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

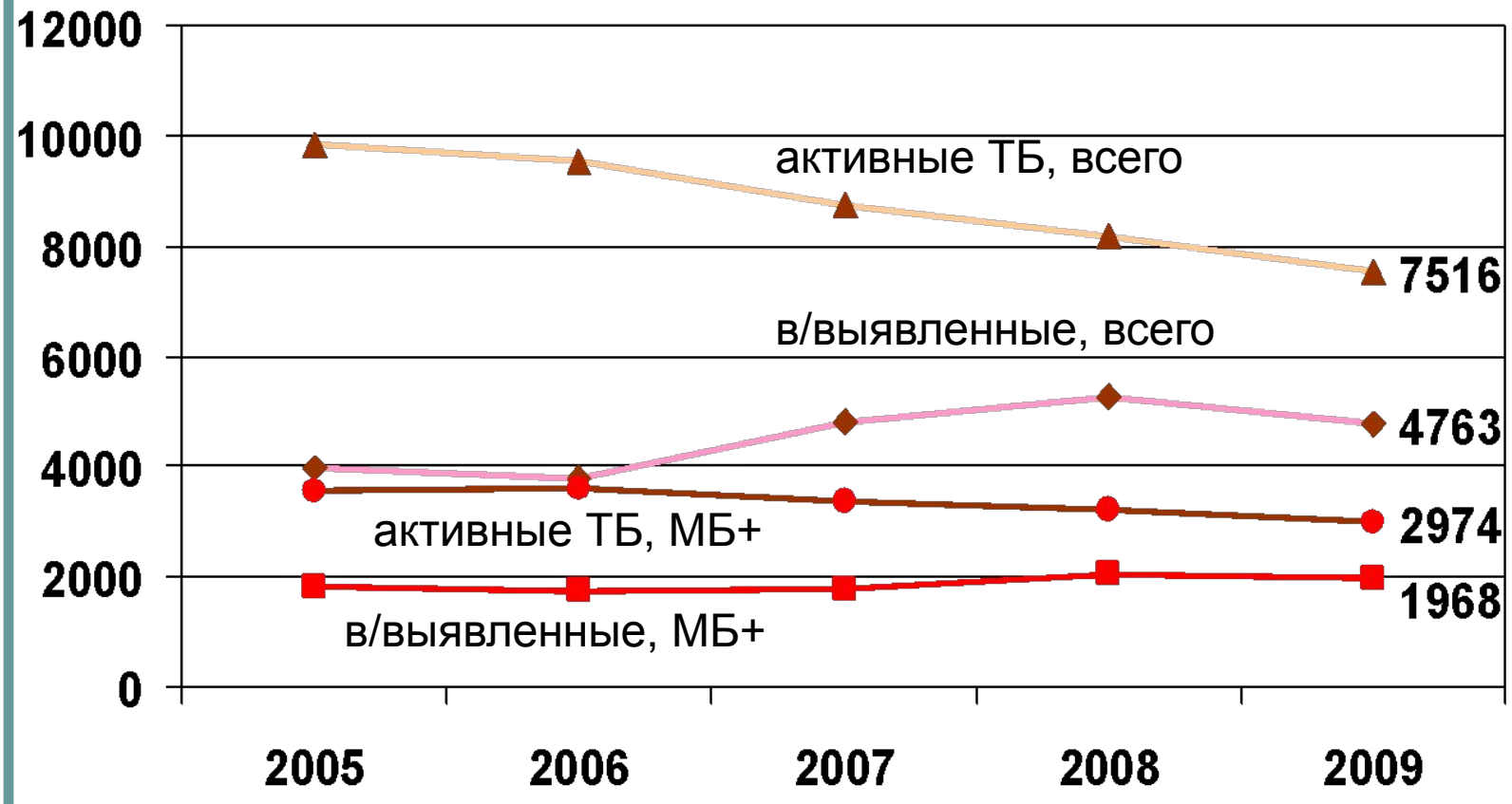
С.А. Попов

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

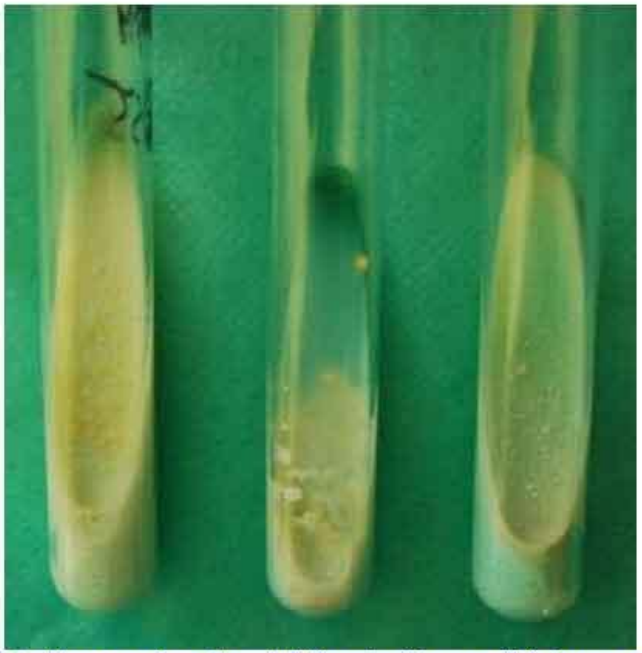
- Первичная идентификация (культуральные характеристики)
  - длительность роста на средах;
  - пигментообразование;
  - морфология колоний;
