

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Б. Я. КАЗЕННЫЙ, Е. С. НЕМЦОВА, Е. В. КИРЬЯНОВА

### LABORATORY DIAGNOSTICS OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS IN OREL REGION

B. YA. KAZENNY, E. S. NEMTSOVA, E. V. KIRYANOVA

БУЗ Орловской области «Областной противотуберкулезный диспансер»

Лабораторная диагностика туберкулеза является наиболее важной в комплексе диагностических исследований. Только обнаружение микобактерий туберкулеза (МБТ) в диагностическом материале с использованием микробиологических методов позволяет достоверно подтвердить диагноз туберкулеза. Несмотря на высокие показатели охвата населения РФ микробиологическими методами обследования, которые в 2012 г. составили с помощью метода микроскопии мокроты 98,9%, а посева мокроты – 94,7%, качество обследования остается низким [1, 2]. В 2012 г. доля впервые выявленных больных туберкулезом легких с бактериовыделением, подтвержденным методом микроскопии мокроты, составила 33,8%, а методом посева – 45,8% [1].

Проблема лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ, особенно множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) МБТ, является глобальной проблемой во многих частях света, в том числе и в РФ. В период с 2006 по 2012 г. в РФ доля больных туберкулезом с МЛУ возбудителя среди впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания увеличилась с 11,4 до 19,8% [1], поэтому ранняя диагностика ЛУ МБТ, в том числе МЛУ, позволяет своевременно назначить адекватную химиотерапию и добиться прекращения бактериовыделения и излечения пациента в более ранние сроки заболевания.

В Орловской области до 2000 г. ЛУ микобактерий определяли на плотных средах с использованием таблетированных препаратов. Только с 2001 г. с внедрением Программы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по борьбе с туберкулезом в области стали использовать чистые субстанции. ЛУ к препаратам второго ряда (капреомицин и фторхинолоны) стала определяться с 2003 г., когда началась реализация программы ВОЗ по диагностике и лечению больных туберкулезом с МЛУ МБТ.

**Ресурсы.** Штаты бактериологической лаборатории: врачи – 8,0 единиц, средний медицинский персонал – 14,5, младший медицинский персонал – 7,5.

Лаборатория оснащена современным оборудованием: шкафами биологической защиты 1-го класса, шкафами биологической защиты 2-го класса, высокоскоростными центрифугами с защитой, аппаратом для свертывания и инактивирования сыворотки, автоклавами для дезинфекции материала, дестиллятором, электронными весами, вортексом и др. (табл. 1).

**Структура лабораторной службы Орловской области.** В районах области и городских поликлиниках г. Орла имеется 31 клиничко-диагностическая лаборатория (КДЛ) 1-го уровня. В 27 КДЛ выполняют только микроскопию мокроты с помощью метода Циля – Нельсона, в 4 КДЛ развернуты посевные пункты, на базе которых выполняют посевы мокроты на две питательные среды: Ливенштейна – Йенсена и Финна-2. Схема расположения лабораторной службы Орловской области приведена на рис. 1.

Лаборатории районов оснащены современным оборудованием: поставлено 26 бинокулярных микроскопов, 26 кабин для сбора мокроты. В рамках проекта Международного банка реконструкции и развития поставлено лабораторное оборудование для 13 центров микроскопии.

Центральная бактериологическая лаборатория 2-го уровня расположена на базе Орловского областного противотуберкулезного диспансера. В лаборатории проводят следующие виды исследований:

- посев мокроты на две питательные среды: Ливенштейна – Йенсена и Финна-2;
- микроскопию мокроты из осадка;
- постановку тестов на лекарственную чувствительность (ЛЧ) методом абсолютных концентраций к химиопрепаратам: изониазиду, рифампицину, этамбутолу, стрептомицину, канамицину, капреомицину, офлоксацину, циклосерину, этионамиду, парааминосалициловой кислоте;
- посев мокроты и определение ЛУ к препаратам 1-го ряда на жидких средах с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT-960.
- обследование с использованием молекулярно-генетического метода с помощью анализатора GeneXpert.



