

Использование иммунохроматографического экспресс-теста для идентификации микобактерий туберкулезного комплекса после выращивания на жидких и плотных питательных средах

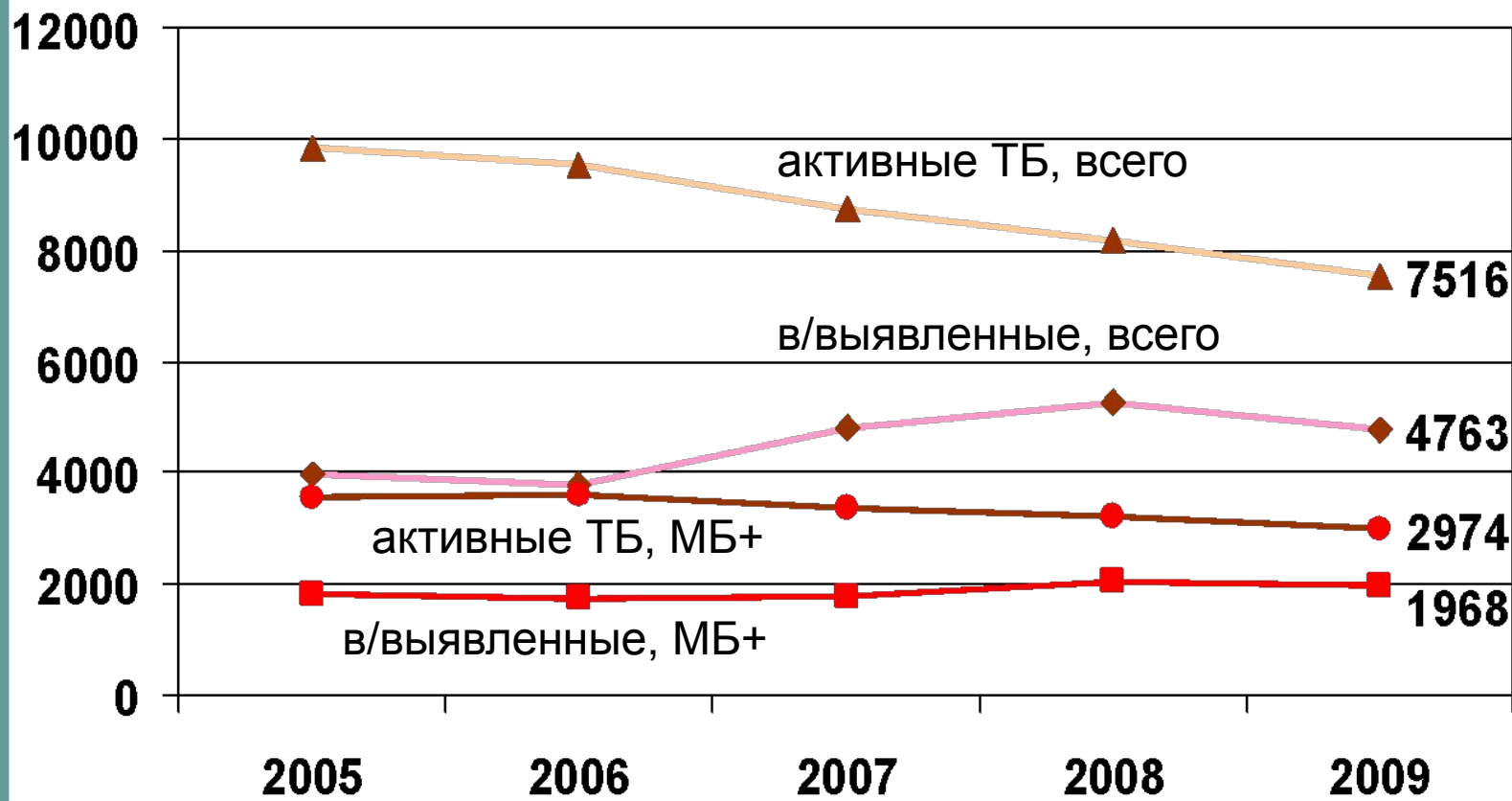
С.А. Попов

зав. лабораторией микробиологии  
НИИ фтизиопульмонологии

Первый МГМУ им. И.М.Сеченова  
Москва, 12-05-2011

# Туберкулез, г. Москва

## Основные эпидемиологические показатели, абс. значения



# Объемные показатели исследований, г. Москва, 2009 г.

- Посевов диагностических – 40 тыс.
- Посевов для контроля лечения – 62 тыс.
- Посевов ускоренной диагностики – 28 тыс.
- Выявляется культур МБ – 8,3 тыс.
  - нуждаются в первичной идентификации – 8,3 тыс.
  - нуждаются в видовой дифференциации 8,3 тыс.

# Этапы идентификации микобактерий туберкулеза

- Первичная идентификация  
(культуральные характеристики)
  - длительность роста на средах;
  - пигментообразование;
  - морфология колоний;
  - наличие кислотоустойчивой окраски;
  - температура роста.

# Этапы идентификации микобактерий туберкулеза

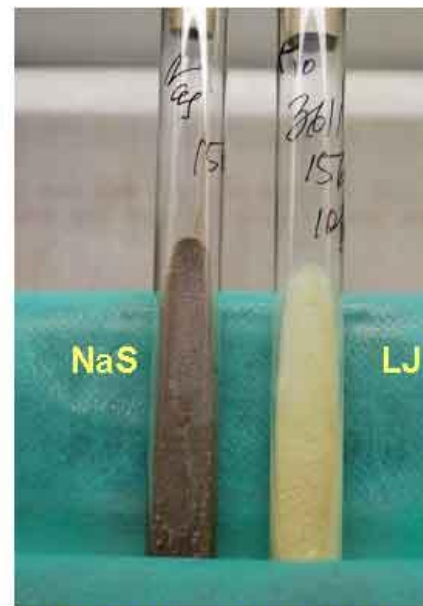
- Дифференциация МБТ от НТМБ (биохимические и рост на селективных средах)
  - способность продуцировать никотиновую кислоту (ниациновый тест);