  - наличие кислотоустойчивой окраски;
  - температура роста.

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.

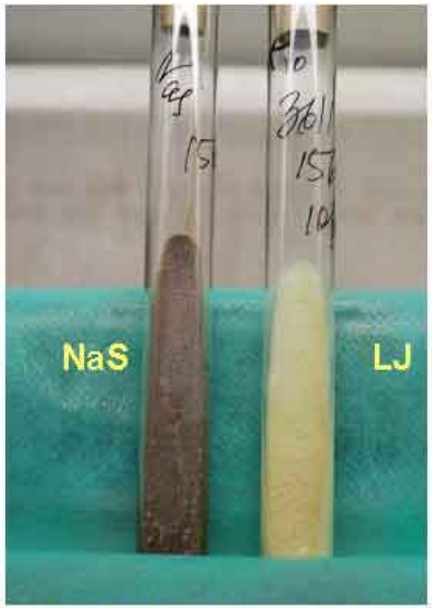
    - Исключения: *M.simae, M.gastri, M.marinum, M.terrae*

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

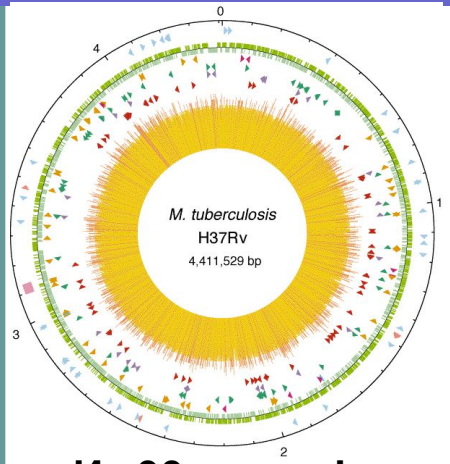
- Идентификация микобактерий туберкулеза (28 дней)