Размещение оборудования в кабинетах бактериологической лаборатории

№ кабинета	Кабинет	Оборудование
Грязная зона		
1	приема материала	столы, шкаф для стерильных контейнеров для сбора мокроты
2	обработки и приготовления микроскопических препаратов	шкаф биологической защиты 1-го класса для приготовления и окраски микроскопических материалов – 1 шт.; шкаф биологической защиты 1-го класса для обработки материала на посев – 1 шт.; аппарат для гомогенизации мокроты (вортекс) – 1 шт.
3	термостатная	стеллажи для инкубирования посевов
4	посева материала и постановки на лекарственную чувствительность	шкаф биологической защиты 1-го класса для постановки тестов на лекарственную чувствительность – 1 шт.; аппарат для гомогенизации культур МБТ (вортекс) – 1 шт.; шкаф биологической защиты 2-го класса для посева – 1 шт.; высокоскоростные центрифуги с защитой – 3 шт.
5	комната для просмотра микроскопии препаратов, анализатора GeneXpert и Bactec MGIT-960	биноклярный микроскоп – 2 шт.; анализатор GeneXpert, Bactec MGIT-960
6	автоклавная	2 автоклава
7	моечная	дистиллятор – 1 шт., раковины для мытья посуды
Чистая зона		
8	комната для стерилизации материала	сухооздушные стерилизаторы – 2 шт.; электронные весы для взвешивания чистых субстанций – 1 шт.
9	комната для приготовления и разлива питательных сред	шкаф биологической защиты 2-го класса для приготовления и разлива питательных сред для диагностики и лекарственной чувствительности – 1 шт.; холодильники для хранения сред – 2 шт.; аппарат для свертывания и инактивирования сыворотки (АСИС) – 2 шт.
10	бытовая комната для сотрудников	–
11	кабинет зав.едущей	–
12	душевая и туалеты	–
13	материальная	–
14	компьютерная	2 компьютера для регистрации лабораторных исследований и внесения результатов

