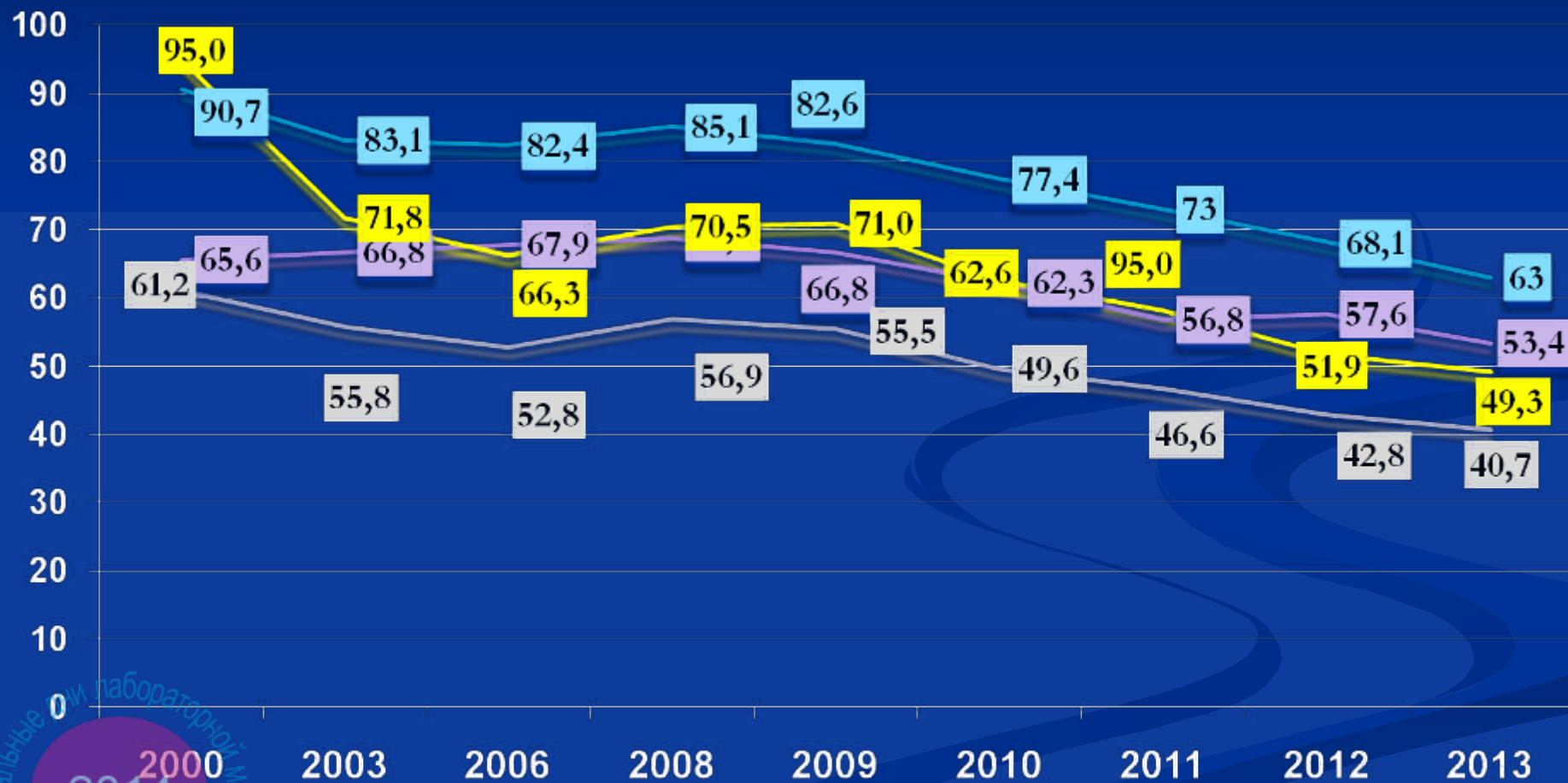


УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

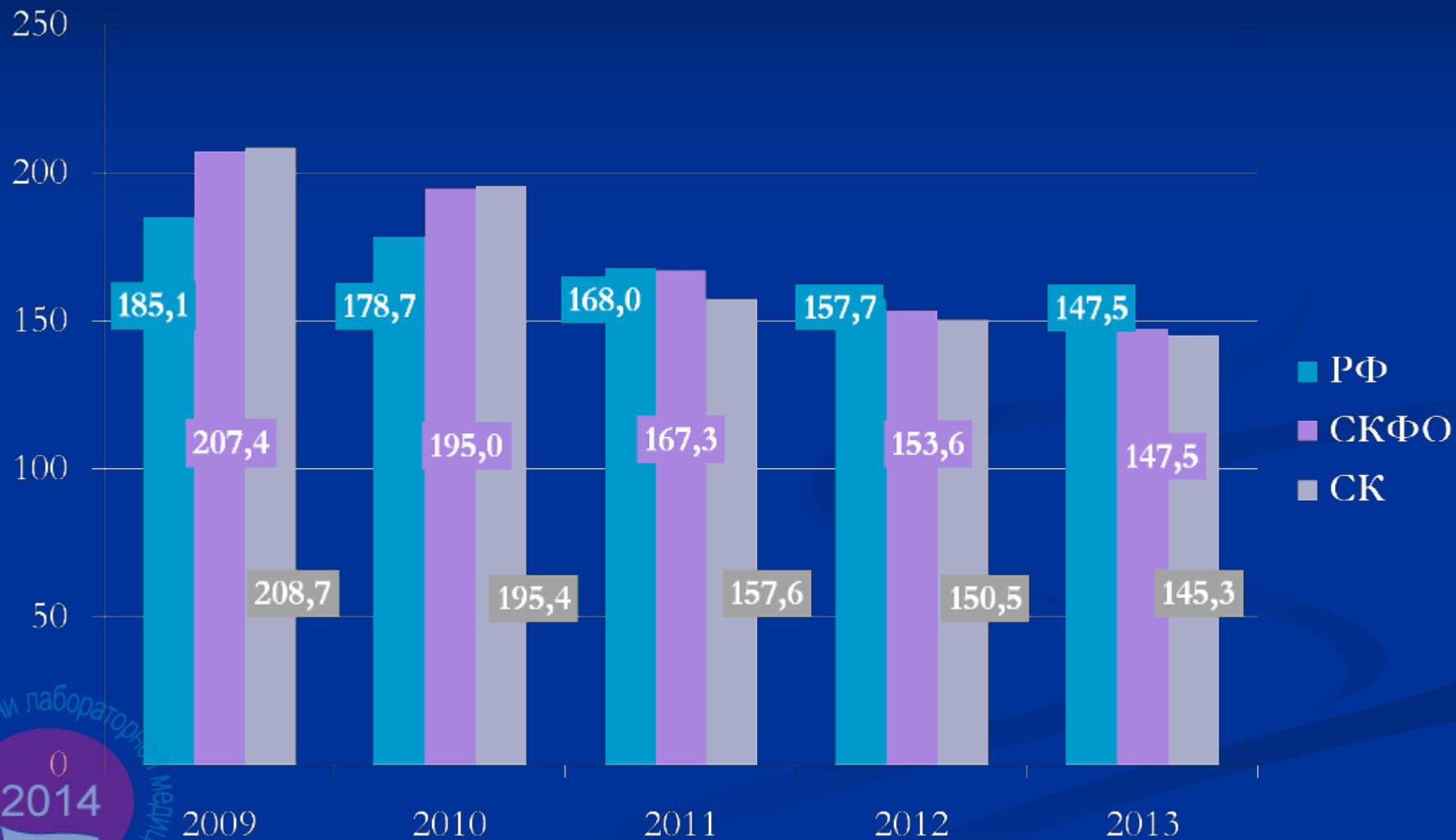
И.Г. Михайлова, Е.В. Алиева, Ю.В. Первушин
ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный
медицинский университет»,
ГБУЗ СК «Краевой клинический
противотуберкулезный диспансер»
2014 год

Показатели заболеваемости всего населения и постоянного населения. Россия, СК (на 100 тыс. нас.)

