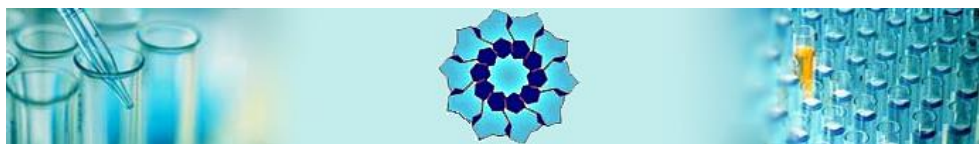




**Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека**



**ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии им.
академика И.Н. Блохиной»**

Приволжский окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД

Информационно-методическое письмо

**«Совершенствование преаналитического
этапа молекулярной диагностики в надзоре за
резистентностью ВИЧ к антиретровирусным
препаратам»**

Нижний Новгород, 2017г.

Информационно-методическое письмо подготовлено сотрудниками ФБУН
ННИИЭМ им. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора:

Н.Н. Зайцева – руководитель Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД центра, к.м.н.

Н.И. Иванова – зав. лабораторией молекулярно-генетических и серологических методов исследования Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД, к.б.н.

О.В. Парфенова – биолог Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД, к.б.н.

О.Ю. Пекшева – врач клинической лабораторной диагностики Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД.

Е.И. Ефимов – директор института, д.м.н., профессор.

Тел. (831) 469-79-07, 469-79-13

E-mail: prokaids@mail.ru

Разрешается использование материалов письма со ссылкой на авторов

Краткое содержание письма:

В письме представлены результаты анализа мероприятий по мониторингу резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам (АРВП) и организации преаналитического этапа данного вида исследований на территориях Приволжского федерального округа (ПФО). Даны рекомендации по совершенствованию преаналитического этапа при проведении исследований лекарственной устойчивости ВИЧ.

Материалы для исследования и анализа предоставлены территориальными центрами по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (ПБ СПИД и ИЗ) ПФО. Проанализированы медицинские карты амбулаторных больных, получающих антиретровирусную терапию (АРВТ), направления на определение лекарственной устойчивости ВИЧ, присланные из территориальных центров по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ округа, результаты тестирования с помощью анкет, разработанных в Приволжском окружном центре по профилактике и борьбе со СПИД (Центр), и образцы биологических проб и материалы, полученные при выездах в регионы ПФО.

Информационно-методическое письмо предназначено специалистам центров ПБ СПИД и ИЗ.

Нормативно-методическая база:

1. Методическое письмо от 10.08.2007г. №5922-РХ «Правила постановки диагноза ВИЧ-инфекции». – М., – 2007.
2. Методическое письмо от 04.08.2006г. №4174-РХ «Проведение лабораторного обследования на ВИЧ-инфекцию (в том числе исследование иммунитета и вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции)». – М., – 2006.
3. Методические рекомендации от 29.12.2006г. №7124-РХ «Диспансерное наблюдение за пациентами с ВИЧ-инфекцией». – М., – 2006.
4. Методические рекомендации от 06.08.2007г. №5956-РХ «О проведении надзора за циркуляцией генетических вариантов вируса иммунодефицита человека, включая циркуляцию штаммов, резистентных к антиретровирусным препаратам». - М., - 2007.
5. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ Г.Г.Онищенко от 13.02.2012 г. №16 «О неотложных мерах по противодействию распространения ВИЧ-инфекции в Российской Федерации».

6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24.12. 2012г № 1511н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при болезни, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией)».
7. Методические рекомендации «Надзор за распространением штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам» (МР 3.1.1.0075/1-13). - М., - Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.
8. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции», М., 2011.
9. Методические указания «Эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией» (МУ №3.1.3342-16). – М., - Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016.

Аналитическая часть:

Основными задачами, стоящими перед системой российского здравоохранения, являются повышение доступности и качества клиничко-диагностической помощи, за счет внедрения высокотехнологичных методов диагностики и лечения, оснащения лечебно-профилактических учреждений новым лабораторно-диагностическим оборудованием.