  - наличие нитратредуктазы;
  - наличие термостабильной каталазы;
  - рост на среде с натрием салициловокислым;
  - рост на среде с пара-нитробензойной кислотой;
  - рост на среде с хлоридом натрия.
  
- Исключения: *M.simae*, *M.gastri*, *M.marinum*, *M.terrae*

# Колонии микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена



***M.tuberculosis M.fortuitum M.terrae***

**[визуально и тинкториально не различимы]**



***M.fortuitum/chelonae***

**[деградация среды с  
добавлением NaSalicylat]**

Попов СА НИИ фтизиопульмонологии  
Первый МГМУ ИМ Сеченова, Москва, 2011

1

# Систематическое положение микобактерий и проблемы идентификации МБТ

На 2008 г описано более 120 видов микобактерий, из них 7 относятся к комплексу видов *M.tuberculosis*

- Порядок *Actinomycetales*
- Семейство *Mycobacteriaceae*
- Род *Mycobacterium*

## Основные проблемы идентификации МБТ:

- Классические методы – длительность (30 дн.)
- Молекулярно генетические – трудозатратность (3-4 дн.)
- Иммунологические – низкая специфичность (<75-80%)

# Клинические аспекты идентификации

- Идентификация микобактерий туберкулеза (28 дней)

сдерживает передачу результатов ускоренных методов диагностики лекарственной устойчивости МБТ