  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

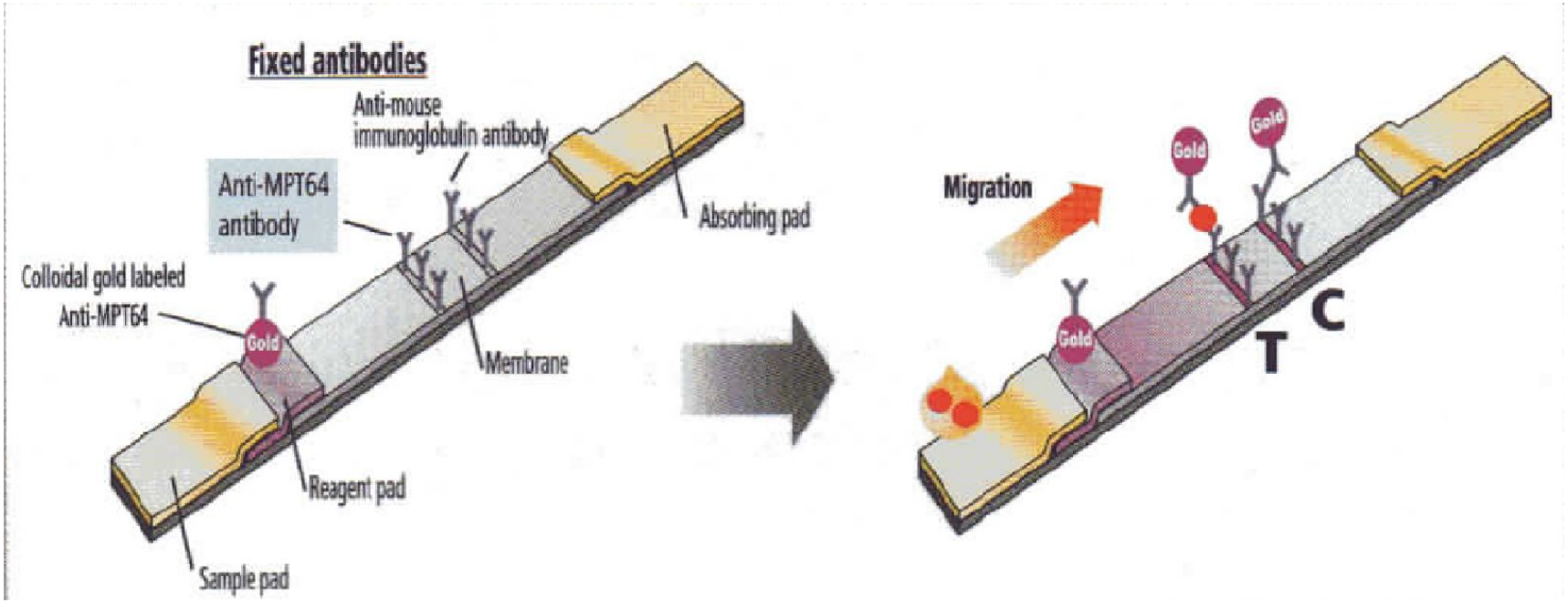
Из 33 специфических белков, отличается тем, что секретируется во внешнюю среду, являясь индикатором роста *M.tuberculosis.*

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

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

Карта генома M.tuberculosis H37Rv, Nature, 1998

Микро-ммунохроматографический тест



- Конъюгат: конъюгат коллоидного золота и мышиных моноклональных антител к МРТ64 (0,24±0,048 мкг);
- Тестовая полоса (Т): мышиные моноклональные антитела к МРТ64 (0,32 ±0,064 мкг)
  Контрольная полоса (С) : антитела козы к иммуноглобулинам G мыши (0,64 ±0,128 мкг)