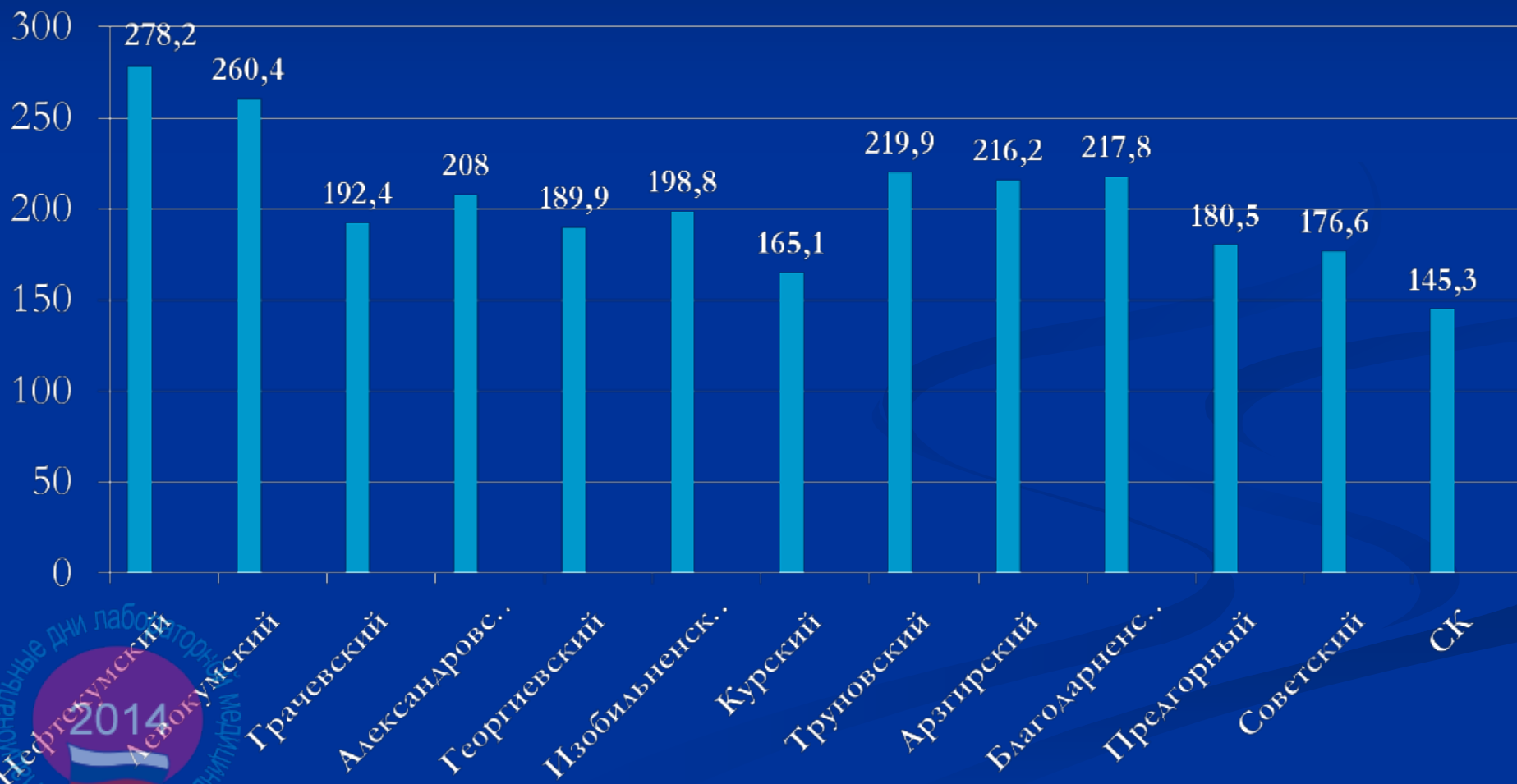


— Все население РФ
 — Постоянное население РФ
— Постоянное население СК
 — Все население СК

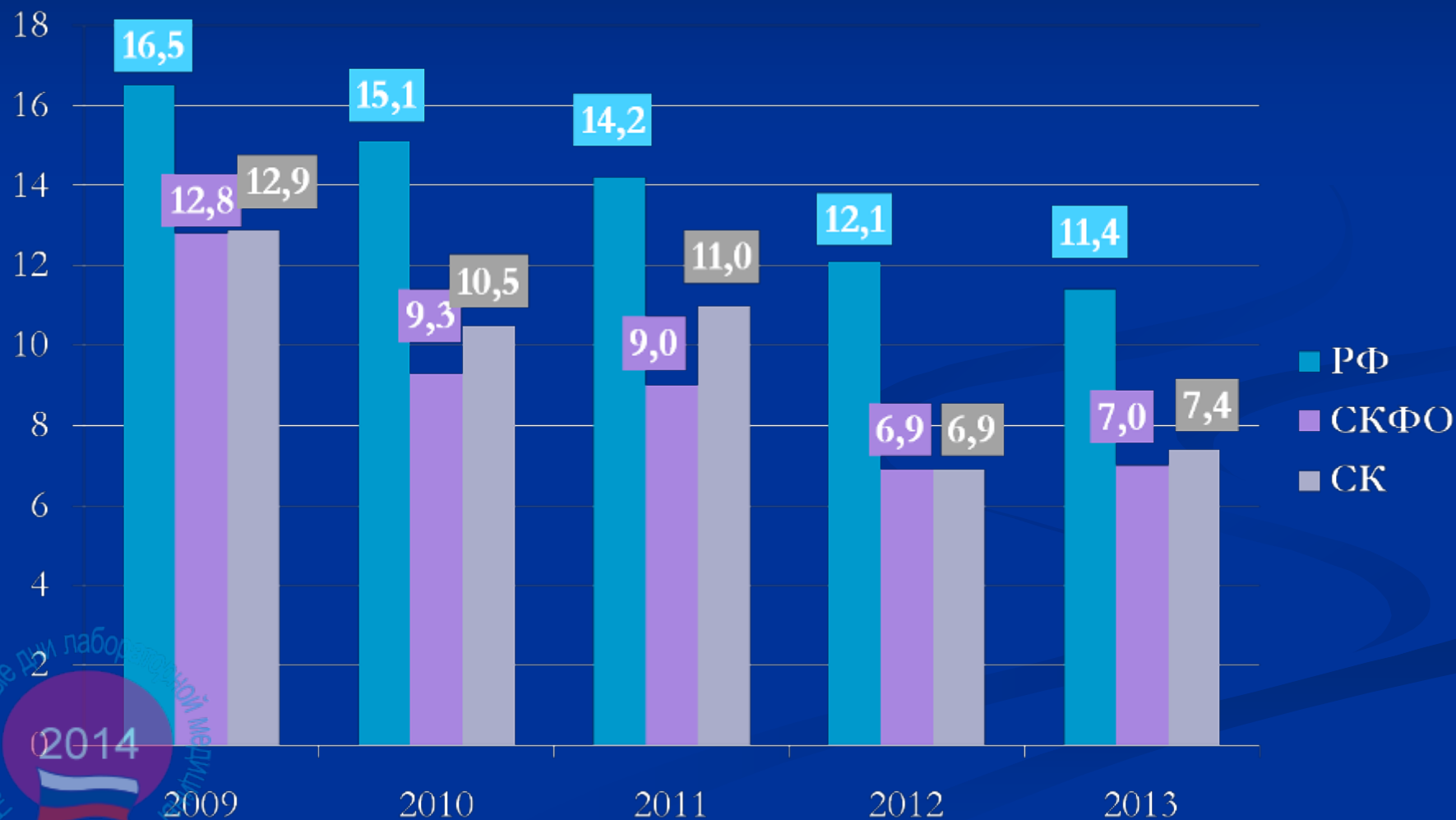
Динамика распространенности туберкулеза в СК за 2009-2013 гг. (на 100 тыс. нас.)