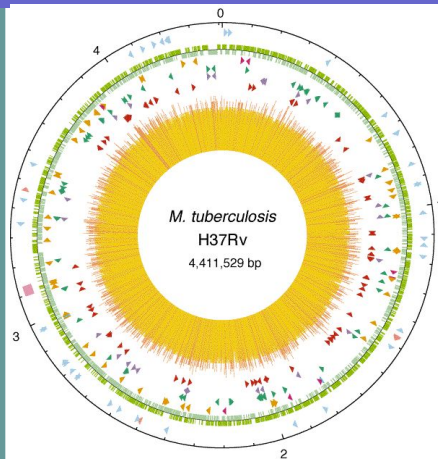
Бактек-960 общей  
производительностью  
8 тыс. иссл./год

Средняя длительность  
тестов на ЛЧ 7-9 дней





# Фундаментальные исследования МБТ



позволили выявить видоспеци-фичный белок

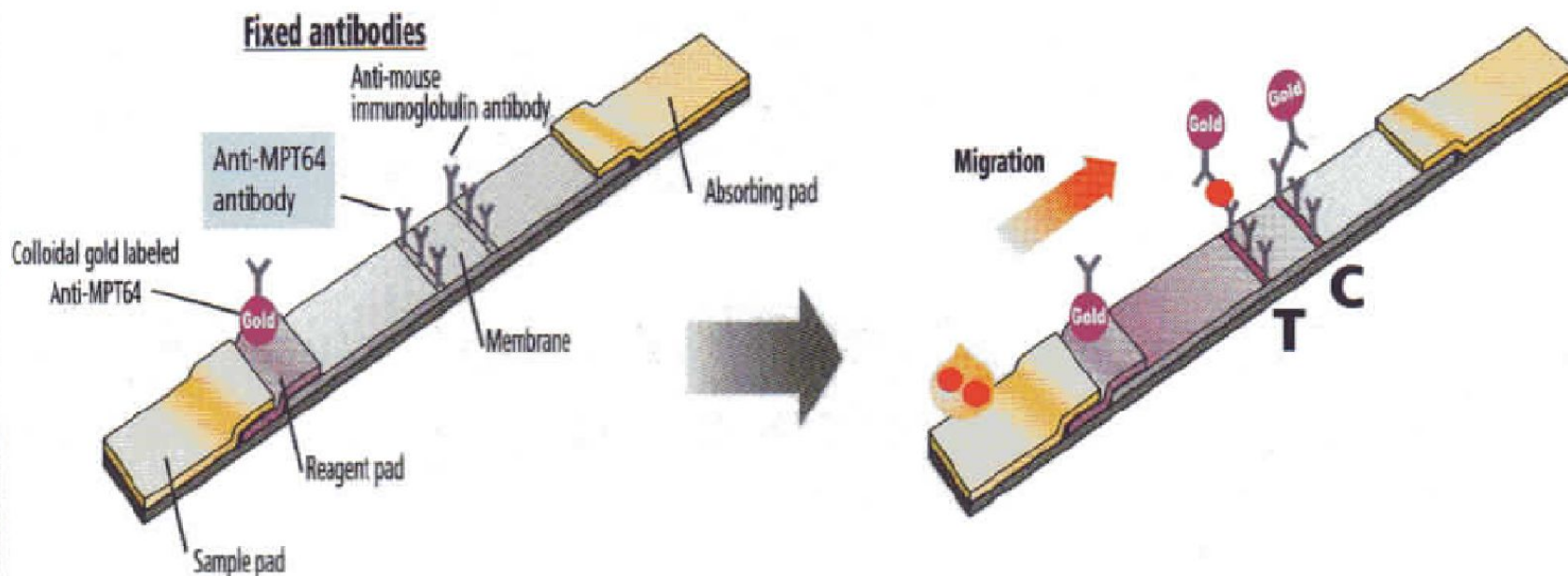
## AgMPT64

**Из 33 специфических белков, отличается тем, что секретируется во внешнюю среду, являясь индикатором роста *M.tuberculosis*.**