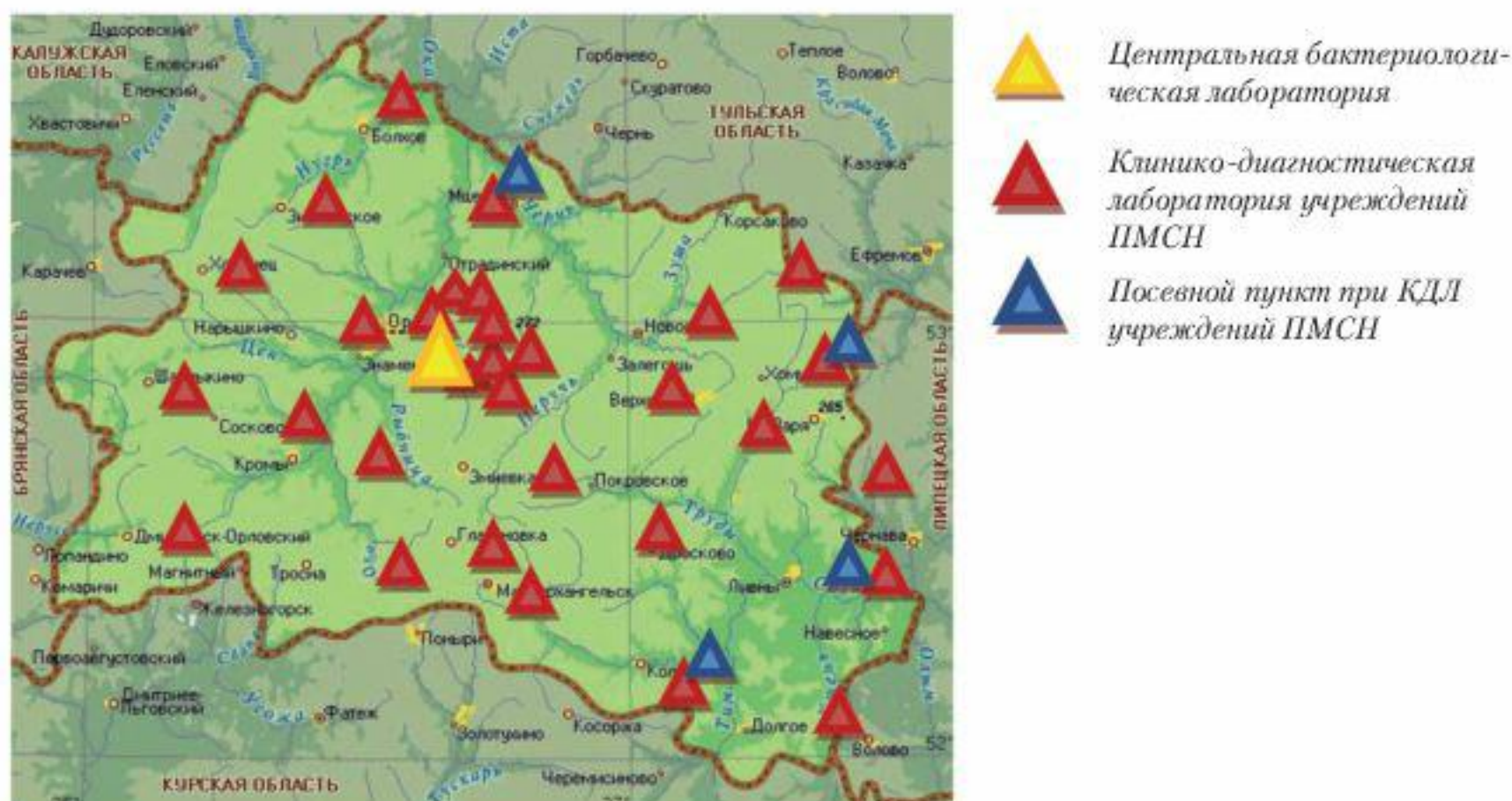


Рис. 1. Схема расположения лабораторий службы Орловской области



В лаборатории проведена реконструкция и закончен капитальный ремонт, поставлено и введено в эксплуатацию современное оборудование.

С ноября 2007 г. осуществляют диагностику туберкулеза и определение ЛУ МБТ к противотуберкулезным препаратам (ПТП) 1-го ряда на жидких средах с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT-960 (рост МБТ 9-14 дней) (табл. 2).

Таблица 2

Результаты ФСВОК по определению ЛУ МБТ к препаратам, %

Препараты	2008 г.	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.
Стрептомицин	90	94,7	90	95	100
Изониазид	100	100	100	100	100
Рифампицин	91,7	94,7	100	95	100
Этамбутол	100	94,7	100	95	100
Канамидин	-	-	-	100	100
Офлоксацин	-	-	-	100	100
Капреомицин	-	-	-	90	100

