УДК: 616-093:616-002.5
DOI 10.56834/26631504_2022_1_129

Л.Т. Чингисова[1], https://orcid.org/ 0000-0002-1164-2661
В.Л. Бисмилда[1] , https://orcid.org/0000-0003-3130-9812
Б.Т. Токсанбаева[2], https://orcid.org/0000-0002-3387-2257
А.Б. Коптлеуова[3], https://orcid.org/ 0000-0002-3615-1105
Ш.К. Игликова [1], https://orcid.org/0000-00023524-7404
К.А. Сулейменова [1], https://orcid.org/0000-0002-4823-5568
Н.К. Такенов [1], https://orcid.org/ 0000-0002-1862-9486
А.Ш. Ауезов[1], https://orcid.org/ 0000-0001-9983-124X
[1]РГП на ПХВ «Национальный научный центр фтизиопульмонологии РК» МЗ РК, г.Алматы, Казахстан
[2]Проект USAID по ликвидации туберкулеза в Центральной Азии (ETICA)
[3]Группа реализации гранта Глобального фонда по компоненту «Туберкулез» при ННЦФ МЗ РК, г.Алматы, Казахстан

20 ЛЕТ СПУСТЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В КАЗАХСТАНЕ

Резюме. *В статье изложены исторические достижения лабораторной службы противотуберкулезных организации страны, от простого микрокопирования до новейшей молекулярно-генетической технологии и изучении полного генома микобактерий туберкулеза*
Ключевые слова: *выявление туберкулеза, культуральные исследования, диагностический алгоритм, тест на лекарственную чувствительность, молекулярно-генетические методы*

Чингисова[1] Л.Т, Бісмілда[1] В.Л., Токсанбаева[2] Б.Т., Коптлеуова[3] А.Б., Игликова[1] Ш.К., Сулейменова[1] К.А., Такенов[1] Н.К., Ауезов[1] А.Ш.
[1]ҚР ДСМ «ҚР Ұлттық фтизиопульмонология ғылыми орталығы» ШЖҚ РМК, Алматы қаласы, Қазақстан;
[2]Орталық Азиядағы туберкулезді жою бойынша USAID жобасы;
[3]Қазақстан Республикасының ҰФҒО жанындағы «Туберкулез» компоненті бойынша ЖИТС-пен, туберкулезбен және безгекпен күрес жөніндегі Жаһандық қордың гранты жобасын іске асыру тобы

20 ЖЫЛДАН СОҢ: ҚАЗАҚСТАНДА ТУБЕРКУЛЕЗ МИКОБАКТЕРИЯСЫН ЗЕРТХАНАЛЫҚ ДИАГНОСТИКАЛАУДЫҢ ЗАМАНАУИ МҮМКІНДІКТЕРІ

Түйін. Мақалада еліміздегі туберкулезге қарсы ұйымдардың зер
тханалық қызметінің қарапайым микроскопиялық әдістен бастап соңғы молекулярлық-генетикалық технологияға дейінгі және туберкулез микобактериясының толық геномын зерттеуге дейінгі тарихи жетістіктері баяндалған.
Түйінді сөздер: туберкулезді анықтау, жағындылық зерттеулер, диагностикалық алгоритм, дәріге төзімділікті анықтау, молекула-генетикалық зерттеу

[1]L.Chingissova, [1]V. Bismilda, [2]B. Toxsanbaeva, [3]A.Koptleuova, [1]Sh. Iglikova, [1]K. Suleimenova, [1]N. Takenov, [1]A Auezov.
[1] RSE on REU "National Scientific Center of Phthisiopulmonology of the Republic of Kazakhstan" of MoH of RK, Almaty, Kazakhstan
[2]USAID Eliminating Tuberculosis in Central Asia Activity (ETICA)
[3]Grant Project Implementation Unit of the Global Fund to fight AIDS, tuberculosis and malaria on a "Tuberculosis" component at the NSCP of the Republic of Kazakhstan

20 YEARS LATER: MODERN POSSIBILITIES OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN KAZAKHSTAN

Resume. The article describes the historical achievements of the laboratory service of the country's anti-tuberculosis organizations, from simple microcopying to the latest molecular genetic technology and the study of the complete genome of Mycobacterium tuberculosis
Keywords: detection of tuberculosis, culture studies, diagnostic algorithm, drug susceptibility test, molecular genetic methods

Туберкулез (ТБ) является одним из самых распространенных заболеваний в мире, от него ежегодно погибает около 4 миллионов человек. По данным Всемирной организации здравоохранения, каждую секунду 1 человек на планете инфицируется микобактериями туберкулеза. Туберкулез является одной из самых насущных проблем здравоохранения, стоящих перед человечеством[1].