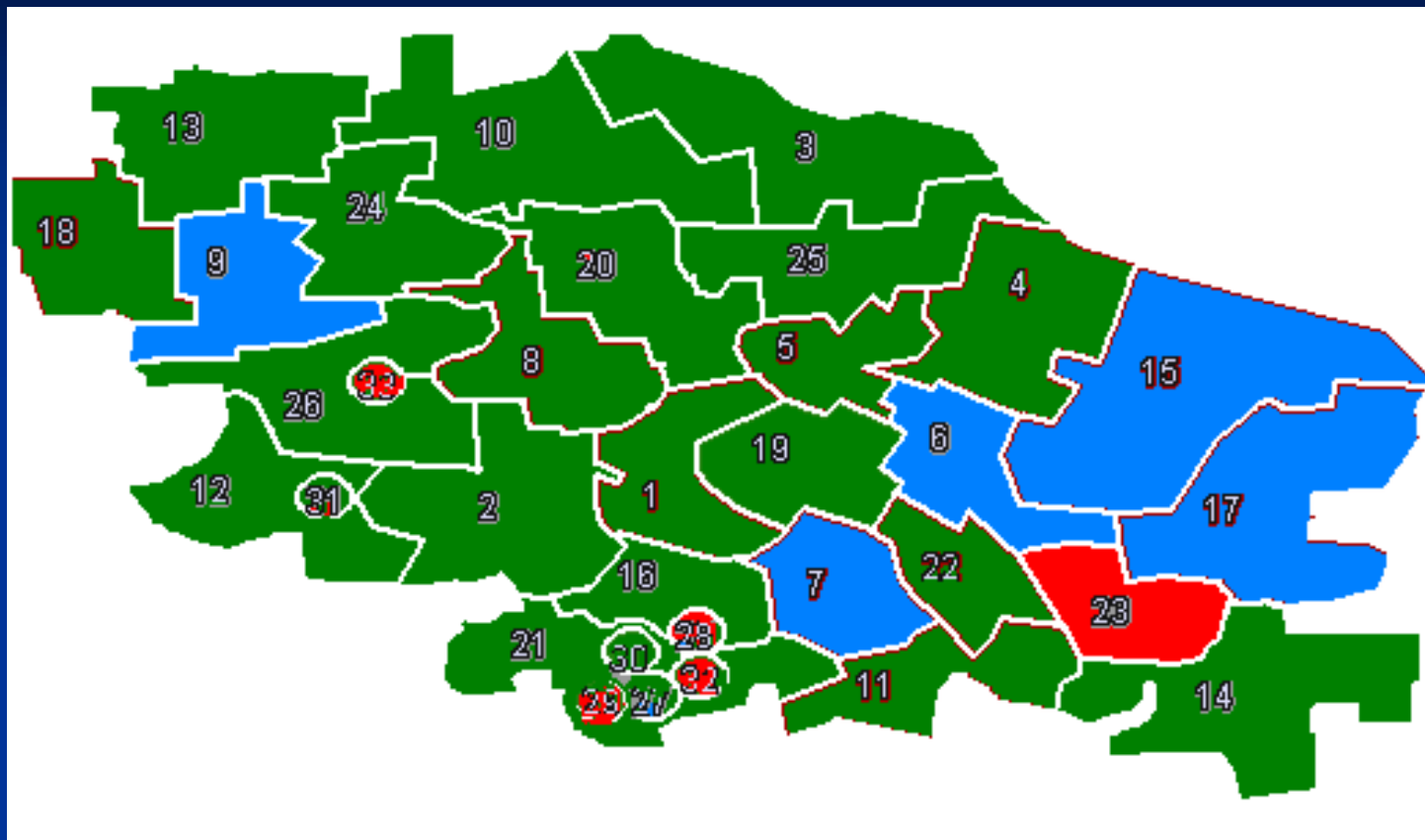
Распространенность туберкулеза в некоторых территориях края в 2013 году (на 100 тыс. населения)



Динамика смертности от туберкулеза на 100 тыс. населения в СК за 2009 – 2013 гг. (на 100 тыс. нас.)



