



# Эффективность различных методов бактериологической диагностики туберкулеза

Янн Е.В., заведующая КДЛ Республиканская клиническая  
туберкулезная больница МЗ ДНР



# Бактериологическая диагностика туберкулеза на современном этапе

Необходимость проведения широкого комплекса микробиологических исследований из-за:

- ▶ Олигобациллярность
- ▶ Эпизодичность выделения
- ▶ Изменение культуральных свойств микобактерий, утрата ими способности роста на некоторых питательных средах.
- ▶ Изменение тинкториальных свойств возбудителя, утрата кислотоустойчивости



# Лабораторные методы диагностики туберкулеза

- ▶ Бактериоскопические

  - Световая микроскопия

  - Люминесцентная микроскопия

- ▶ Культуральные

  - Твердые среды

  - Жидкие среды

- ▶ Молекулярно-генетические

  - Технология GeneXpert

  - HAIN-тест



# Чувствительность бактериоскопии по Циль-Нильсену

Количество бактерий, определяемых при микроскопии мазка	Количество бактерий в 1мл мокроты	Вероятность получения положительного результата
Более 10 в поле зрения	Около 500 000	99,95%
1-9 в поле зрения	Около 100 000	96,2%
1-9 в 10 п/зр	Около 50 000	90%
1-9 в 100 п/зр	Около 30 000	80%
1-2 в 300 п/зр	5 000-10 000	50%
0 в 300 полях зрения	Менее 1 000	Менее 10%

# Чувствительность бактериоскопии

**Зависит от качества материала** ( отрицательный результат при плохо собранном материале нельзя считать негативацией, у одного и того же пациента в разных пробах , собранных 2 дня подряд возможен различный результат)

**Зависит от размера поражения органа** ( каверна диаметром 2 см с дренирующим бронхом-100млн МБТ, поражение 2 см без деструкции- 100-1000МБТ.

**Обильная неспецифическая флора, кровь** в материале может затруднить исследование.

Чувствительность метода от 50% до 99%. Специфичность 98%

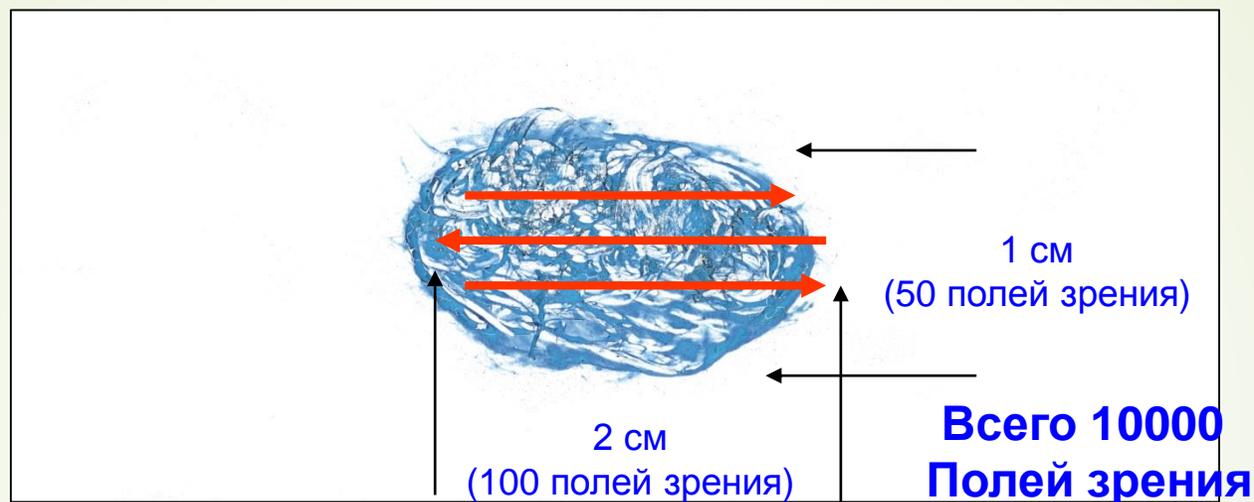


# Возможности бактериоскопии

Возможности метода **ограничены:**

- в лабораторию доставляется 3-10 мл мокроты;
- на стекло наносится 0,01 мл осадка биоматериала;
- получаем мазок 1×2 см на площади 200мм<sup>2</sup>
- 1 п/зр в микроскопе составляет 0,02мм<sup>2</sup>
- в мазке **10000 п/зр**, смотрим 300 п/зр (**6% площади**)
- полуколичественный метод ( иногда возможна разная оценка разными микроскопистами)

# Возможности метода бактериоскопии



300 полей зрения (отрицательный результат) – 6 % площади мазка  
100 полей зрения – 2 % площади мазка

**Возможны ошибки из-за ограничений самого метода!!**

# Люминесцентная микроскопия

- Считается более эффективным (на 8-10%) по сравнению с Циль-Нильсеном ( если используется осадок)

( используется меньшее увеличение  $\times 300$ , просматривается больше полей зрения (9% мазка) за меньшее время).