Лабораторная диагностика имеет важное значение при выявлении больных туберкулезом и является одним из основных критериев верификации диагноза туберкулез. Долгое время, в стране основным методом выявления туберкулеза было применение рентгенологических исследований, а диагностика туберкулеза методом микроскопии играла второстепенную роль[2]. С 1998 году с внедрением

ДОТС программы в стране, диагностика туберкулеза методом микроскопии осуществляется как в клинико-диагностических лабораториях общей лечебной сети, где проводится первичное выявление бациллярных больных туберкулезом, так и в бактериологических лабораториях противотуберкулезной службы, осуществляющих диагностические исследования и верификацию диагноза «туберкулез». Обнаружение возбудителя начиналось с наиболее простых и быстрых бактериоскопических методов с использованием светового микроскопа с окраской по Циль–Нильсену. Преимуществом бактериоскопии было – быстрота получения результата.

В соответствии с приказом Председателя Комитета здравоохранения Министерства здравоохранения (МЗ), образования и спорта от 11 ноября 1998 года № 555 «О совершенствовании противотуберкулезной помощи населению Республики Казахстан» большое значение уделялось бактериологическому обследованию населения с целью раннего выявления туберкулеза. Однако возможности микроскопии были ограничены из–за низкой чувствительности метода: для выявления положительного результата в материале должно содержаться, как минимум, 10 тыс. или более кислотоустойчивых бактерий (КУБ) на 100 полей зрения микроскопа под большим увеличением. В то время этот метод являлся наиболее экономичным и был рекомендован ВОЗ в качестве основного метода для выявления заразных больных. Микроскопия мазка мокроты была затруднительна для специалистов лабораторий, которым надо было исследовать 3 образца мокроты от каждого больного. Подготовленные мазки окрашивали по Циль-Нильсена и исследовали с помощью светового микроскопа при увеличении (объектив 100х), что представляло собой длительную процедуру, занимающую до 15 мин для определения отрицательного результата одного мазка. Лаборанты-микроскописты , согласно нормативной нагрузки, должны были просмотреть не более 20-25 мазков в день - для обеспечения качественных результатов, однако нагрузка в микроскопических лабораториях превышала норму в 2-3 раза.

Долгое время золотым стандартом выявления микобактерий были признаны «культуральные исследования». Для посева патологического материала использовалась твердая яичная среда Левенштейна–Йенсена, результаты получали при положительных случаях в течение 30-45 дней, при отрицательных случаях ждали до 2,5 месяца. После получения положительного результата посева проводили постановку теста на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) к препаратам основного ряда: рифампицину, изониазиду, этамбутолу, ПАСК и циклосерину, результаты которых получали через 28 дней.

Длительность проведения посева и метода ТЛЧ приводило к назначению неадекватной схем лечения, усугублению проблем устойчивости, что свое очередь вызывало необходимость назначения более длительных схем лечения и дополнительных затрат.

Принципиально новый уровень бактериологической диагностики туберкулеза был достигнут путем внедрения в практику автоматизированной системы бульонного культивирования для ускоренного выявления микобактерий BACTEC MGIT 960 (“Becton Dickinson”)[3] . Первый аппарат был закуплен в 1999 году по линии Глобального фонда (ГФ) для 5 бактериологических лабораторий страны (НРЛ , Восточно-Казахстанская, Акмолинская области и г. Алматы.). Несмотря на инновационные возможности аппарата для посева и определения ТЛЧ к противотуберкулезным препаратам, аппараты использовались только для первичного посева. В 2007 году при поддержке Национальной программы и Глобального фонда (далее ГФ) специалисты НРЛ имели возможность пройти обучение в колаборационным тренинговом центре ВОЗ в Латвии. После обучения в стране начали постановку теста на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам 1 линии на автоматизированной системе Bactec MGIT-960. На сегодняшний день в стране установлены 26 аппаратов Bactec MGIT-960, закупленных при поддержке внутренних и внешних источников финансирования, включая ГФ, МЗ, FIND. Все областные противотуберкулезные центры имеют данную автоматизированную систему для посева и постановки ТЛЧ к противотуберкулезным препаратам 1, 2 ряда, также ТЛЧ к новым и перепрофилированым препаратам, такие как бедаквилин, деламанид, линезолид и клофазимин. Благодаря Bactec сократились сроки выделения МБТ из диагностического материала в среднем до 10-20 дней и длительность определения ТЛЧ до 6-15 дней. Повысилась высеваемость МБТ как из бактериоскопически отрицательного, так и положительного диагностического материала.

Открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять лабораторную диагностику туберкулеза на качественно новый уровень. Базовым методом молекулярно–генетических исследований является полимеразная цепная реакция (ПЦР), направленная на выявление ДНК микобактерий в диагностическом материале.

Роль молекулярной диагностики в клинической практике повышается, поскольку увеличивается число больных со скудным бактериовыделением.

В 2008 году ВОЗ рекомендовала использование анализов с олигонуклеотидными зондами (LPA) для быстрого выявления туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, впоследствии были разработаны новые версии LPA и рекомендации ВОЗ для использовании данного метода в качестве первичного теста к противотуберкулезным препаратам первой и второй линии терапии (вместо жидкой культуры), поскольку LPA характеризуется высокой точностью и быстротой получения результатов (в течение одного дня, по сравнению с приблизительно 2–6 неделями для культуральных методов ТЛЧ). LPA обеспечивает идентификацию целевых последовательностей ДНК, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам первой и второй линии терапии[4].

В 2012 году по линии ГФ были установлены аппараты LPA в 11 лабораториях страны, в 2014 году один комплект аппарат закупил FIND, в 2017 году при финансовой поддержке ГФ оснастили аппаратами LPA еще 5 лабораторий страны.

Разработка аппарата GeneXpert считается важным прорывом в борьбе с туберкулезом. Впервые

молекулярный тест был простым и достаточно надежным для диагностики туберкулеза. 8 декабря 2010 года ВОЗ одобрила анализ Xpert® MTB/RIF для диагностики туберкулеза и определении лекарственной устойчивости к рифампицину в течение короткого времени (2 часа).

В Казахстане первые 4 аппарата Gene-Xpert появились в 2012 году по линии KNCV для 4 лабораторий: НРЛ , Восточно-Казахстанская, Акмолинская области и г. Алматы. Далее началось активное расширение использования GeneXpert в стране: по ГФ были получены 65 аппаратов, по USAID-50, FIND-6, по местному бюджету Атырауская область приобрели 3 аппарата. GeneXpert был включен в качестве первичного метода в алгоритм диагностики туберкулеза. На сегодняшний день в стране имеюся 128 аппаратов GeneXper, которые размещены во всех регионах страны, включая районный уровень, что обеспечило доступ для всех пациентов к данной технологии.

В 2022 году по ГФ в страну поставлены 20 аппаратов Xpert MTB-XDR для всех лабораторий ЦФ страны. Анализ Xpert® MTB/XDR (XDR) был разработан как анализ следующего поколения для тестирования устойчивости МБТ к обнаружению изониазида и препаратов второго ряда.

На сегодняшний день в стране имеется хорошо развитая противотуберкулезная сеть, которая состоит из 20 бактериологических лабораторий ЦФ, 19 из которых находятся в гражданском секторе, 1 в пенитенциарном учреждении. Во главе всех бактериологических лабораторий страны находится национальная референс лаборатория ННЦФ РК, выполняющая координирующую роль. Все лаборатории оснащены современными и быстрыми технологиями для выявления туберкулеза. Все методы исследования стандартизированы, в соответствии с Приказом 214 «Об утверждении правил проведения мероприятий по профилактике туберкулеза» от 30 ноября 2020 года № ҚР ДСМ-214/2020. Национальным Руководством по лабораторной службе противотуберкулезных организаций.

На сегодня решены вопросы с транспортировкой патологического материала, все противотуберкулезные диспансеры обеспечены возможностью транспортировать и своевременно доставлять диагностические образцы (2-3 раза в неделю).

Доставка биоматериала осуществляется по мере надобности на санитарном транспорте в рамках 3-х стороннего соглашения между лабораториями, утвержденными директорами ЦФ, согласованными с руководителями Управления здравоохранения и акиматами, в сопровождении медицинского работника или обученного водителя, в транспортировочных контейнерах с охлаждающими элементами.

С появлением рекомендаций ВОЗ в 2020 году по использованию Xpert MTB/RIF и Xpert MTB/ RIF Ultra в качестве первичных тестов для диагностики ТБ и резистентности к рифампицину у всех пациентов, с подозрением на легочный и внелегочный ТБ, в стране были организованы 130 микроскопических лабораторий, их них в 100 лабораториях установлены аппараты GeneXpert, включая районных уровень и ПМСП. Аппараты устанавливались исходя из фактического расстояния между населенными пунктами для доставки в ближайшую лабораторию. Все лабораторные специалисты центров GeneXpert прошли обучение.

Уникальность диагностической системы GeneXpert заключается в ее универсальности, одновременно позволяя проводить исследования как на наличие туберкулеза, так и коронавирусной инфекции, что используется во всех лабораториях ЦФ страны.

