифлоксацину (Mfx), амикацину (Am). В значительной степени решает проблему лекарственной чувствительности МБТ использование молекулярно-генетических методов, основанных

на определении точечных мутаций или других генетических маркеров резистентности микобактерий к ПТЛС (H, R, фторхинолонам (Fq), аминогликозидам (AG/CP), этамбутолу) [2].

Сравнительная характеристика методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза представлена в табл. 2.

Таблица 2.

Сравнительная характеристика методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза

Метод	Принцип метода	ПТЛС, к которым выполняется ТЛЧ	Достоверность результата	Длительность исследования	Вариант результата	Клиническая интерпретация
Бактериологическое исследование (посев) с использованием плотных питательных сред	Ингибирование роста микобактерий при выращивании на питательных средах, содержащих определенные концентрации ПТЛС (колонии на поверхности питательной среды)	H,R,S,E, Ofx, Cm, Am, Km	Высокая	28 дней	Чувствительность	ЛЧ-ТБ
		Eto/Pto, Cs, PAS	Низкая		Устойчивость	ЛУ-ТБ
Бактериологическое исследование (посев) с использованием автоматизированных систем (BactecMGIT 960)	Ингибирование роста микобактерий при выращивании на питательных средах, содержащих определенные концентрации ПТЛС (наличие флюоресценции в пробирке с культурой микобактерий)	H,R,S,E, Lfx, Mfx, Cm, Am, Km	Высокая	7-14 дней	Чувствительность	ЛЧ-ТБ
		Z	Низкая	21 день	Устойчивость	ЛУ-ТБ
GeneXpert	Детекция мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину	R	95%	2 часа	Чувствительность	ЛЧ-ТБ
					Устойчивость	МЛУ-ТБ
LPA (Хайн-тест)	Детекция мутаций, ассоциированных с устойчивостью к ПТЛС	H, R, Fq, AG/CP	>90%	1-2 дня	Чувствительность	ЛЧ-ТБ
		E	60%		Устойчивость	ЛУ-ТБ

Как видно из таблицы 2, применение автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 значительно сокращает время получения результатов ТЛЧ МБТ. Так, при использовании плотных питательных сред Левенштейна-Йенсена результат посева можно получить в течение 21-56 дней, а определение лекарственной чувствительности требует еще 28 дней, так что общая длительность исследования может достигать 3 месяцев. С помощью системы ВАСТЕС MGIT 960 микобактерии обнаруживаются в течение 5-42

дней, а длительность определения лекарственной чувствительности сокращается до 7-14 дней.

По данным В.Г. Яшуровой, Т.Д. Борисенко, Л.К. Сурковой [3], совпадение результатов определения лекарственной чувствительности МБТ на ВАСТЕС MGIT 960 и на плотной среде в сравнении с международным стандартом составило для изониазида 87% и 100%, стрептомицина – 90% и 100%, рифампицина – 86% и 98%, этамбутола – 70% и 93%.