Рекомендован в лабораториях с нагрузкой более 100мазков в день.

- Требуется соблюдения ряда **условии**: рН, освобождение от слизи ( при несоблюдении возможны как ложно «+», так и ложно «-» ответы), могут светиться не только КУБ, но и другие микроорганизмы.

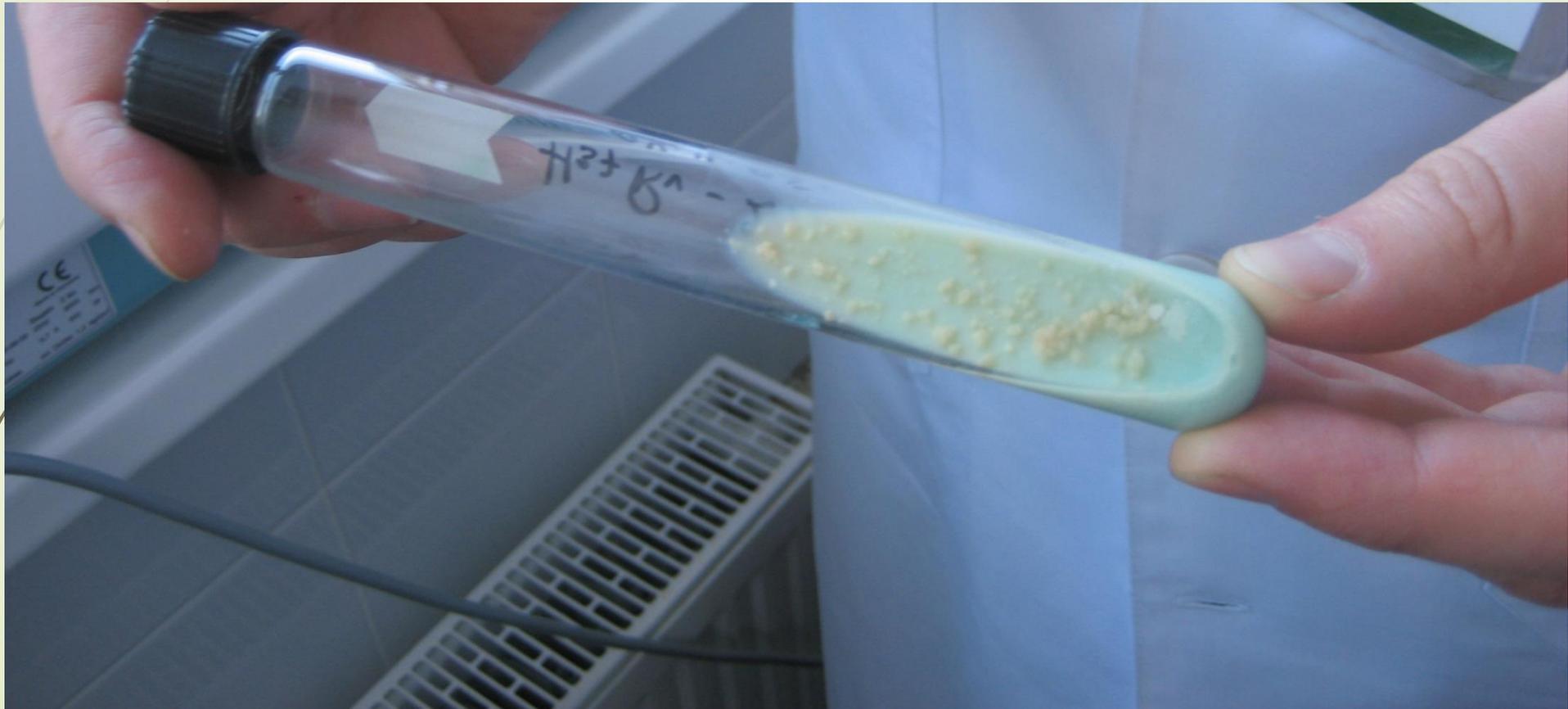
- Все положительные находки обязательно подтверждать методом Циль-Нильсена, что увеличивает нагрузку и расход реактивов.

- Более дорогостоящий (реактивы, микроскоп)

# Возможности культурального исследования

- ▶ Более чувствительный по сравнению с бактериоскопией (20-40%), в сравнении с твердой средой жидкая +15-20%, возможность выполнить ТЛЧ.
- ▶ Идентификация микобактерий.
- ▶ Не всегда можно получить рост даже при КУБ «+» (гибель МБТ, угнетенный метаболизм, жесткая обработка). Риск зароста неспецифической микрофлорой (больший на жидких средах чем на твердых)
- ▶ Очень поздний рост на твердых средах.
- ▶ Внедрение жидких питательных сред не только ускоряет получение ответа, но и увеличивает опасность перекрестного заражения культур (1-4% даже в самых квалифицированных и оснащенных баклабораториях)
- ▶ «Идеальной» или «лучшей» среды не существует!