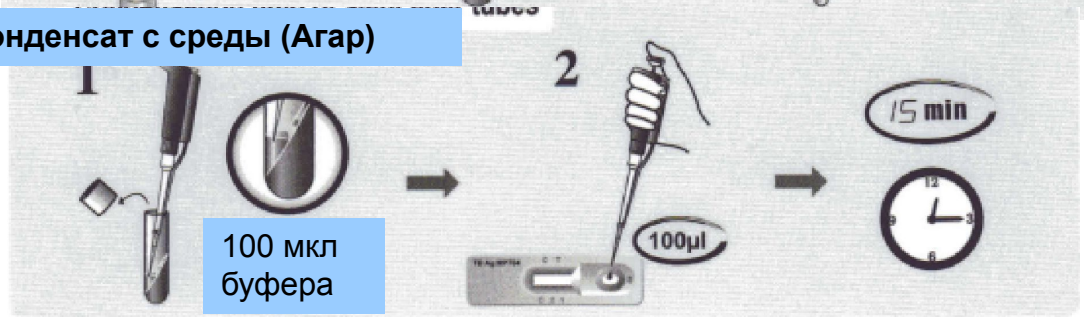
Процедура проведения теста

Колония с плотной среды

100 мкл буфера

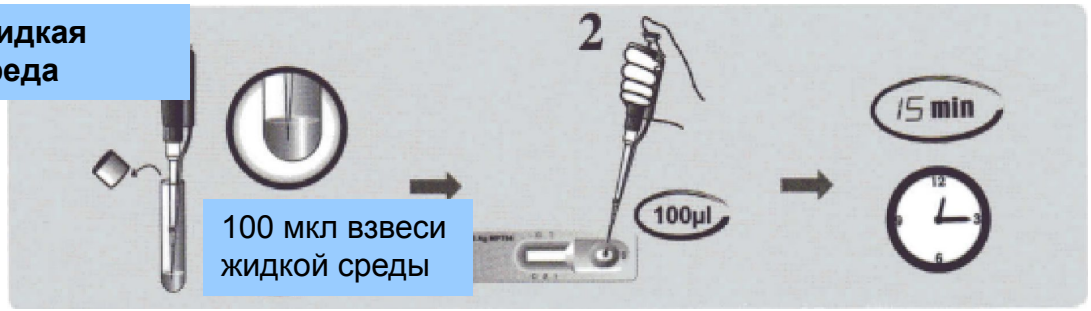
Перемешать

Конденсат с среды (Агар)



100 мкл буфера

Жидкая среда



100 мкл взвеси жидкой среды

Р Е З У Л Ь Т А Т

Список проверенных видов НТМБ

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

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 raffinosis (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

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

штаммы МБТ и M.bovis в различных разведениях относительно Ст.мутн.№5 ($5*10^8$ 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

$5*10^6$ 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 **$5*10^5$ м. т./мл**	24 **$2*10^6$ м. т./мл**	48 **$8*10^6$ 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		
Пительные среды	Финн2	Л-Й	Финн2	Л-Й	Всего
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	[1]музейные штаммы		[2]клинические изоляты		Всего
Пительные среды	Финн2	Л-Й	Финн2	Л-Й	
Положительные	0	0	0	0	0
Отриц.	8	8	15	16	47
Общее	8	8	15	16	47
Специфичность	100%		100%		

[1,2]*M.avium*, [1,2]*M.kansasii*, [1]*M.flei*, [1]*M.scrofulaceum*, [1,2]*M.fortuitum*, [1]*M.simae*, [1,2]*M.intracellularae*,

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

Штаммы / изоляты микроорганизмов	музейные, MDR / XDR	Клинические		Всего
	чистые культуры	чистые культуры	контаминиро-ванные	
Положитель-ные	12	72	26	98
Отриц.	0	1*	2*	0
Общее	12	73	27	100
Чувствитель-ность	100%	98,5%	93%	

* Недостаточное время дополнительного культивирования

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

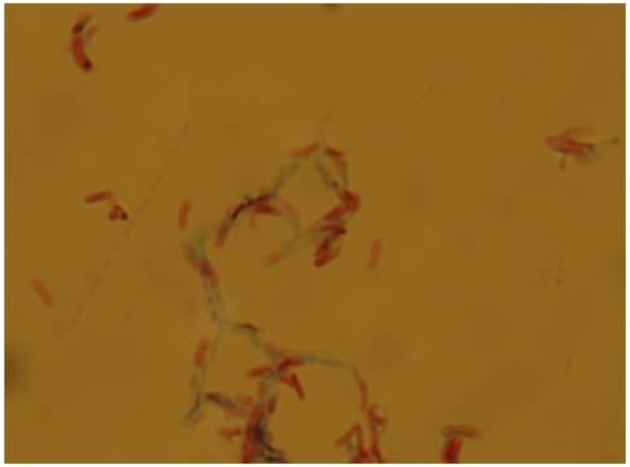
Штаммы микроорганизмов	[1]НТМБ, музейные	[2]НТМБ, клинич.	Бактери-альные	Грибко-вые	Всего
Положительные	0	0	0	0	0
Отриц.	8	8	16	8	40
Общее	8	8	16	8	40
Специфичность	100%	100%	100%	100%	

[1,2]*M.avium*, [1,2]*M.kansasii*, [1]*M.flei*, [1]*M.scrofulaceum*, [1,2]*M.fortuitum*, [1]*M.simae*, [1,2]*M.intracellularae*,