Мощное развитие и укрепление лабораторной базы службы профилактики ВИЧ-инфекции/СПИД и увеличение спектра исследований, применяемых в рамках оказания стандарта медико-санитарной помощи ВИЧ-инфицированным, расширило возможности для изучения генетического разнообразия вируса иммунодефицита человека, мониторинга резистентных штаммов ВИЧ, позволяя контролировать эффективность проводимого лечения и решать задачи в плане совершенствования эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

В лабораторию молекулярно-генетических и серологических методов исследования Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора за период 2008-2015гг. было доставлено 948 образцов биоматериала, полученных от ВИЧ-позитивных пациентов, состоящих на диспансерном учете в 12 территориальных центрах по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ республик: Башкортостан, Марий Эл, Мордовия, Чувашской и Удмуртской республик; областей: Кировской, Нижегородской, Оренбургской, Самарской, Саратовской, Пензенской, Ульяновской для проведения теста на лекарственную устойчивость ВИЧ. Нуклеотидная последовательность

фрагментов генома вируса была определена в 808 образцах (85,2%), оставшаяся часть (14,8%) не подлежала заявленным в направлениях исследованиям в связи с нарушениями требований проведения преаналитического этапа. Данный факт явился основанием для проведения оценки и анализа причин, препятствующих или ограничивающих выполнение исследований по определению резистентности ВИЧ к АРВП.

В диагностическом процессе преаналитическая фаза занимает 57,3% времени и именно на этом этапе регистрируется самое большое количество ошибок. Следовательно, чтобы повысить качество анализа в целом, в первую очередь нужно обеспечить качество анализируемого биологического образца, контролируя все этапы преаналитической фазы: от каких пациентов, кто, в каких условиях и как осуществляет взятие и хранение пробы, ее доставку в лабораторию и подготовку к проведению исследования. В связи с этим, специалистами Центра была разработана и реализована комплексная программа, состоящая из теоретической и практической части. Теоретическая часть включала оценку уровня знаний специалистов службы профилактики ВИЧ-инфекции/СПИД ПФО с помощью опросных листов «Особенности преаналитического этапа при выполнении молекулярно-генетических и иммунологических исследований». В дальнейшем, оценивая практическую часть программы, было проанализировано 948 направлений на определение лекарственной устойчивости ВИЧ, присланных из 12 территориальных центров по ПБ СПИД и ИЗ округа в лабораторию молекулярно-генетических и серологических методов исследования Центра, а так же сделаны выезды в субъекты округа с целью проверки выполнения мероприятий по мониторингу резистентности ВИЧ к АРВП и организации преаналитического этапа данного вида исследований.

Следует сказать, что наиболее активными участниками проведения программы в части, касающейся доставки образцов для исследования на лекарственную устойчивость ВИЧ, явились Нижегородская, Ульяновская, Самарская и Саратовская области.

Обобщенный анализ полученных результатов представлен в настоящем информационно-методическом письме, также даны рекомендации по совершенствованию преаналитического этапа при проведении исследований на резистентность ВИЧ к АРВП.

Лекарственная устойчивость ВИЧ - одна из основных проблем неэффективности антиретровирусной терапии. В ПФО на 01.01.2016г. АРВТ получали 38,3% ВИЧ-позитивных (81386 человек) от общего числа зарегистрированных и 96,7% от числа нуждавшихся. По разным причинам терапию прерывали 36,9% (30072) пациентов, из них 42,1% (12649 человек) по причине смерти. Низкая приверженность терапии у остальных лиц, живущих с ВИЧ/СПИД, является одной из возможных причин развития резистентности ВИЧ к АРВП.

Приволжским окружным центром по профилактике и борьбе со СПИД за период 2008-2015гг. были выполнены исследования по определению лекарственной устойчивости ВИЧ у 808 пациентов из республик – Башкортостан, Марий Эл, Мордовия, Чувашия, Удмуртия и областей - Кировской, Нижегородской, Самарской, Саратовской, Пензенской, Ульяновской, Оренбургской. Идентификация мутаций, связанных с резистентностью, осуществлялась с использованием тест-систем ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories, США) и «АмплиСенс® HIV-Resist-Seg» (ФБУН ЦННИЭ, Россия), в соответствии с инструкциями производителей по их применению.

В штаммах, выделенных от пациентов, относящихся к целевой группе наблюдения по распространенности первичной резистентности ВИЧ, не содержалось мутаций, ассоциированных с клинически значимой лекарственной устойчивостью вируса к АРВП, а в спектре выявленных мутаций ни одна из них не была отнесена к значимым для надзора за передаваемыми лекарственно устойчивыми штаммами ВИЧ. У пациентов, не вошедших в целевую группу по срокам давности инфицирования, в 1,5% случаев выявлены мутантные штаммы вируса, которые впоследствии, при назначении терапии, могут значительно ограничивать ожидаемый эффект от применения препаратов первой линии. Данный факт следует учитывать в выборе индивидуальной схемы лечения пациента.