# Среда Левенштейн-Йенсена



# ВАСТЕС 460ТВ



1. Первая полуавтоматизированная система ( снята с производства)
2. Флаконы с радиоактивно меченной жидкой средой ВАСТЕС 12В для:
  - обеспечения роста микобактерий и их обнаружения
  - идентификация МБТ
  - определения лекарственной чувствительности.
3. Сократило время роста МБТ до 14дней.
4. Проблема с утилизацией радиоактивных отходов, использование игл при посеве.

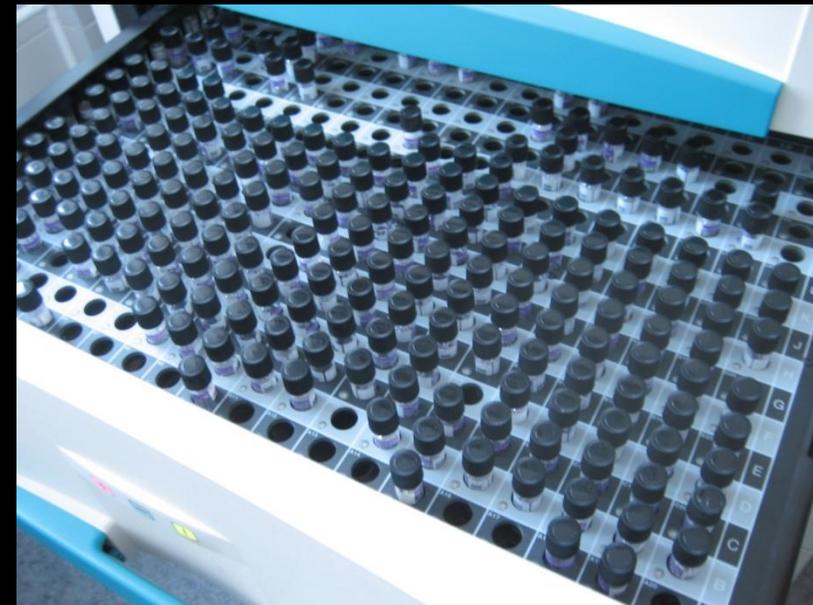
В 1977 G.Middlebrook впервые описал способ радиометрической детекции МБТ.

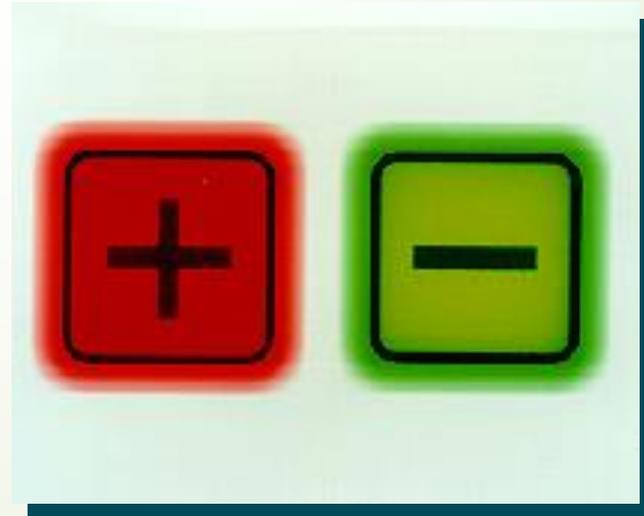
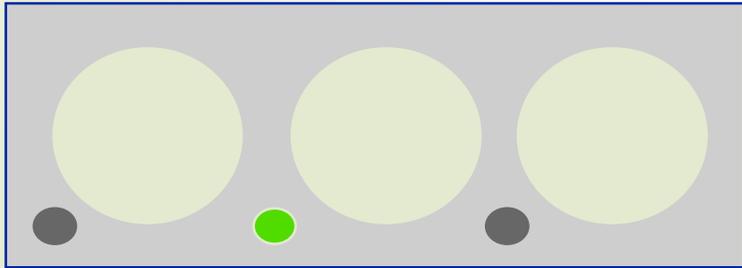
# ВАСТЕС™ MGIT™ 960



- Автоматизированная система для выявления микобактерий
- Автоматизированная система для определения лекарственной чувствительности
- Нерадиометрический метод
- Флюоресценция
- Неинвазивный метод, не требует игл
- Большая рабочая нагрузка
- Не применяется для посева крови

# BACTEC™ MGIT™ 960





## Скорость выделения культуры возбудителя туберкулеза

Классический метод	19 - 36 день <b>27,5</b>
Bactec™ MGIT™ 960	5 – 22 дня <b>12,95</b>
Разница	в <b>2,1</b> раза



## Продолжительность отрицательного анализа

Классический метод	70 дней( 10 недель)
Bactec™ MGIT™ 960	42 дня (6 недель)
Разница	в 1,7 раз быстрее

# ТЕСТ на лекарственную чувствительность ( ВАСТЕС MGIT 960)





## Скорость определения лекарственной чувствительности

Классический метод	21 - 28 дней <b>22,75</b>
Vastec™ MGIT™ 960	5 – 14 дней <b>8,49</b>
Разница	в <b>2,68</b> раза

Скорость выделения МБТ и определения  
лекарственной чувствительности  
(полный анализ - от посева до ответа)

Классический метод	40 - 107 дней <b>68,44</b>
Vactec™ MGIT™ 960	17 – 35 дней <b>25,05</b>
Разница	в <b>2,73</b> раза

8 декабря 2010 года ВОЗ одобрила  
новый и новаторский экспресс-тест на  
туберкулез.