**Белок MPT64 - преобладающий белок, массой 24 kDa, обладает иммуногенным свойством.**

**Предложен как потенциальный кандидат состава вакцины, (распознается Т-лимфоцитами CD4+).**

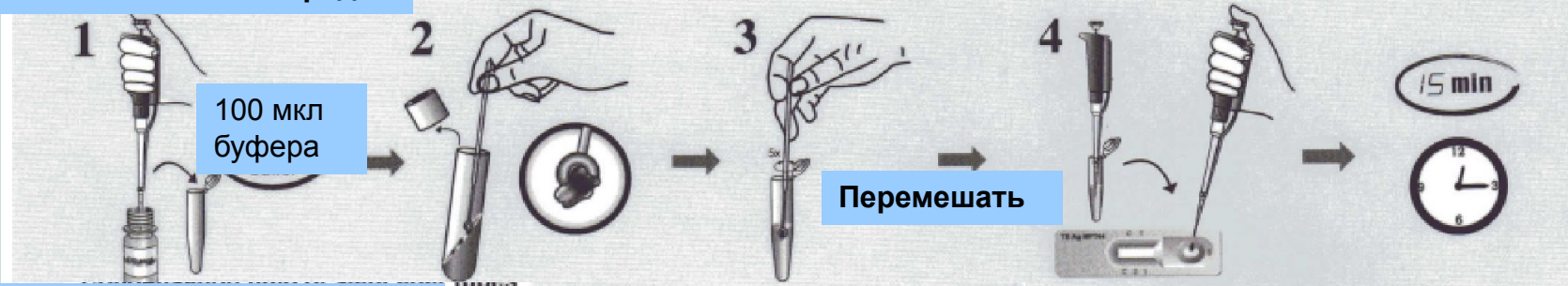
*Карта генома M.tuberculosis H37Rv, Nature, 1998*



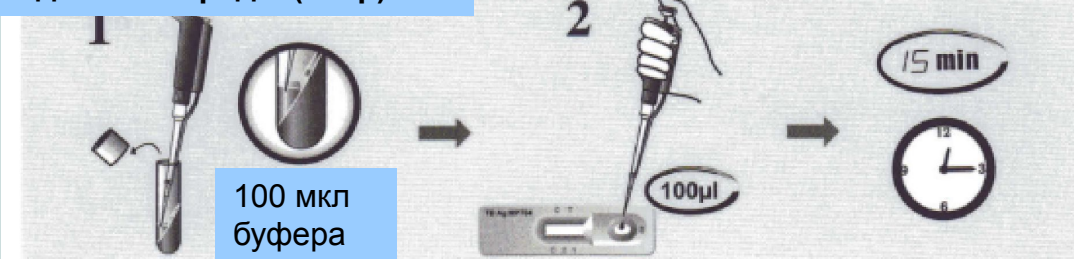
- Конъюгат: конъюгат коллоидного золота и мышиных моноклональных антител к MPT64 ( $0,24 \pm 0,048$  мкг);
- Тестовая полоса (Т): мышиные моноклональные антитела к MPT64 ( $0,32 \pm 0,064$  мкг)  
Контрольная полоса (С) : антитела козы к иммуноглобулинам G мыши ( $0,64 \pm 0,128$  мкг)