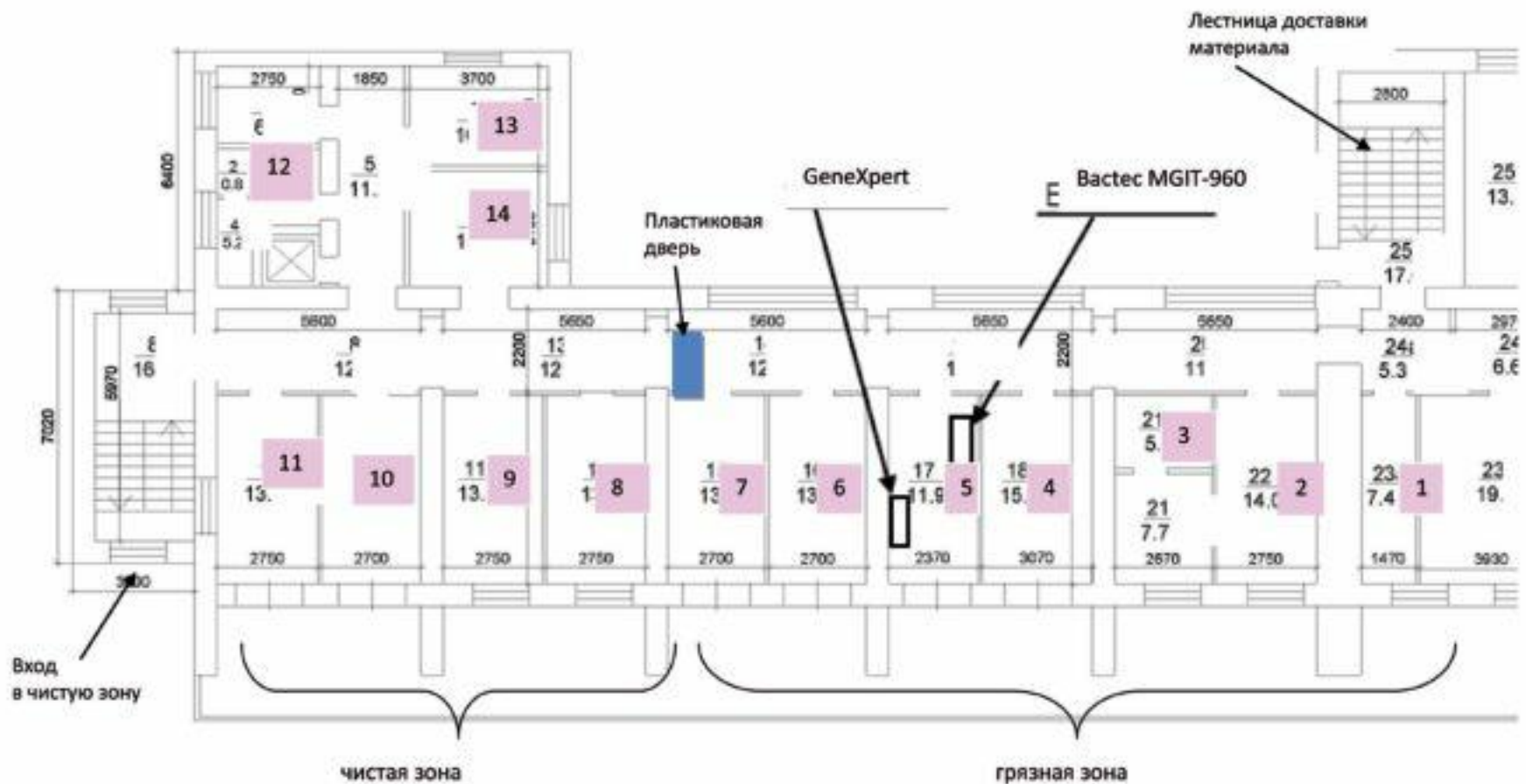
С 2011 г. применяют молекулярно-генетические методы обследования с использованием ана-

лизатора GeneXpert, позволяющего за 90 мин определять наличие ДНК МБТ и ЛУ к R.

Для инкубирования МБТ оборудована термостатная комната общей площадью 4 кв. м.

Лаборатория расположена в приспособленном помещении. Реконструкция проведена согласно требованиям СНИПа. Соблюдены все требования инфекционного контроля, проведено разделение помещений на грязную и чистую зоны. Лаборатория оборудована автономной приточно-вытяжной вентиляцией, поддерживающей отрицательное давление воздуха в рабочих кабинетах. Все лабораторные операции проводят в биологических шкафах 1-го и 2-го классов защиты (бактериологической безопасности) в зависимости от значимости проводимых исследований. Схема расположения кабинетов в лаборатории по зонам представлена на рис. 2.

Для обеззараживания воздуха в рабочих кабинетах установлено 10 бактерицидных потолочных ламп. Соблюдение мер инфекционного контроля способствовало тому, что за последние 10 лет случаев заболевания среди сотрудников лаборатории не было.



На чистой зоне расположены кабинеты:

- 8 – комната для стерилизации материала,
- 9 – комната для приготовления и разлива питательных сред,
- 10 – бытовая комната для сотрудников,
- 11 – кабинет заведующей,
- 12 – душевая и туалеты,
- 13 – материальная,
- 14 – компьютерная

На грязной зоне расположены кабинеты:

- 1 – приема материала,
- 2 – обработки и приготовления микроскопических препаратов,
- 3 – термостатная,
- 4 – посева материала и постановки на лекарственную чувствительность,
- 5 – комната для просмотра микроскопии препаратов, анализатора GeneXpert и Bactec MGIT-960,
- 6 – автоклавная,
- 7 – моечная

Рис. 2. Схема бактериологической лаборатории БУЗ Орловской области «ОПТД»



Для обеспечения ввода информации в компьютерную базу данных имеется 2 персональных компьютера. Ввод данных осуществляют сотрудники лаборатории.

Лаборатория располагает годовым запасом расходных материалов для проведения исследований с использованием системы Bactec MGIT-960, а также молекулярно-генетических тест-систем для анализатора GeneXpert MBT/RIE.