С его помощью можно ставить точный  
диагноз примерно через 2 часа



# Диагностический тест XpertMTB/RIF ( достоинства и недостатки)

## Достоинства

- Простой и легкий в использовании
- Быстрый
- Автоматизированный
- Более чувствительный и специфичный чем микроскопия (131КОЕ/мл)
- 2 результата одновременно
- выявлять туберкулез у ВИЧ-инфицированных пациентов
- Малый риск инфекционных аэрозолей
- Не требуется зонирование помещений

## Недостатки

- Дорогой
- Условия проведения теста (электричество, температура помещения)
- Случаи MDR-TB требуют обязательного культурального подтверждения
- Малое количество обследуемых образцов (16-20 образцов /день)
- Ежегодная калибровка

# Чувствительность и специфичность теста GeneXpert (обзор данных ВОЗ 2010 год)

Результаты демонстрационных испытаний 6673 человек из 6 территорий

## ➤ Выявление

чувствительность 98% (пациенты мазок+)

чувствительность 80% (пациенты мазок-)

специфичность 99%. Использовали штаммы как НТМ, так и вторичной флоры. 1%- некоторые штаммы НТМ в определенной концентрации препятствуют обнаружению МБТ.

## ➤ Устойчивость к RIF: суммарная чувствительность в случае устойчивости к RIF на средах-95.1%

суммарная специфичность в случае фенотипической чувствительности к RIF- 98,3%. При оценке референтных штаммов результаты 100%

# Чувствительность и специфичность теста GeneXpert

Элиза Андрицони

Врачи без Границ/Институт Тропической Медицины, Антверпен



Результаты мета-анализа 18 исследований (Chang 2012)

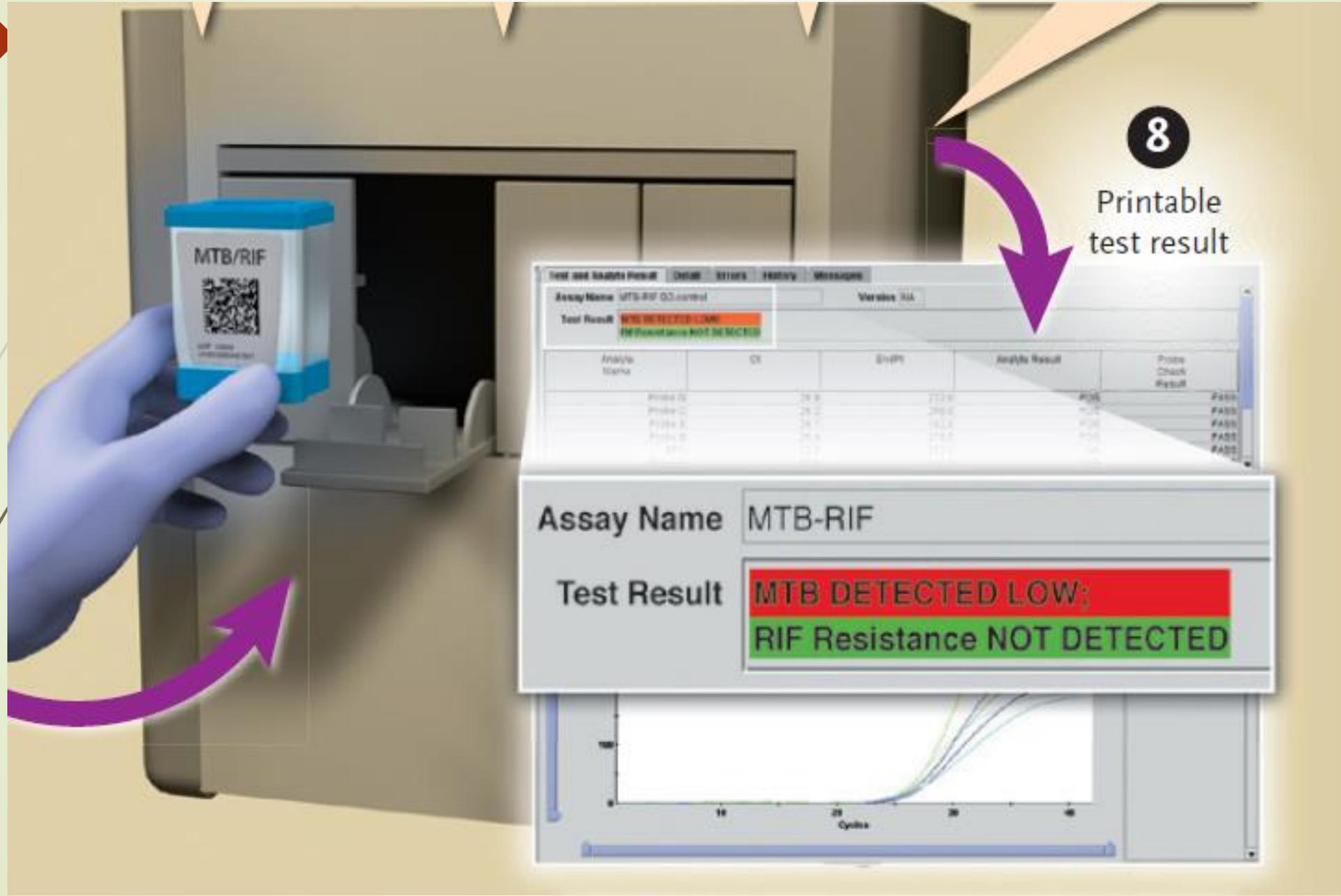
- Выявление случаев: суммарная чувствительность 90.4% и специфичность 98.4%
- Устойчивость к RIF: суммарная чувствительность 94.1% и специфичность 97%
- Результативность во внелёгочном ТБ: суммарная чувствительность 80% и специфичность 86%