# Процедура проведения теста

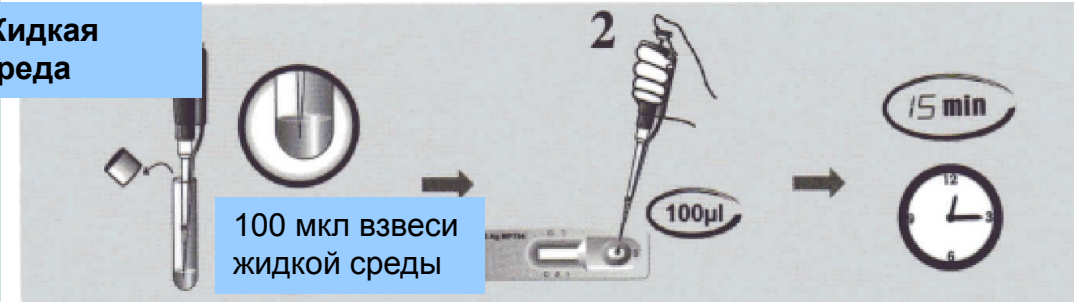
## Колония с плотной среды



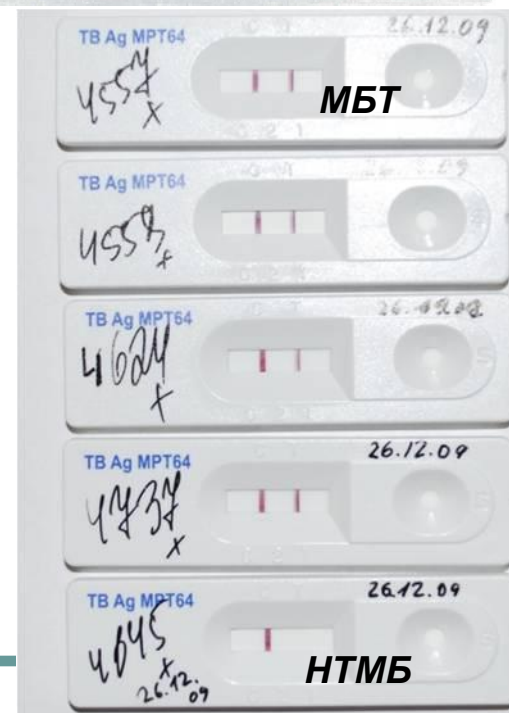
## Конденсат с среды (Агар)



## Жидкая среда



РЕЗУЛЬТАТ



# Список проверенных видов НТМБ

<i>M. abscessus</i>	<i>M. conceptionense</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. agri</i>	<i>M. concordense</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. senuense</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. confluentis</i>	<i>M. hackensackense</i>	<i>M. murale</i>	<i>M. seoulense</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. angelicum</i>	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. neworleansense</i>	<i>M. setense</i>
<i>M. arupense</i>	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. hodleri</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. doricum</i>	<i>M. holsaticum</i>	<i>M. novocastrense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. houstonense</i>	<i>M. palustre</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. avium subsp silvaticum</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. paraseoulense</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. bönickei</i>	<i>M. florentinum</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. flouranthenivorans</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. petroleophilum</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. brisbanense</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triplex</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. kubicae</i>	<i>M. phocaicum</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. canariasense</i>	<i>M. fürth</i>	<i>M. kumamotoense</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. lacus</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. tuberculosisH37RV</i>
<i>M. chimaera</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. manitobense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. ratisbonense</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. massiliense</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. gastris</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	

# Список проверенных видов микроорганизмов

## Бактерии

68 видов 137 штаммов

## Грибы

8 видов 15 штаммов

## Нетуберкулезные МБ

40 видов 57 штаммов

51 клин. культур

### Bacteria

*Acinetobacter baumannii* (4)  
*Aeromonas caviae* (2)  
*Aeromonas hydrophila* (3)  
*Aeromonas veronii* (2)  
*Aeromonas veronii* biovar *sobria* (1)  
*Alcaligenes faecalis* (2)  
*Alcaligenes xylosoxidans* (2)  
*Bacillus cereus* (2)  
*Bordetella bronchiseptica* (2)  
*Branhamella catarrhalis* (2)  
*Brevundimonas vesicularis* (2)  
*Chryseobacterium indologenes* (2)  
*Chryseobacterium meningosepticum* (2)  
*Citrobacter freundii* (4)  
*Comamonas acidovorans* (2)  
*Escherichia coli* (2)  
*Enterobacter aerogenes* (2)  
*Enterobacter agglomerans* (2)  
*Enterobacter cloacae* (2)  
*Enterobacter intermedius* (2)  
*Enterococcus avium* (2)  
*Enterococcus casseliflavus* (2)  
*Enterococcus faecalis* (2)  
*Enterococcus faecium* (2)  
*Enterococcus gallinarum* (2)  
*Enterococcus raffinosus* (2)  
*Flavimonas oryzihabitans* (2)  
*Flavobacterium indologenes* (2)