Источником приобретения расходных материалов для проведения исследований на жидких питательных средах и молекулярно-генетических тест-систем являются как областной бюджет, так и субсидии, выделяемые в рамках федеральных целевых программ. Общий показатель контаминации (проростов) на твердых средах низкий и составил в 2013 г. 0,8%, в 2012 г. – 0,9%.

**Контроль качества.** Центральная бактериологическая лаборатория БУЗ Орловской области «ОПТД» участвует во внешнем федеральном контроле качества по ЛЧ. Качество работы лаборатории оценивается как высокое.

Центральная бактериологическая лаборатория также осуществляет контроль за работой КДЛ учреждений общей лечебной сети (лаборатории 1-го уровня). Ежеквартально 10% всех отрицательных результатов мазков мокроты по Цилю – Нельсону и всех положительных результатов передают для пересмотра в бактериологическую лабораторию ОПТД.

**Работа с персоналом, обучение и навыки.** Сотрудники бактериологической лаборатории прошли обучение на базе ЦНИИТ РАМН по всем видам исследований, имеют сертификаты специалиста, высшую категорию.

Врач-бактериолог должен знать:

- правила сбора, хранения и доставки биологического материала на исследование;
- методы обработки;
- правила и способы приготовления микроскопических препаратов;
- способ приготовления основных питательных сред;
- способ обработки и правила посева на плотные и жидкие питательные среды, а также с использованием молекулярно-генетических методов диагностики;
- сроки инкубации МБТ;
- механизм постановки и изучения ЛЧ МБТ;
- способы дезинфекции;
- методы соблюдения мер инфекционного контроля;
- методы мониторинга заболеваемости и уровня ЛУ МБТ;
- основные правила интерпретации полученных результатов.

Ежегодно на базе ОПТД проводится один обучающий семинар для лаборантов КДЛ учреждений общей лечебной сети по микроскопии мокроты.

Число обучающихся – 30-35 человек. Финансирование семинара осуществляется из средств областного бюджета в рамках областной целевой программы «Туберкулез».

Ежемесячно лаборанты ОПТД осуществляют курацию КДЛ районов области при плановых выездах в районы. При этом проверяются качество приготовления мазков мокроты, объемы и качество поступающего материала.

**Описание практики.** В год бактериологическая лаборатория БУЗ Орловской области «ОПТД» выполняет всего около 34 тыс. исследований, из них посев мокроты и определение ЛЧ – 19 тыс., микроскопия мокроты с окраской по Цилю – Нельсону – 15 тыс. С использованием автоматизированной системы Bactec MGIT-960 в год проводят около 400 исследований, на анализаторе GeneXpert – около 150 исследований в год.

Микробиологическая диагностика туберкулеза органов дыхания начинается в учреждениях первичной медико-санитарной помощи (ПМСП), где пациентам, имеющим жалобы и симптомы заболевания, сходные с туберкулезом, и/или изменения при рентгенофлюорографическом обследовании, назначается 3-кратное исследование мокроты по Цилю – Нельсону. Алгоритм диагностики туберкулеза с использованием бактериологических методов схематично приведен на рис. 3. При обнаружении МБТ или отсутствии клинико-рентгенологической динамики при назначении курса неспецифического лечения пациент направляется для дальнейшего лечения и уточнения диагноза в БУЗ Орловской области «ОПТД».

На первоначальном этапе обследования в ОПТД всем пациентам назначают анализ мокроты из трех проб на микроскопию и посев на твердые среды. Из них один образец исследуют с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT-960. При обнаружении МБТ методом микроскопии один образец обязательно исследуют с использованием анализатора GeneXpert. Возможно обследование на анализаторе при отрицательном результате микроскопии мокроты, показания для обследования в этом случае определяют лечащий врач и комиссия ЦВКК.