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

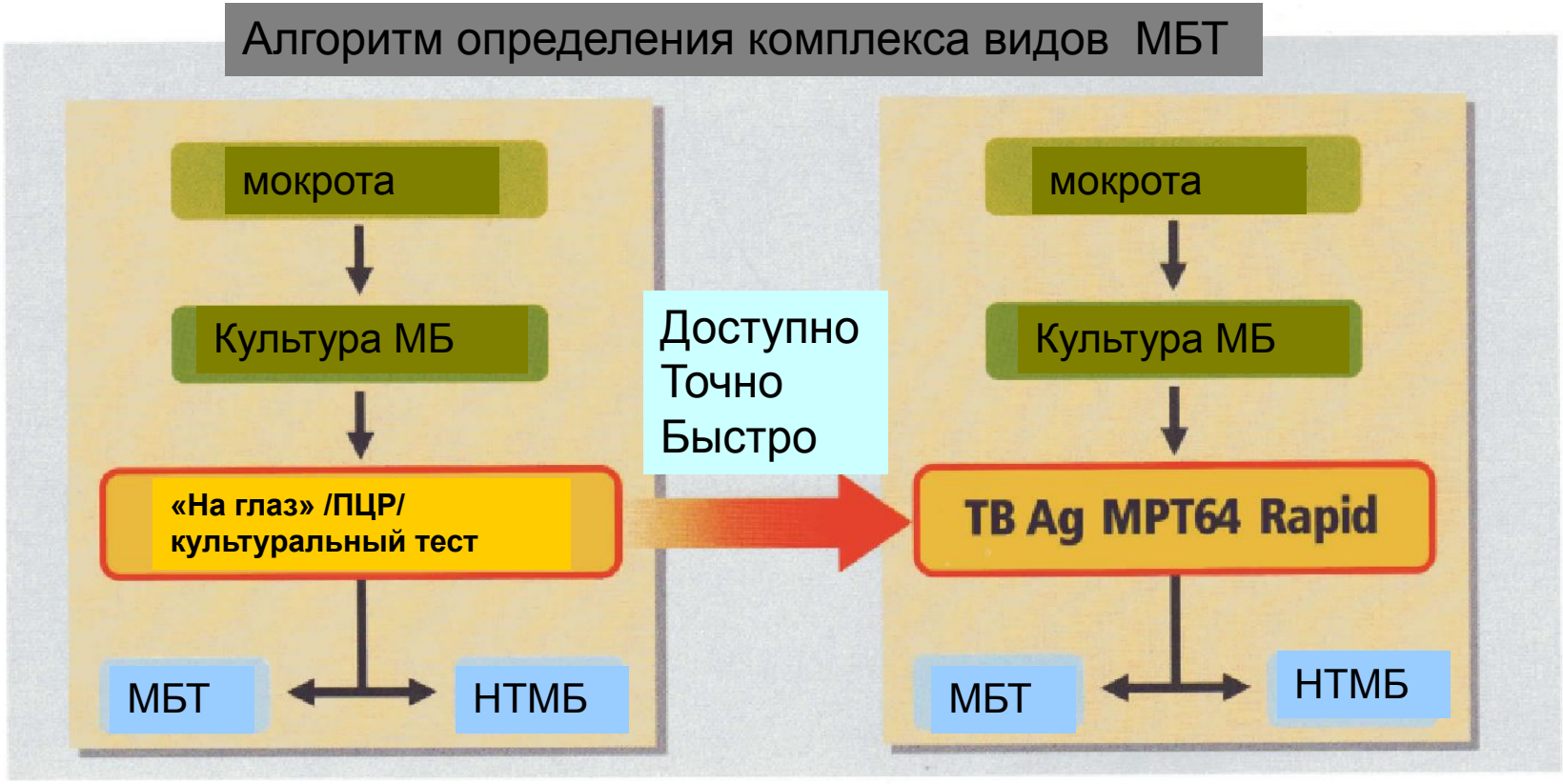


МБ - ?, ZNx1000, жидкая питательная среда

Косы МБТ, ZNx400

	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



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