# Чувствительность и специфичность теста GeneXpert (обзор данных ВОЗ 2017 год)

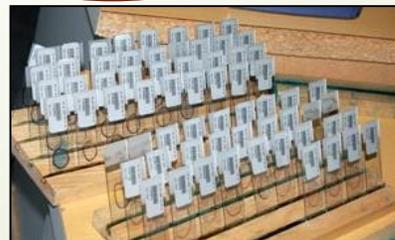
- Исследование с участием почти 10000 человек ( специфичность-99%, чувствительность от68% для образцов мокроты с М-К+ до 98% для образцов мокроты с М+К+)
- Для внелегочного туберкулеза чувствительность по плевральной жидкости 17%, по спинномозговой- 80%
- Чувствительность теста для выявления устойчивости к рифампицину 95%, специфичность 98%. Эти показатели зависят от распространенности устойчивости к рифампицину в регионе

Устойчивость к RIF	Чувствительность	Специфичность
Менее 15%	91%	99%
Более 15%	96%	97%

# Простота и ясность теста



# Порядок проведения комплексного бактериологического исследования



# Диагностический тест GeneXpert (ограничения)

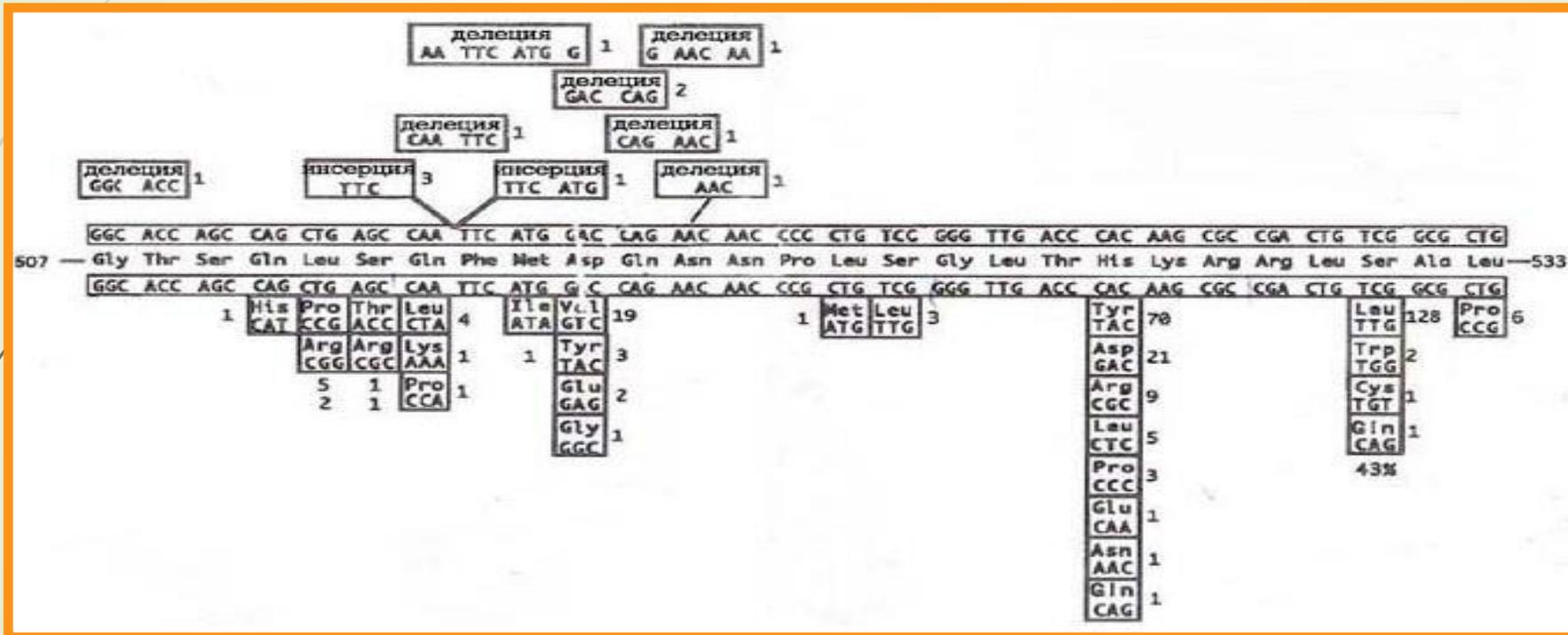
- Позитивный результат теста не всегда свидетельствует о наличии жизнеспособных организмов. Однако, можно допустить наличие МБТ и резистентности к рифампицину при клинико-рентгенологическом ухудшении
- Нельзя оценивать ответ на лечение без учета клиники и рентгена , поскольку ДНК может выявляться и после проведения антимикробной терапии
- Ингибиторы теста - кровь, гной, частицы пищи