*Klebsiella ornithinolytica* (2)  
*Klebsiella oxytoca* (2)  
*Klebsiella ozaenae* (2)  
*Klebsiella pneumoniae* (2)  
*Kocuria rosea* (1)  
*Kocuria varians* (2)  
*Leclercia adecarboxylata* (2)  
*Morganella morganii* (2)  
*Myroides* spp. (2)  
*Neisseria gonorrhoeae* (2)  
*Ochrobactrum anthropi* (2)  
*Pichia anomala* (2)  
*Pichia ohmeri* (2)  
*Plesiomonas shigelloides* (2)  
*Proteus vulgaris* (2)  
*Providencia rettgeri* (3)  
*Providencia stuartii* (2)  
*Pseudomonas aeruginosa* (2)  
*Pseudomonas fluorescens* (2)  
*Ralstonia pickettii* (2)  
*Salmonella* group D (1)  
*Salmonella paratyphi* A (2)  
*Serratia marcescens* (2)  
*Shigella sonnei* (2)  
*Sphingobacterium spiritivorum* (2)  
*Sphingomonas paucimobilis* (2)  
*Staphylococcus aureus* (4)  
*Staphylococcus epidermidis* (2)  
*Staphylococcus haemolyticus* (2)  
*Staphylococcus saprophyticus* (2)  
*Staphylococcus*, coagulase negative (2)  
*Stenotrophomonas maltophilia* (2)  
*Streptococcus agalactiae* (2)  
*Streptococcus dysgalactiae* (2)  
*Streptococcus mitis* (2)  
*Streptococcus pneumoniae* (2)  
*Streptococcus pyogenes* (2)  
*Streptococcus viridans* group (2)

# Аналитическая чувствительность теста SD MPT64

**=  $1 \cdot 10^5$  КОЕ/мл, при снятии с плотной  
питательной среды ЛЙ**

штаммы МБТ и M.bovis в различных разведениях относительно Ст.мутн.№5  
( $5 \cdot 10^8$  микр. тел)

Результат реакции – интенсивность окраски в баллах от 1+ до 3+

Разведения		1,0	1:10	1:30
Результат теста		интенсивность окраски		
Штаммы МБ	H37Rv	3+	1+	0/1+
	BCG	3+	1+	0/1+

# Аналитическая чувствительность теста SD MPT64

**$5 \cdot 10^6$  микр. тел/мл, жидкая питательная среда MGIT,**

штаммы МБТ и BCG с разной длительностью культивирования после индикации роста в системе Бактек-960 в баллах окраски

Дополнительное культивирование в час.		0 $5 \cdot 10^5$ м. т./мл	24 $2 \cdot 10^6$ м. т./мл	48 $8 \cdot 10^6$ м. т./мл
Результат теста		Интенсивность реакции		
Штаммы МБ	H37Rv	1+	2+	3+
	BCG	1+	2+	3+

# Диагностическая чувствительность теста, чистая культура МБТ, плотные п/среды

M.tuberculosis,	музейные штаммы MDR / XDR		клинические изоляты		Всего
	Финн2	Л-Й	Финн2	Л-Й	
Питательные среды	Финн2	Л-Й	Финн2	Л-Й	
Положительные	12	12	78	68	170
Отриц.	0	0	0	0	0
Общее	12	12	78	68	170
Чувствительность	100%		100%		



# Диагностическая специфичность метода, чистые культур НТМБ, плотные п/среды

НТМБ	<sup>1</sup> музейные штаммы		<sup>2</sup> клинические изоляты		Всего
	Финн2	Л-Й	Финн2	Л-Й	
Питательные среды					
Положительные	0	0	0	0	0
Отриц.	8	8	15	16	47
Общее	8	8	15	16	47
Специфичность	100%		100%		