Большое внимание уделяется качеству сбора мокроты. Проведено обучение медперсонала. В каждом отделении имеются кабины для сбора мокроты. В поликлинике выделен отдельный сотрудник для работы в кабинете сбора мокроты. Метод раздражающих ингаляций не используют. В стационаре мокроту собирают в утренние часы. Прием биологического материала лаборатория осуществляет до 15:30 ежедневно. Выбраковку некачественного материала (слиюны) осуществляют на этапе приема. Содержание слюны в среднем составляет 3%, материал в основном поступает из учреждений ПМСП. Выбракованный материал не принимают и не об-

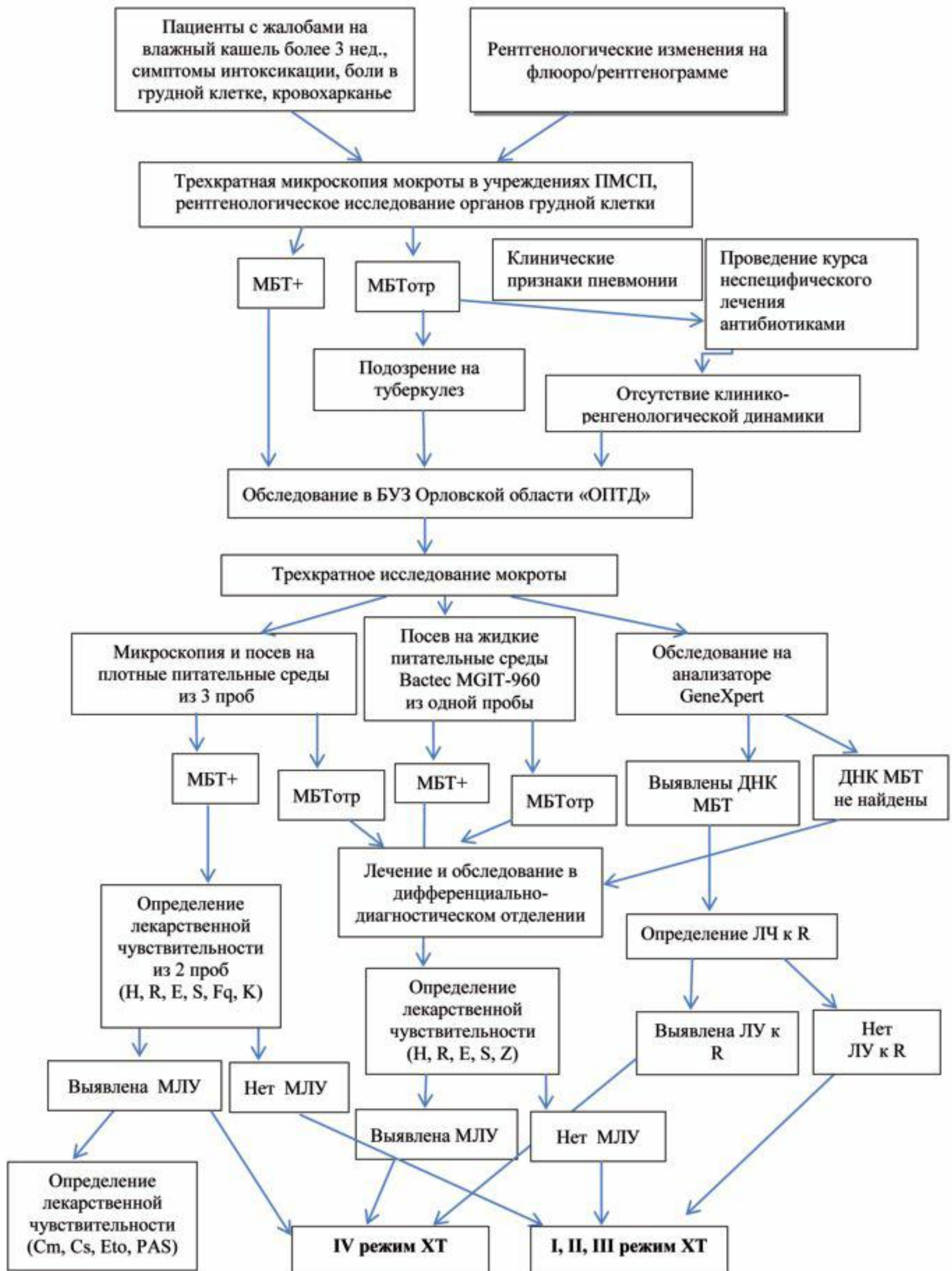


Рис. 3. Алгоритм диагностики туберкулеза органов дыхания в Орловской области



рабатывают, на направлении делают соответствующую запись о необходимости пересдачи материала. Принятому образцу мокроты присваивается лабораторный номер. Образцы поступают для деконтаминации мокроты (освобождение от вторичной микрофлоры). Деконтаминацию осуществляют 10% раствором форфорно-кислого натрия. Далее образцы помещают в термостатную комнату на 18 ч. На следующий день образцы центрифугируют в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют (встряхивают) и высевают на 2 плотные питательные среды: Ливенштейна – Йенсена и Финна-2. Из оставшегося осадочного материала готовят микроскопические мазки. Засеянный материал помещают в термостатную комнату для инкубирования в течение 12 нед. Ежедневно проводят пересмотр посевов для выявления роста МБТ.