Резистентность ВИЧ у лиц, принимающих АРВТ, обнаружена в $37,6 \pm 1,8\%$ случаев. В структуре мутаций, определяющих вторичную фармакологическую резистентность ВИЧ к АРВП в ПФО, доминируют замены, вызывающие иммунологическую и вирусологическую неэффективность препаратов группы НИОТ ($56,3 \pm 1,2\%$), в $33,1 \pm 1,8\%$ - группы ННИОТ и в $10,5 \pm 1,2\%$ случаев – группы ИП ВИЧ. Множественная устойчивость к двум или более классам препаратов выявлена в $21,4 \pm 1,6\%$ случаев.

Отсутствие мутаций резистентности у остальной, значительной (более чем 60%) части обследованных пациентов с неэффективностью АРВТ является, в том числе, свидетельством нарушений преаналитического этапа исследований, в частности, при назначении теста у больных с низким уровнем дисциплины приема препаратов.

Для анализа уровня теоретических знаний по вопросам организации преаналитического этапа молекулярно-генетических и иммунологических исследований, проводимых ВИЧ-позитивным пациентам, было проведено тестирование уровня знаний сотрудников территориальных центров ПБ СПИД и ИЗ ПФО. Для этого специалистами Центра была разработана анкета «Особенности преаналитического этапа при выполнении молекулярно-генетических и иммунологических исследований». Предложенные в анкете 29 вопросов и вариантов ответов к ним касались таких аспектов преаналитического этапа, как работа с пациентами, показания для назначения теста на резистентность ВИЧ к АРВП, особенности забора, хранения, транспортировки материала для проведения данного теста.

Анализ заполненных анкет показал, что, в среднем по округу, в $60,5 \pm 4,6\%$ случаев были выбраны все правильные варианты предложенных ответов по каждому вопросу. Неполные (не все варианты правильных ответов) получены в $26,5 \pm 4,2\%$ случаев. Следует отметить, что сотрудники территориальных центров по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ округа показали различную степень подготовки по тематике анкеты. Так, количество правильных ответов в субъектах ПФО имело значительный размах, составляя от $41,4 \pm 4,7\%$ до $82,8 \pm 3,6\%$. В среднем по округу число неверных ответов регистрировалось на уровне $17,0 \pm 3,2\%$. Наиболее часто у респондентов вызывали затруднения вопросы, связанные с показаниями к назначению теста на лекарственную устойчивость ВИЧ, условий забора и хранения биоматериала, подготовки материала для исследования.

Анализ направлений на определение лекарственной устойчивости ВИЧ, присланных из территориальных центров ПБ СПИД и ИЗ округа, позволил выявить несколько групп основных нарушений в организации преаналитического этапа проведения теста на резистентность ВИЧ к АРВП:

1. Нарушения, связанные с выполнением правил обследования и назначения теста на резистентность:

- Назначение теста при уровне РНК ВИЧ менее 1000 коп/мл.
- Назначение теста после перерыва в лечении (более двух недель).

- Назначение теста, спустя 10 дней от момента старта АРВТ.
- Назначение теста сразу после смены АРВТ.
- Определение вирусной нагрузки ранее, чем за 14 дней до момента взятия крови на исследование.
- Назначение теста без определения показателей РНК ВИЧ и CD4⁺T-лимфоцитов.
- Необоснованность назначения исследования.

2. Нарушения в заполнении/оформлении документации:

- Неполное заполнение направлений:
 - отсутствие даты забора крови;
 - отсутствие отметок о хранении и транспортировке образцов;
 - отсутствие показаний к тестированию;
 - не указана длительность приема схемы АРВТ;
 - не указана степень приверженности АРВТ;
 - не указаны причины отмены предыдущих схем лечения;
 - значения показателей ВН и уровня CD4⁺ T-лимфоцитов указаны только для предыдущей схемы лечения, к проводимой схеме данные отсутствуют.
- Формальное и небрежное заполнение направлений (показанием к направлению для исследования у пациента, принимающего АРВТ, является определение первичной резистентности ВИЧ); наличие исправлений.

3. Нарушения при работе с материалом:

- Нарушение сроков транспортировки (поздняя доставка).
- Ошибки в подготовке материала.
- Недостаточный объем плазмы.

Таким образом, выявленные недостатки в организации и проведении преаналитического этапа при проведении теста на резистентность ВИЧ к АРВП оказывают существенное влияние на его результативность, делая тест подчас нецелесообразным, а его результаты неинформативными.