РЕЗУЛЬТАТЫ ИТОГОВОГО РАНЖИРОВАНИЯ СРЕДИ ТЕРРИТОРИЙ СК ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ЗА 2013 ГОД



г. - Кисловодск - 1
г. - Пятигорск - 2
г. - Ставрополь - 3

Буденновский - 31
Георгиевский - 32
Нефтекумский - 33

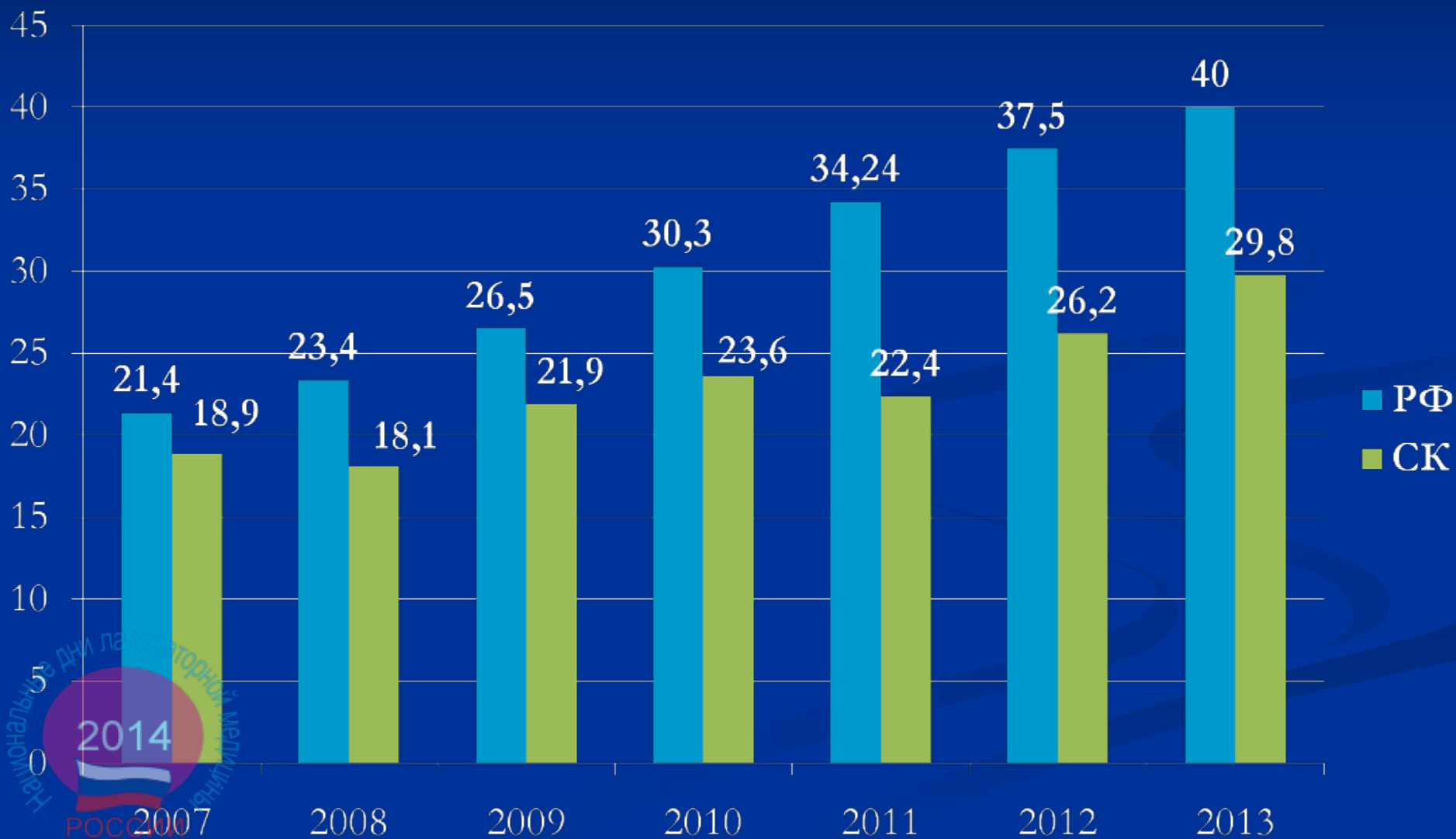
Уровни благополучия



Удельный вес МЛУ среди впервые выявленных больных ТОД из числа БК(+) (%). Форма 33



Доля больных с МЛУ среди контингентов ТОД с БК + (%). Форма 33



За последние 5 лет в Ставропольском крае наступил период стабилизации эпидемической ситуации по туберкулезу, за исключением роста туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.



В условиях напряженной эпидемической ситуации по туберкулезу в РФ актуальна проблема быстрой и качественной диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза.



Время получения результатов исследования на туберкулез классическими микробиологическими методами

- ❖ Микроскопия – 1-2 дня
- ❖ Культуральное исследование – 3-10 недели
- ❖ Лекарственная чувствительность – 3-4 недели

Всего от 6 до 14 недель



Ускоренные методы выявления возбудителя

Культуральные

Культивирование на жидких питательных средах с автоматической регистрацией роста культуры

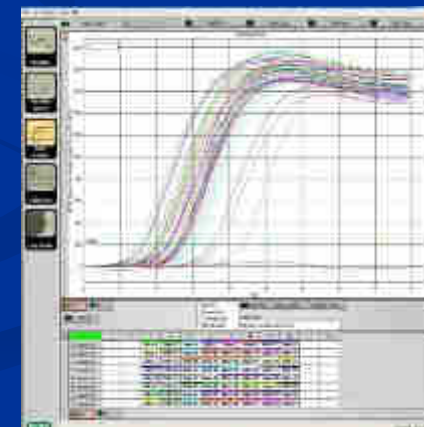
Bactec MGIT 960 7-14 дней



Молекулярно-генетические

Выявление ДНК возбудителя в диагностическом материале

ПЦР 1-2 дня



ВАСТЕС™ MGIT™ 960



ВАСТЕС MGIT 960



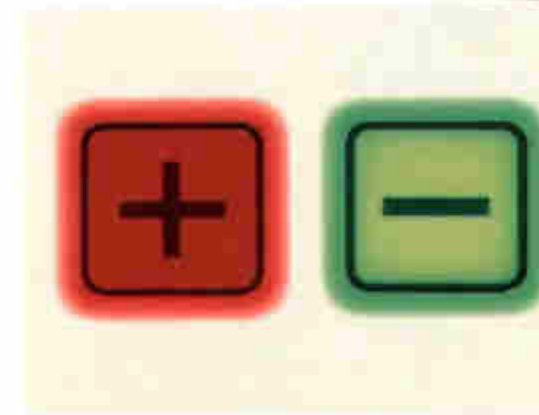
Выбор операции



Сканирование штрих-кода



Загрузка ячейки, выделенной зеленым индикатором



Указатели положительной и отрицательной детекции ЛБ

Технология MGIT

В основе методики лежит изобретение индикаторной пробирки MGIT- *Mycobacteria Growth Indicator Tube*, в дно которой встроен флуоресцентный кислородный датчик