Исследование на Bactec MGIT-960, как правило, осуществляют 1 раз в неделю ввиду малого количества образцов. Используют один из трех сданных образцов мокроты на этапе диагностики. Посев осуществляют одновременно на плотные и жидкие питательные среды.

Анализатор Gene Xpert четырехмодульный, т. е. позволяет одновременно исследовать 4 образца мокроты. Образец, исследуемый на анализаторе, параллельно засевают на плотные питательные среды. Процесс диагностики на анализаторе занимает 90 мин, в результате которого выявляются наличие или отсутствие ДНК МБТ и ЛЧ/ЛУ к рифампицину (R).

При получении МБТ культуры исследуют на наличие чувствительности к ПТП. На твердых средах всем первичным больным ставится тест на ЛЧ МБТ к ПТП основного и резервного рядов (канамицин, офлоксацин). При выявлении МЛУ МБТ со следующего образца добавляются исследования на ЛУ микобактерий ко всем остальным препаратам резервного ряда. На жидких средах всем первичным больным ставится тест на ЛЧ к ПТП только основного ряда с включением пирозинамида. Средние сроки получения результатов ЛУ на плотных средах – 42 дня от момента диагностического посева, на жидких средах – 17 дней от момента посева.

Проведен анализ совпадения данных обследования на анализаторе Gene Xpert и твердых средах. За 4 месяца 2014 г. на анализаторе обследовано 96 человек, ошибок было 5 (5,2%). Исследование проводили как у больных с бактериовыделением, подтвержденным методом микроскопии, так и больных в целях диагностики заболевания. Из 91 образца положительных было 41. Из них 33 (80,5%) – с сохраненной ЛЧ к рифампицину и 8 (19,5%) – с ЛУ к R. Из 33 случаев с ЛЧ МБТ совпадение данных на твердых средах было у всех пациентов, из 8 пациентов с ЛУ возбудителя совпадение было у 6. Общее число совпадений соста-

вило 95,1%. Высокий процент совпадения данных позволяет при выявлении ЛУ к R на анализаторе Gene Xpert сразу назначать больному 4-й режим химиотерапии до получения результата на жидких и твердых средах.

При сохранении бактериовыделения повторно тест на ЛЧ впервые выявленным больным ставится через 60 доз, при рецидиве – через 90 доз, потом в начале 5-го месяца лечения, далее 1 раз в 3 мес. Хроническим больным тест на ЛЧ ставится 1 раз в 6 мес. За кратностью и своевременной постановкой тестов на ЛЧ следят сотрудники лаборатории на основании бактериограммы больного. На всех зарегистрированных больных туберкулезом в лаборатории ведется полицейская картотека, в которой указываются все виды и результаты микробиологических исследований. Контроль за ведением картотеки осуществляет заведующая бактериологической лабораторией.

Приготовление плотных питательных сред и солевой основы к ним, согласно существующим прописям для диагностики и определения ЛЧ МБТ, проводят непосредственно в лаборатории. Коммерческие среды не используют.

Для организации учета всех зарегистрированных больных заведующая бактериологической лабораторией осуществляет ежедневную сверку данных с журналом регистрации больных туберкулезом в оргметодотделе. Каждый новый больной вносится в картотеку лаборатории. Сотрудники организационно-методического отдела ОПТД получают информацию о новых больных-бактериовыделителях и осуществляют контроль за их регистрацией и началом лечения.

В бактериологической лаборатории ведется электронный регистр данных на каждого больного. Лабораторный регистр заполняет сотрудник лаборатории. Программа связана с уже имеющимся в ОПТД регистром всех посетителей диспансера. При вводе данных в лаборатории ответственный сотрудник находит пациента из общего списка по фамилии и/или индивидуальному идентификационному номеру. На каждого больного из программы можно распечатать бактериологический паспорт, где указаны данные микроскопии, посева и ЛЧ.