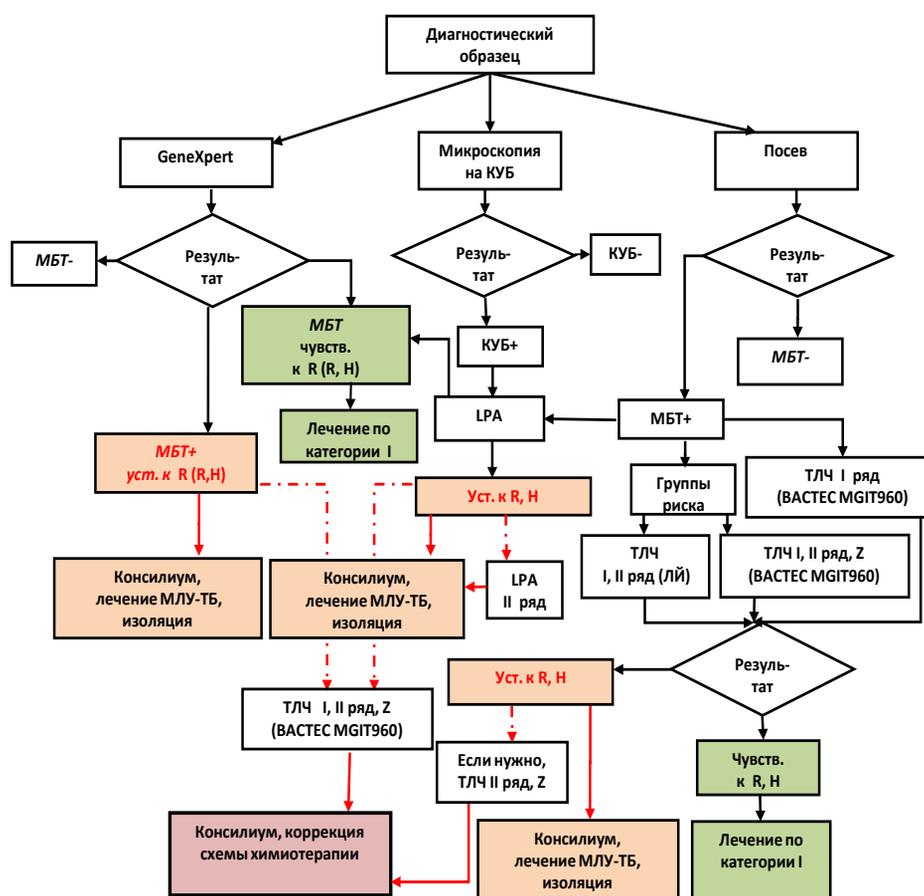


Рисунок 2. Алгоритм лабораторной диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости МБТ с использованием ускоренных методов.

К сожалению, низка достоверность результатов на лекарственную устойчивость МБТ к этионамиду (Eto), протионамиду (Pto), циклосерину (Cs) и ПАСК (PAS), полученных методом посева на плотные питательные среды.

Выявление устойчивости МБТ к рифампицину методом GeneXpert свидетельствует о МЛУ возбудителя, так как известно, что у 80-90% штаммов микобактерий резистентность к рифампицину коррелирует с устойчивостью к изониазиду. Установление устойчивости к рифампицину (GeneXpert) и/или МЛУ (LPA) с использованием ускоренных методов является основанием для представления пациента на Консилиум по МЛУ-ТБ для назначения эмпирического лечения с использованием ПТЛС резервного ряда до получения результатов ТЛЧ на жидких или плотных средах, после чего режим лечения при необходимости корректируется [1].

Алгоритм лабораторной диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости МБТ с использованием ускоренных методов представлен на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, в алгоритме диагностики туберкулеза особое внимание уделяется выявлению МЛУ возбудителя.

Ускоренное определение лекарственной чувствительности МБТ с использованием молекулярно-генетических методов проводится для следующих категорий пациентов с высоким риском МЛУ-ТБ: 1) пациенты с впервые установленным диагнозом туберкулеза, имеющие контакт с пациентом с МЛУ ТБ, освободившиеся из ИТУ, ВИЧ-инфицируемые; 2) ранее леченные пациенты.

Таким образом, внедрение в практику автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 и молекулярно-генетических методов (GeneXpert и LPA) сокращает в 2-3 раза сроки лабораторной диагностики туберкулеза и определения лекарственной чувствительности МБТ по сравнению с традиционными методами. Ускоренные методы детекции МБТ позволяют своевременно назначать

адекватные режимы химиотерапии, снизить частоту развития лекарственной устойчивости МБТ, уменьшить общепольничные затраты на лечение пациентов.

Список литературы

1. Клиническое руководство по лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм/ Е.М. Скрягина, Г.Л. Гуревич, А.П. Астровко, О.М. Залуцкая.- Минск.-2012.- 84с.

2. Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза и лекарственной устойчивости к рифампицину/ В.В. Слизень, Л.К. Суркова, О.М. Залуцкая//Матер.межд.н.-п. конф. «Современные медицинские технологии в диагностике, лечении и диспансерном наблюдении пациентов с туберкулезом».- Минск.- 2012.-с.183-188.

3. Преимущества использования систем ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза в Гомельской области/ В.Г. Яшурова, Т.Д. Бондаренко, Л.К. Суркова//Матер.межд.н.-п. конф. «Современные медицинские технологии в диагностике, лечении и диспансерном наблюдении пациентов с туберкулезом».- Минск.- 2012.-с.191-194.

4. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением

лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза/ М.А. Владимирский, Ю.С. Аляпкина, Д. А. Варламов и др.// Пробл.туб.- 2008.-№8.-с.38-44.

5. Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза / О.М. Залуцкая, Е.Р. Сагальчик, Л.К. Суркова. – Минск.- 2013.-135с.

6. Русович В. Совершенствование амбулаторной модели лечения туберкулеза для предотвращения развития лекарственно-устойчивого туберкулеза/Матер. Межд.н.-п. конф.: «Проблемы мультирезистентного туберкулеза в Беларуси и пути их решения». – Минск.-2013.-с.9-11.

7. Alarming levels of drug-resistant tuberculosis in Belarus: result of a survey in Minsk/ A.Skrahina, H.Hurevich, A.Zalutskaya, E.Sahalchyk, A.Astravko, W. van Gemert,[et al.]//Eur.Respir.J.- 2012.-Vol.39.-P.1425-1431.

8. Global tuberculosis report 2012/ World Health Organization.- Geneva, Switzerland, 2012.-p. 41-51.

9. Multidrug-resistant tuberculosis in Belarus: the size of the problem and associated risk factors/ A.Skrahina, H.Hurevich, A.Zalutskaya [et al.]// Bulletin of the World Health Organization.-2013.-Vol.91(1). – h 45.