<sup>1,2</sup>*M. avium*, <sup>1,2</sup>*M. kansasii*, <sup>1</sup>*M. flei*, <sup>1</sup>*M. scrofulaceum*, <sup>1,2</sup>*M. fortuitum*, <sup>1</sup>*M. simae*, <sup>1,2</sup>*M. intracellulareae*,

# Диагностическая чувствительность метода, культуры МБТ, среда MGIT Бактек-960

Штаммы / изоляты микроорганизмов	музейные, MDR / XDR	Клинические		Всего
	чистые культуры	чистые культуры	контаминированные	
Положительные	12	72	26	98
Отриц.	0	1*	2*	0
Общее	12	73	27	100
Чувствительность	100%	98,5%	93%	

\* Недостаточное время дополнительного культивирования

# Диагностическая специфичность метода, культуры НТМБ, среда MGIT Бактек-960

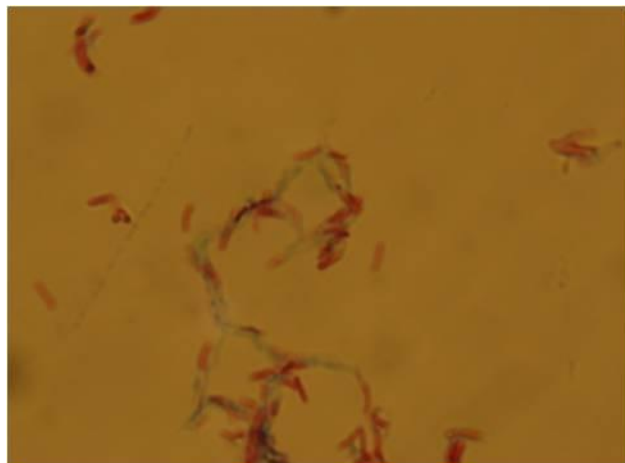
Штаммы микроорганизмов	<sup>1</sup> НТМБ, музейные	<sup>2</sup> НТМБ, клинич.	Бактериальные	Грибко-вые	Всего
Положительные	0	0	0	0	0
Отриц.	8	8	16	8	40
Общее	8	8	16	8	40
Специфичность	100%	100%	100%	100%	

<sup>1,2</sup>*M. avium*, <sup>1,2</sup>*M. kansasii*, <sup>1</sup>*M. flei*, <sup>1</sup>*M. scrofulaceum*, <sup>1,2</sup>*M. fortuitum*, <sup>1</sup>*M. simae*, <sup>1,2</sup>*M. intracellulae*,

# Диагностика МБТ в различных материалах

Материал	Экссудаты (3+)	БАЛ (3+)	Поздние проросты ЛЙ (1+ / 2+)	Всего
Положительные	2	2	5	9
Отриц.	1	0	1	2
Общее	3	2	6	11
Чувствительность				