## Возможные результаты GeneXpert (проблемы)

- Ошибка (error)
- Результат недействительный (invalid)
- Нет результата (NO RESULT)
- Промежуточный (устойчивость к рифампицину не интерпретируется)

# Фрагмент гена *rpoB* с мутациями, ответственными за устойчивость *M. tuberculosis* к рифампицину



(участок гена , ответственный за устойчивость к рифампицину)  
содержит 81 пару нуклеотидов  
5 % случаев устойчивости связаны с другими участками.

## Аналитические исследования

- Молекулярные маяки, нацеленные на ген *rpoB*, охватывают все мутации, выявленные в более чем 95,1% всех штаммов, резистентных к рифампицину.
- Не существует перекрестной реактивности с НТМ (нетуберкулёзные микобактерии);
- ТБ устойчивость к рифампицину также выявляются в присутствии нетуберкулёзного ДНК или смешанных устойчивых и чувствительных штаммов.

## В 2018г. ВОЗ рекомендовала использовать картриджи Xpert MTB/RIF Ultra

- ▶ Порог обнаружения МБТ 11,8 КОЕ/мл (чувствительность на 5% выше чем у картриджей Xpert MTB/RIF)
- ▶ Рабочий цикл ( 65 минут для положительных , 77 минут для отрицательных результатов), у картриджей Xpert MTB/RIF 110 минут
- ▶ Возможные результаты( МБТ не обнаружены, МБТ обнаружены- высокое, среднее, низкое, очень низкое количество, «следы МБТ»( содержание ДНК МБТ близко к порогу обнаружения).



# Молекулярно-генетические технологии

- ▶ По рекомендациям ВОЗ наиболее эффективными признаны методы, основанные на гибридизации с ДНК-зондами - **ДНК-стрип технология**. По итогам 2009 года самым применяемым в мире и Европе признан *Наip-тест*.



# Нain-тест позволяет

- Дифференцировать микобактерии туберкулезного комплекса - *M.tuberculosis* complex: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*. (GenoType MTBC)
- Идентифицировать 30 видов клинически-значимых нетуберкулезных микобактерий. (GenoType Mycobacterium AS, GenoType Mycobacterium CM)

# Нain-тест позволяет

- Определить лекарственную чувствительность к изониазиду и рифампицину. (GenoType MTBDRplus)
- Определить лекарственную чувствительность фторхинолонам, аминогликозидам и циклическим пептидам и этамбутолу (GenoType MTBDRsl)
- Возможно исследование ручным методом и автоматическим.
- Метод прошел валидацию ( 92,8%- результат подтвердился, 7,2%- сомнительный, нечитаемый)



# Методология GenoType® MTBDRsl (особенности)

- ▶ Позволяет идентифицировать *M.tuberculosis complex* и определить устойчивость к фторхинолонам в комплексе (офлоксацин и моксифлоксацин), определяя мутации в гене *gyrA* (кодирует ДНК гиразу)
- ▶ К аминогликозидам в комплексе (капреомицин, канамицин, амикацин), кодирует ген *16S rRNA*
- ▶ К этамбутолу определяя мутации в гене *embB* (кодирует трансферазу)



# Этапы исследования:

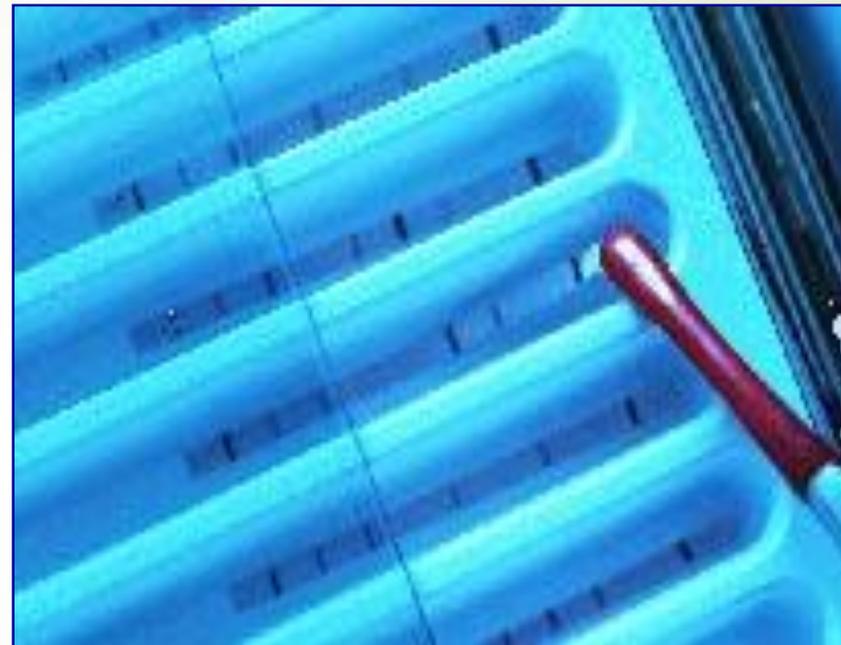
- ▶ Амплификация
- ▶ Реверс-гибридизация:
  - Денатурация продуктов амплификации;
  - Гибридизация ампликонов на мембраносвязанных зондах;
  - Отмывка;
  - Реакция окрашивания стрипов;
  - Оценка результатов с помощью шаблона.