1 раз в час флуоресцентный сенсор считывает результаты тестирования

Положительные: очень яркое оранжевое свечение

на дне пробирки и оранжевое отражение в колене пробирки

Отрицательные: незначительное или полное

отсутствие свечения

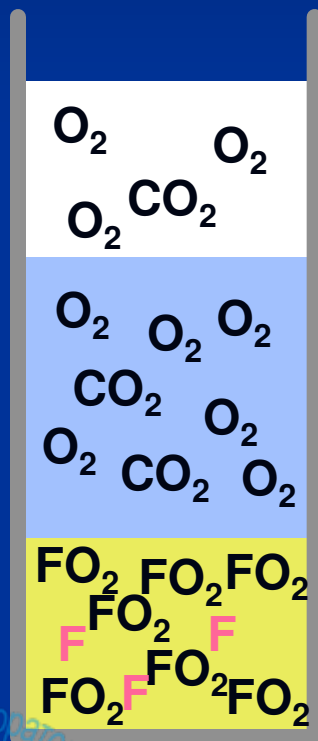
(большое количество растворенного кислорода)



Технология MGIT

Отрицательная пробирка

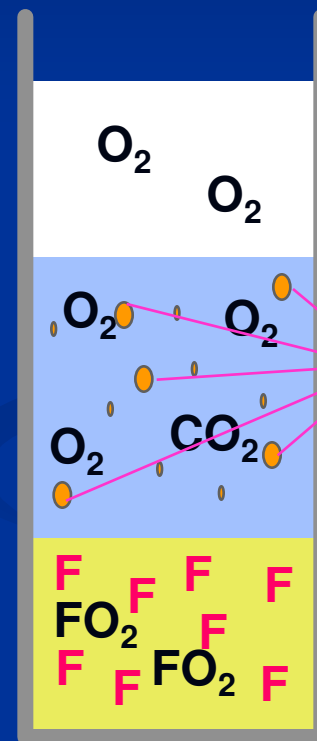
Положительная пробирка



Свободное пространство

Жидкая пит. среда

Флуоресцентный датчик



Кислород потребляющие бактерии

Флуоресценции нет

Сильная флуоресценция



Автоматизированная система предназначена для выявления микобактерий и определения лекарственной чувствительности МБТ

1. Постоянный автоматический мониторинг роста МБТ.
2. Получение достоверных результатов в течение 5-14 дней.
3. Автоматический контроль качества.
4. Производительность (до 8000 тестов в год)

2014

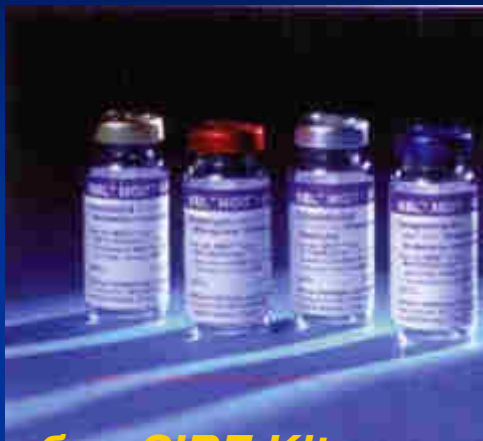


Определение лекарственной чувствительности в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960



- автоматический мониторинг роста микобактерий
- при достижении в контрольной пробирке значения единиц роста (growth units; GU=400) система сообщает о завершении теста
- культура считается устойчивой, если значение единиц роста более 100.