# Экспресс-идентификация культур МБТ: микроиммунохроматография vs PNB/NaS/ПЦР



МБ - ?, ZN $\times$ 1000, жидкая питательная среда

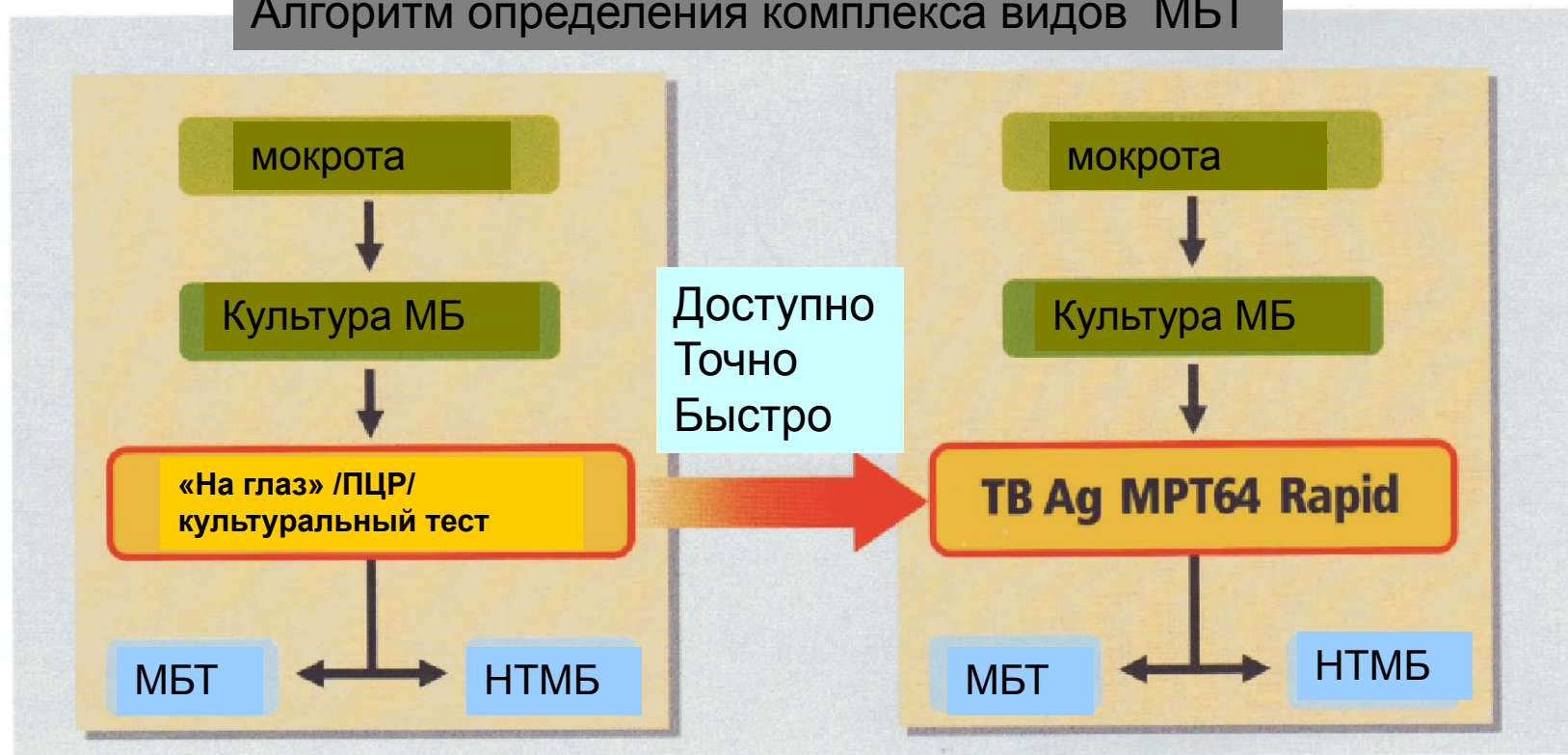


Косы МБТ, ZN $\times$ 400

	Чув. Аналит.	Чувствит.	Специф.
Культура МБТ	10*7 м.т.	98,5-100	100
МБТ + контаминант	10*7 м.т.	93	100
Длит.	15 мин		

# Рекомендации по дифференциации видов МБТ/НТМБ

## Алгоритм определения комплекса видов МБТ



# Что это дает...?

- **Снижение лабораторной нагрузки:**  
Времязатраты на каждый тест снижается с 40 мин. лаб. времени до 3-5 мин.
- **Сокращение длительности идентификации с 28 дней до 10 (!) мин.**
- **Реализация преимуществ ускоренных автоматизированных методов (Бактек-технологии)**

Спасибо за внимание!

Попов Сергей Александрович 495-681-02-33

Popov\_s55@mail.ru