Противотуберкулезная служба страны продолжает расширять свои возможности: благодаря проекту Глобального фонда и проекта USAID по ликвидации туберкулеза в странах Центральной Азии (ETICA), национальная референс лаборатория проводит исследования по изучению полного генома микобактерий туберкулеза. Полногеномное секвенирование (WGS) в настоящее время является методом, рекомендуемым ВОЗ для диагностики и выявления лекарственной устойчивости ТБ, генетического разнообразия и динамики передачи Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC). В рамках ГФ был закуплен полногеномный секвенатор MiSeq и расходные материала. С самого начала USAID ETICA начал помогать во внедрении полногеномного секвенирования в НРЛ: проведены неоднократные обучения специалистов по использованию данного аппарата и биоинформатике. При финансовый поддержке ГФ и USAID специалисты НРЛ прошли обучение в супранациональной лаборатории Гаутинг (Германия).

Выводы: За 20 лет противотуберкулезная лабораторная служба Казахстана сделала все возможное для внедрения самых передовых технологий в целях улучшения лабораторной диагностики туберкулеза, пройдя путь от простой микроскопии до внедрения молекулярно-генетических стандартов диагностики.

Сегодня в Казахстане, благодаря внедренным новейшим и ускоренным технологиям диагностики туберкулез можно выявить в кратчайшие сроки заболевание, с определением статуса устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

Все это повышает эффективность противотуберкулезной программы в стране, своевременную диагностику и лечение ТБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin, WHO, 2016

3 Малинова, Т. В. Роль лаборатории в раннем выявлении туберкулеза на селе, Медицина и здравоохранение : материалы II Междунар. науч. конф. (г. Уфа, май 2014 г

4 Метод ускоренной диагностики туберкулеза, Т. Р. Возякова, О. Е. Стебловская, В. Н. Максимова, Ж. В. Еленкина, Л. В. Афанасьева, 2009-2022 www.med.cap.ru — Медицинский портал Чувашской Республики

5 Руководство активиста по инструментам диагностики туберкулеза, Дэвид Браниган (David Branigan, Июль 2020 года

REFERENCES

1 Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

2 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin, WHO, 2016
3 Malinova, T. V. Rol' laboratorii v rannem vyjavlenii tuberkuleza na sele, Medicina i zdravoohranenie : materialy II Mezhdunar. nauch. konf. (g. Ufa, maj 2014 g
4 Metod uskorennoj diagnostiki tuberkuleza, T. R. Vozjakova, O. E. Steblovskaja, V. N. Maksimova, Zh. V. Elenkina, L. V. Afanas'eva, 2009-2022 www.med.cap.ru — Medicinskij portal Chuvashskoj Respubliki
5 Rukovodstvo aktivista po instrumentam diagnostiki tuberkuleza, Djevid Branigan (David Branigan, Ijul' 2020 goda

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.
Конфликт интересов – не заявлен.
Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами. При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами. Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.
Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ.
Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ. Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.
No conflicts of interest have been declared.
This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers. There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work. Funding - no funding was provided.

Информация об авторах:

№	ФИО полностью	Должность полностью	Место работы полностью	Ученое звание (если имеется)	Эл. почта	Номер телефона
1	Чингисова Ляйля Турсунбе ковна	Руководитель НРЛ	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	Кандидат мед. наук	lchingisova@mail.ru	+77019878986
2	Бісмілда Венера Лазарьқызы	Лабораторный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмоно логии	Кандидат биологических наук	venerabismilda@mail.ru	+77075703652
3	Токсанбаева Бекзат Такешовна	Региональный советник по лабораторным проект USAID	Проект USAID	МАГИСТР	bekzat.2405@mail.ru	+77017302802
4	Котлеуова Алия Бакытжа новна	Лаборатор ный консультант проекта ГФ	Глобальный фонд	-	koptleuova2010@mail.ru	+77477087075
5	Игликова Шолпан Кенбаевна	Врач-бактериолог	Национальный научный центр фтизиопульмо нологии	Кандидат мед. наук	shiglikova@gmail.com	+77071841634
6	Сулейменова Кулзира Асылбековна	Лаборатор ный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмо нологии	-	Zhanna.25.1970@mail.ru	+77020472870
7	Такенов Нурлан Кайратович	Лаборатор ный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмо нологии	магистр	takenovnur@gmail.com	+77477588546
8	Ауезов Абылай Шарипбе кович	Врач-бактериолог	Национальный научный центр фтизиопульмо нологии	-	abilayauezov1978@mail.ru	+77755048949