Максимальное время исследования



набор SIRE Kit:
на 40 определений ЛЧ

На чувствительность к SIRE – 14 суток



набор PZA Kit:
на 50 определений ЛЧ

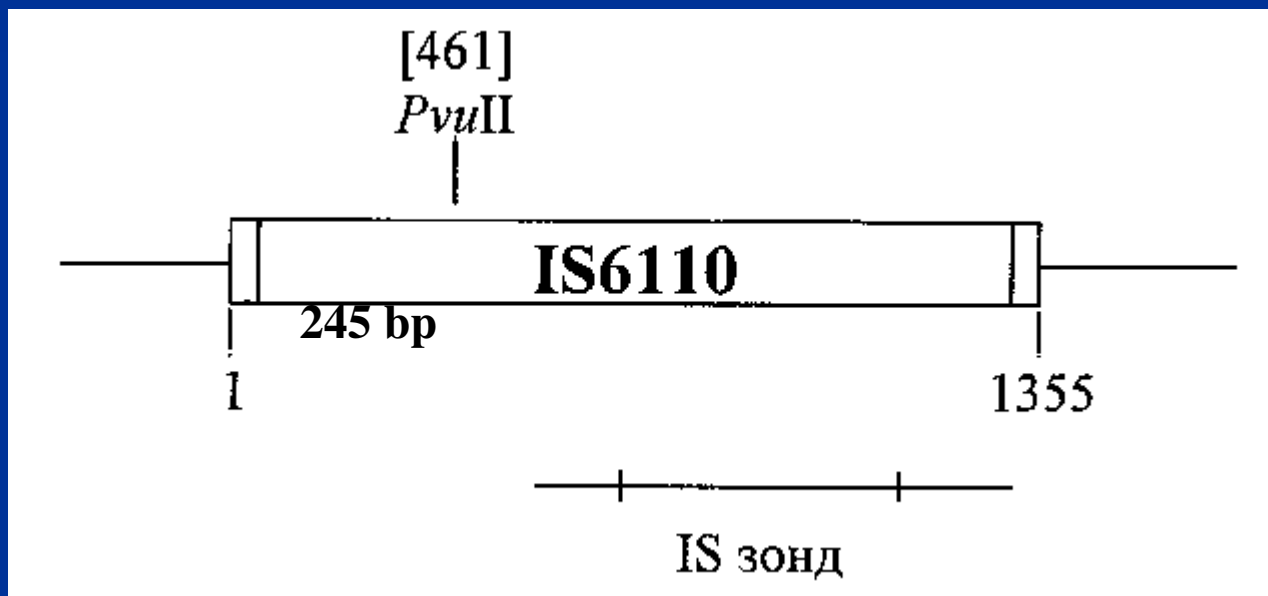
На чувствительность к PZA – 21 сутки

Расшифровка генома МБТ позволила

Выявить последовательность,
характерную только для
микобактерий туберкулезного
комплекса

IS6110

обнаружена только у микобактерий
туберкулезного комплекса



Достоинства метода ПЦР

- Прямое определение возбудителей
- Быстрота проведения анализа
- ПЦР можно проводить с любым диагностическим материалом
- Высокая специфичность
- Высокая чувствительность

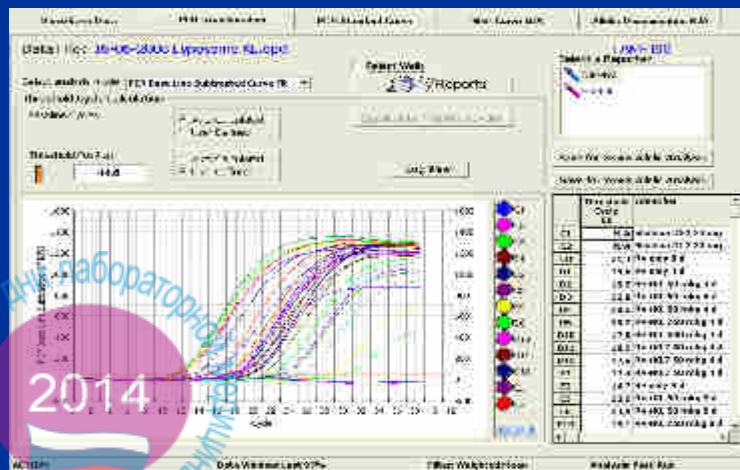
Выявление МБТ методом ПЦР в реальном времени



1. Выделение ДНК
2. Детекция результатов происходит непосредственно во время амплификации

Преимущества перед классической ПЦР

1. Сокращение времени исследования
2. Снижение вероятности контаминации
3. Возможность проведения количественной оценки



Внедрение ПЦР позволило

- значительно сократить сроки подтверждения диагноза туберкулеза
- контролировать эффективность химиотерапии у больных туберкулезом

Лаборатории до определения
лекарственной чувствительности
должны дифференцировать
МБТ от НТМ.



Источники заражения НТМ



Таксономия *M. tuberculosis*

род *Mycobacterium*, семейство *Mycobacteriaceae*,
порядок *Actinomycetales*

■ Микобактерии туберкулезного комплекса:

- *M. tuberculosis*
- *M. bovis* (*M. bovis* BCG)
- *M. africanum*
- *M. microti*
- *M. canetti*
- *M. capre*
- *M. pinnipedii*

4 группы НТМ (Runyon)