Плановые лабораторные исследования и их кратность в период диспансерного наблюдения за ВИЧ-позитивными пациентами как до назначения, так и в период проведения АРВТ (в том числе и проведение теста на резистентность ВИЧ к АРВП) должны соответствовать утвержденным протоколам и стандартам оказания медицинской помощи.

В связи с этим, для проведения контроля за обеспечением лабораторным сопровождением стандартов при диспансерном наблюдении за ВИЧ-позитивными пациентами и для оценки организации преаналитического этапа при проведении мониторинга резистентности ВИЧ к АРВП были сделаны выезды в регионы ПФО. Проанализировано 307 медицинских карт амбулаторных больных, получающих АРВТ в Самарской, Оренбургской, Кировской, Пензенской, Ульяновской областях, республиках Чувашия, Удмуртия, Башкортостан, Мордовия. Проведенный анализ позволил выявить следующие нарушения:

- Несоблюдение лабораторного обеспечения выполнения стандартов медицинской помощи ВИЧ-позитивным пациентам в части кратности проведения исследований на ВН и теста на резистентность ВИЧ к АРВП.
- Недостаточная настороженность врачей клинического профиля в отношении формирования резистентности ВИЧ и, соответственно, назначения соответствующего теста.
- Несоблюдение сроков доставки биоматериала для проведения исследований на лекарственную устойчивость ВИЧ.
- Нарушение алгоритма тестирования на резистентность ВИЧ к АРВП, пациентов, прервавших АРВТ.
- Отсроченность выполнения лабораторией территориальных центров по ПБ СПИД и ИЗ округа назначенного теста на лекарственную устойчивость ВИЧ на срок более двух месяцев.

Очевидно, что специалистам службы профилактики ВИЧ-инфекции/СПИД ПФО следует обратить особое внимание на соблюдение протоколов и стандартов оказания медицинской помощи ВИЧ-инфицированным, тщательно проработать все особенности отбора пациентов и подготовки биоматериала для проведения молекулярно-генетических исследований.

Основными направлениями работы по повышению результативности мониторинга за лекарственной устойчивостью ВИЧ, и, прежде всего, совершенствованию преаналитического этапа данного вида исследований, следует считать:

- Необходимость разработки дополнительной нормативно-методической документации по выполнению исследований для проведения мониторинга за резистентностью ВИЧ к АРВП на базе имеющихся отечественных и международных рекомендаций.

- Включение в учебные планы подготовки и переподготовки соответствующих специалистов разделов, касающихся алгоритма обследования пациента и правил проведения генотипирования ВИЧ.
- Разработку и внедрение в образовательный процесс на базе высших и средних медицинских учебных заведений новых программ по работе с передовыми медицинскими технологиями, оборудованием и материалами.
- Достаточное обеспечение финансированием всего объема исследований по лабораторному сопровождению стандартов медико-санитарной помощи ВИЧ-позитивным в центрах ПБ СПИД и ИЗ.
- Необходимость комплексного подхода и практики совместного участия специалистов лабораторной службы и клинических подразделений центров ПБ СПИД и ИЗ к проведению алгоритма генотипирования ВИЧ.
- Соблюдение требований нормативно-методических документов, инструкций к диагностикумам и тест-системам и обязательное их выполнение на всех этапах проведения преаналитического этапа лабораторных исследований.
- Исключение отсроченности выполнения исследований на лекарственную устойчивость ВИЧ для целесообразности проведения теста в целом, и получения информативных результатов в частности.
- Организацию централизованного проведения данного вида исследований на базе научно-исследовательских институтов (федеральных окружных центров по профилактике и борьбе со СПИД) с созданием оперативной системы доставки биоматериала, учитывая возможности авиационного транспорта и других видов скоростного сообщения, обеспеченную соответствующим государственным финансированием (заключение централизованного договора МЗ РФ/Роспотребнадзора с транспортными (экспресс) компаниями, имеющими соответствующую лицензию).
- Включение в программу Федеральной системы внешней оценки качества разделов по контролю молекулярно-генетических исследований в части мониторинга резистентности ВИЧ к АРВП.

Таким образом, врачам-клиницистам, врачам клинической лабораторной диагностики, среднему медицинскому персоналу центров по профилактике и борьбе со СПИД и ИЗ следует понимать суть молекулярно-генетических тестов, условия и объем работ для их выполнения, а так же стоимость исследований такого уровня. В диагностических лабораториях специалисты должны обладать достаточными знаниями

и навыками, соответствующими высокой квалификации, для осознанного, безукоризненного выполнения всех требований преаналитического этапа молекулярной диагностики, необходимых для дальнейшего успешного проведения исследования и получения достоверного результата.