# GenoType® MTBDR

**Просто**

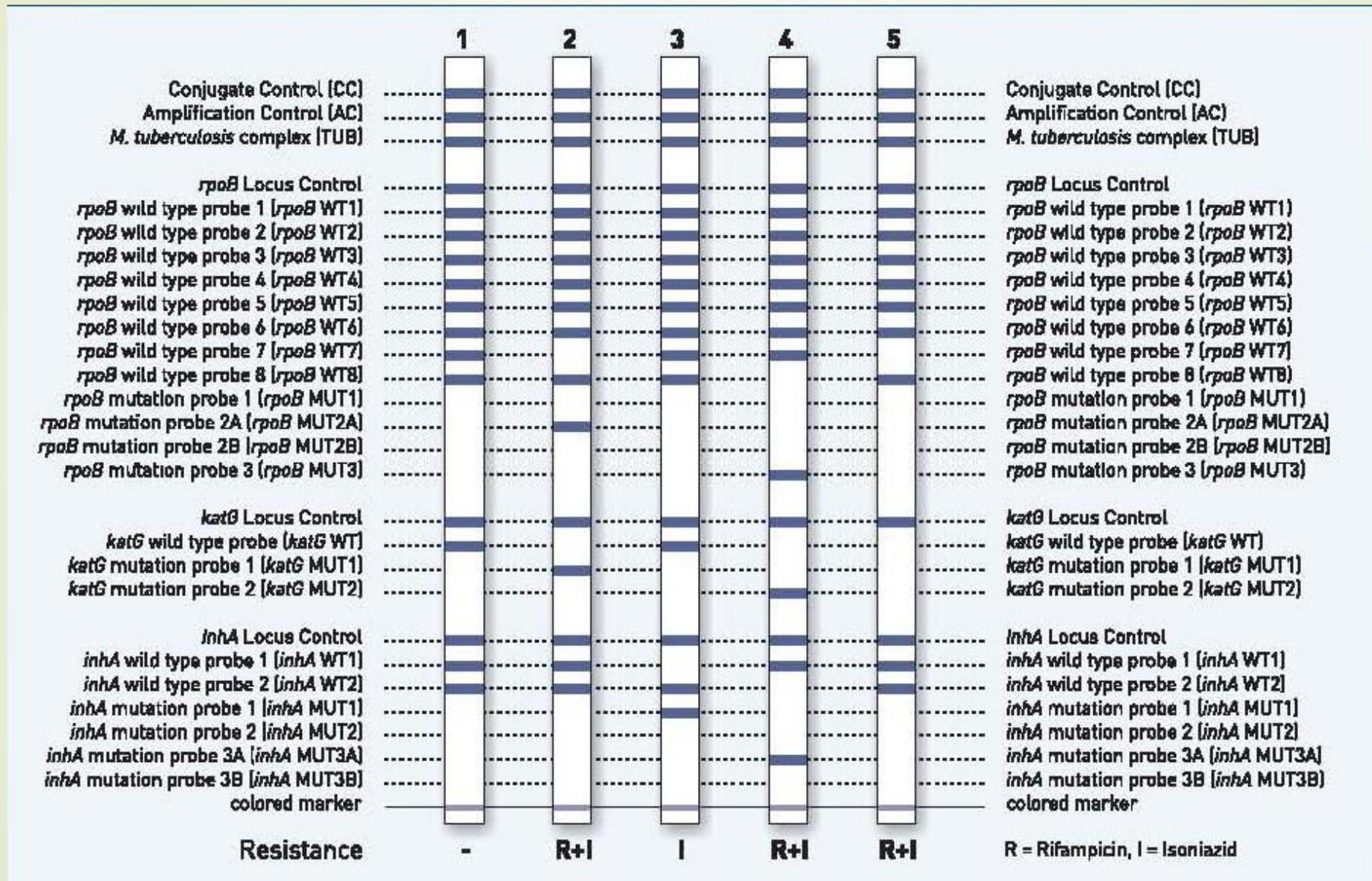
**Безопасно**

**Быстро**



# GenoType® MTBDRplus

39

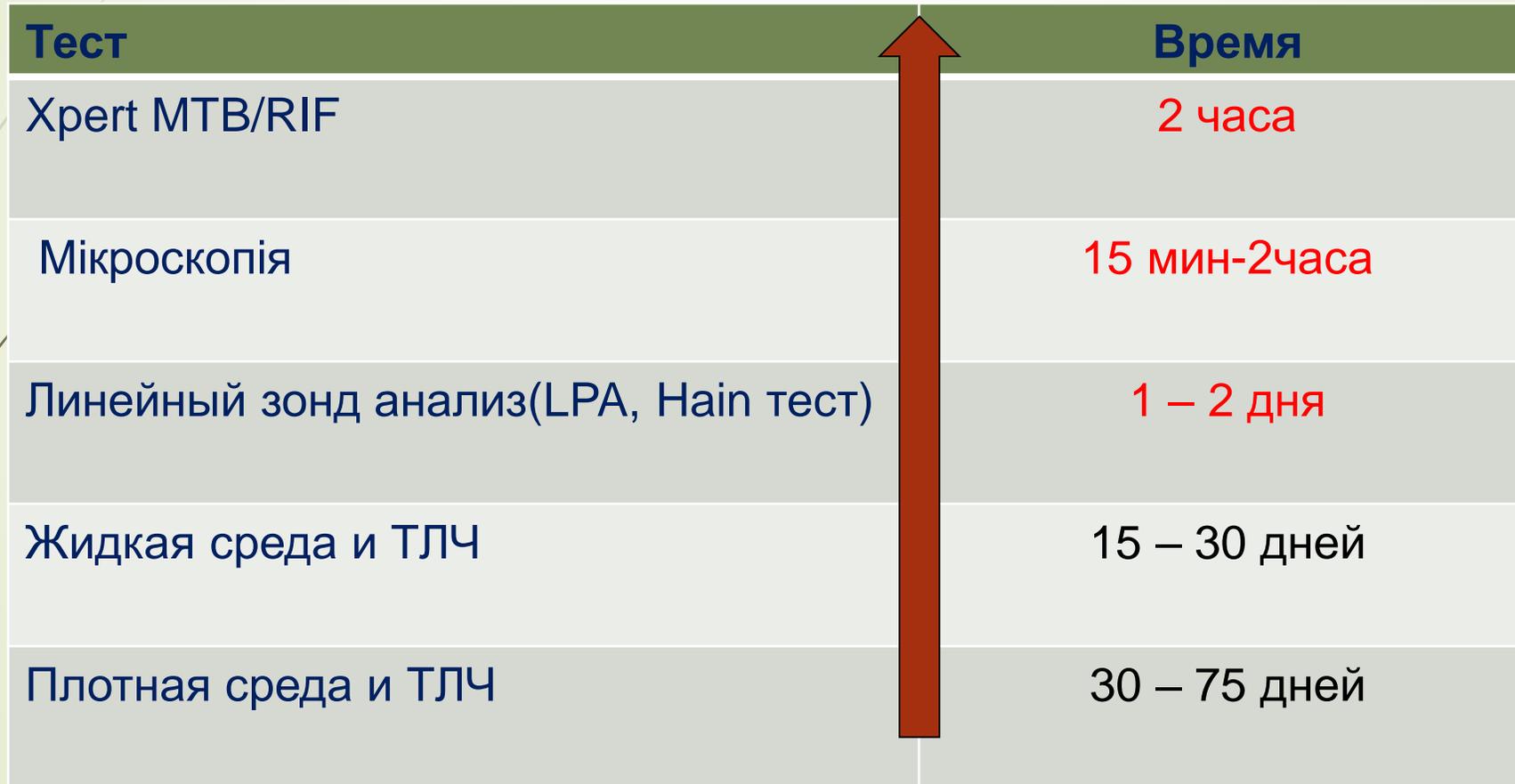


## Сравнение чувствительности методов диагностики ТБ

Тест	Минимальное значение для выявления ( КОЕ/мл)
Культура	10 - 100
Xpert	50 - 150
Линейный зонд анализ(LPA, Hain тест)	5 000 - 10 000
Бактериоскопия	5 000 - 10 000

*КОЕ – колониеобразующие единицы*

## Сроки выполнения исследования



Тест	Время
Хpert MTB/RIF	2 часа
Мікроскопія	15 мин-2часа
Линейный зонд анализ(LPA, Hain тест)	1 – 2 дня
Жидкая среда и ТЛЧ	15 – 30 дней
Плотная среда и ТЛЧ	30 – 75 дней

# Выводы

- Только из качественного материала можно провести качественное исследование ( 60% конечного результата зависит от качества собранного материала и долабораторного этапа , 40% от правильно поставленной работы в лаборатории).
- Внедрение новых методов не может заменить методы, относящиеся к « золотому стандарту» диагностики туберкулеза!
- Только комплексное обследование пациента (клинико-рентгенологическое и лабораторное) позволяет поставить правильный диагноз и назначить правильное лечение.