Медленнорастущие
видимый рост на среде
более, чем через 7 дней

Быстрорастущие
видимый рост на среде
менее, чем через 7 дней

1. Фотохромогенные

M. kansasii
M. marinum
M. simiae

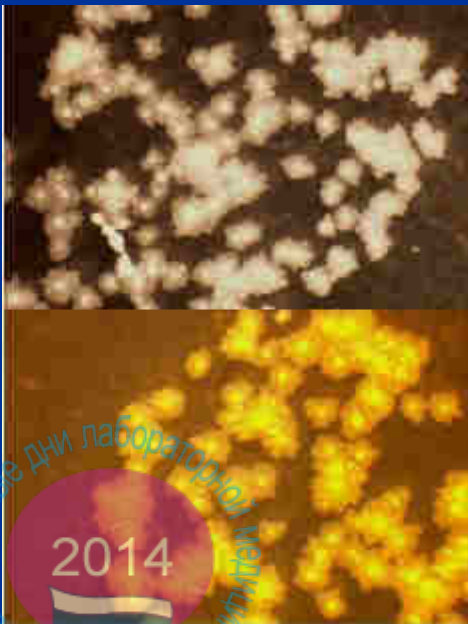
2. Скотохромогенные

M. gordonae
M. szulgai
M. scrofulaceum

3. Нехромогенные

M. avium complex (MAC)
M. xenopi
M. malmoense

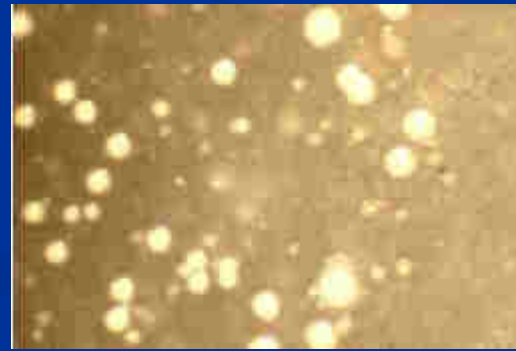
M. chelonae
M. abscessus
M. fortuitum



колонии *M. kansasii* до и
после экспозиции на свету



колонии *M. gordonae*



колонии *M. avium*



Методы дифференциации МБТ от НТМ

- ПЦР IS6110, выявляющая вставочную последовательность, присутствующую только у микобактерий туберкулезного комплекса, дифференциация микобактерий внутри комплекса.
- Иммунохроматографический метод (ID-test) отличается простотой выполнения и обеспечивает идентификацию за 15 минут.



Современные методы определения лекарственной чувствительности микобактерий

Культуральные

VacTec MGIT 960
ПТП 1-го и 2-го ряда

7-14 дней
(после получения культуры)

Молекулярно-генетические (2-3 дня)

- Мультиплексная ПЦР (Синтол)
RIF, INH, Fq
- ТБ-биочип, ТБ-биочип-2
RIF, INH, Fq
- ДНК-стрипы (Hain lifescience)
 - GenoType® MTBDRplus
RIF, INH
 - GenoType® MTBDRsl
фторхинолоны
аминогликозиды/циклические пептиды
этамбутол
- -GeneXpert MTB/RIF (Cepheid Inc.)
 - секвенирование

В бактериологической лаборатории ГБУЗ
СК «ККПТД» используются

ПЦР в режиме реального времени
GeneXpert MTB/RIF



Технология «Амплитуб»

➤ ПЦР-РВ

- ❑ Обнаружение ДНК МБТ и количественный анализ
- ❑ Определение устойчивости к рифампицину и изониазиду

Из диагностического материала 2-3 дня

Амплификаторы



Картриджная технология GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Inc.) позволяет одновременно

- выявлять возбудителя
- определять принадлежность к МТК
- определять чувствительность к рифампицину
- в течение 2-х часов



GeneXpert

Обработка образца мокрота/осадок

Добавить 2 мл обработанной пробы в картридж

1. Добавить буфер :1



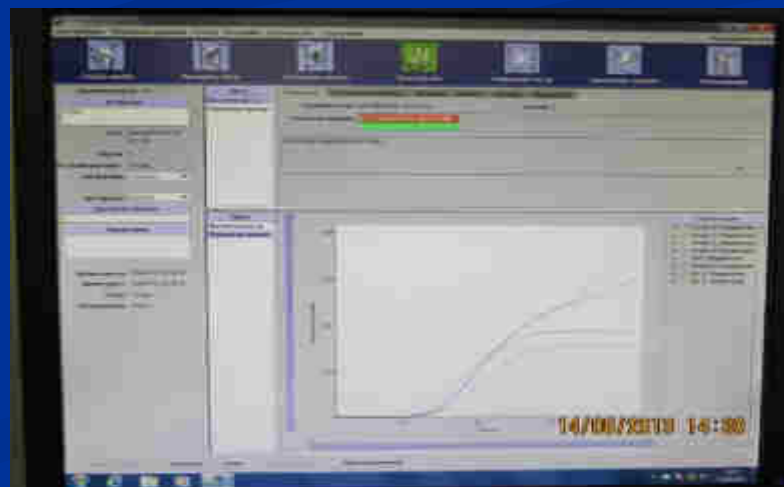
Перемешать и
оставить на 10 мин.

Перемешать и
Оставить на 5 мин



Загрузить в прибор





Преимущества системы GeneXpert

- Выделение и амплификация производится в картридже, предобработка диагностического материала сводится к минимальным манипуляциям
- Возможность контаминации резко сокращается
- Резко сокращается возможность операторской ошибки
- Не требуется зонирования помещений

Развитие технологий, направленных на снижение трудозатрат

В бактериологической лаборатории ГБУЗ СК «ККПТД» внедрена автоматическая станция фирмы NorDiag Arrow (Норвегия) для выделения ДНК из диагностического материала от больных туберкулезом



Клинический образец

Направление на
полный комплекс исследований

Направление на
ПЦР

NaIc-NaOH

осадок

- Посев (плотные и жидкие пс)
- Микроскопия

В боксе II класса биобезопасности:
обработка инактивирующим реагентом

Выделение в автоматической станции NorDiag (12 образцов –45 минут)

Внесение ДНК в пробирки с амплификационной смесью

Термоциклер с оптическим модулем:
амплификация в режиме реального времени

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫДАЧА ОТВЕТОВ В КЛИНИКУ

Современные технологии микробиологической диагностики туберкулеза



Внедрение высоких технологий в алгоритм бактериологической диагностики туберкулеза позволяет проводить коррекцию химиотерапии в интенсивную фазу лечения, что дает возможность в более короткие сроки добиться абациллирования пациентов, повысить эффективность лечения, предотвратить распространение лекарственно-устойчивых штаммов МБТ.





ГБУЗ СК
ККПТД

Благодарю за внимание