Для организации слежения и учета вновь появившихся больных туберкулезом с МЛУ МБТ заведующая бактериологической лабораторией ОПТД при выявлении данных о МЛУ возбудителя в этот же день информирует сотрудников ОМО о новом случае МЛУ ТБ.

**Эффективность.** Благодаря хорошо организованной системе лабораторной диагностики туберкулеза ее эффективность в Орловской области значительно выше, чем в РФ и ЦФО:

- доля впервые выявленных больных туберкулезом легких с положительной культурой больше в 1,5 раза;
- доля больных с отрицательной микроско-



пией мокроты и положительным посевом больше почти в 2 раза;

- доля больных с положительным результатом микроскопий и отрицательным результатом посева меньше в 3 раза (табл. 3);

- обследование на ЛЧ МБТ составляет около 99% и более (табл. 4).

Первичная ЛУ МБТ, в том числе МЛУ в Ор-

ловской области, как и в целом в РФ, в последние годы имеет тенденцию к росту, но за счет быстрой диагностики ЛУ и назначения адекватного лечения в более ранние сроки заболевания доля впервые выявленных больных туберкулезом с ЛУ МБТ, в том числе МЛУ МБТ, в Орловской области значительно ниже, а результаты лечения выше, чем в РФ и ЦФО (табл. 5 и 6).

Таблица 3

Показатели качества лабораторной диагностики туберкулеза, % [1, 2]

Показатель	2010 г.			2011 г.			2012 г.		
	РФ	ЦФО	Орловская обл.	РФ	ЦФО	Орловская обл.	РФ	ЦФО	Орловская обл.
Доля впервые выявленных больных ТЛ К+	45,8	48,8	74,8	45,6	48,8	75,7	45,8	49,1	72,3
Доля больных с М+К-	14,8	14,6	5,4	16,7	14,2	3,8	15,1	12,9	4,4
Доля больных с М-К+	25,4	28,4	53,8	26,5	27,9	55,3	26,0	28,3	51,2

Таблица 4

Обследование на ЛЧ МБТ впервые выявленных больных, % [1, 2]

Субъект РФ	2010 г.	2011 г.	2012 г.
РФ	93,4	93,4	93,6
ЦФО	95,7	97,3	96,9
Орловская область	99,6	98,5	98,8

Таблица 5

Результаты ТЛЧ МБТ к ПТП у впервые выявленных больных туберкулезом легких до начала лечения, % [1, 2]

Субъект РФ	2010 г.		2011 г.		2012 г.	
	Выявлена ЛУ	Выявлена МЛУ	Выявлена ЛУ	Выявлена МЛУ	Выявлена ЛУ	Выявлена МЛУ
РФ	37,0	17,1	40,0	19,1	39,1	19,8
ЦФО	34,8	14,0	37,7	15,1	35,9	15,8
Орловская область	26,9	8,7	24,0	7,7	29,4	10,6

Таблица 6

Результаты КХТ у впервые выявленных больных туберкулезом легких с М+ при регистрации, % [1, 2]

Субъект РФ	Эффект КХТ		Неэффективный КХТ		Выявлена МЛУ МБТ		Умер от туберкулеза		Умер от других причин		Прервал		Выбыл	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
РФ	53,5	52,3	11,7	10,9	11,3	12,9	7,5	7,4	4,7	5,0	7,4	7,2	4,0	4,3
ЦФО	59,1	57,2	10,2	9,6	9,2	8,9	6,5	7,2	4,0	4,8	5,8	6,1	5,3	6,2
Орловская область	79,6	75,9	3,0	4,5	6,6	5,3	3,6	7,5	3,0	4,5	3,6	1,5	0,6	0,8

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Стерликов С. А., Богородская Е. М. и др. Отраслевые показатели противотуберкулезной работы в 2010-2011 гг. Анализ основных показателей и принятие управленческих решений. – М., 2012. – 81 с.

2. Стерликов С. А., Соп И. М., Нечаева О. Б. и др. Отраслевые показатели противотуберкулезной работы в 2011-2012 гг. – М.: ООО «Колор Медиа», 2013. – 48 с.