

Экспресс тесты для выявления ТБ и ЛУ ТБ. Диагностические алгоритмы. Модуль 3.

Др. Гиртс Шкендерс

Врач лаборатории Рижской Восточной клинической университетской
больницы

ВОЗ Центр сотрудничества по обучению и исследованию МЛУ-ТБ,

Чтобы определить и предоставить пациентам наиболее эффективную схему лечения, клиническая туберкулезная лаборатория должна быстро, но надежно ответить на 2 основных вопроса:

1. Выявляется ли *M. tuberculosis* в образце пациента? и
2. Если да, является ли обнаруженный штамм лекарственным средством чувствительным или проявляет ли он какую-либо форму лекарственной устойчивости?

СОДЕРЖАНИЕ

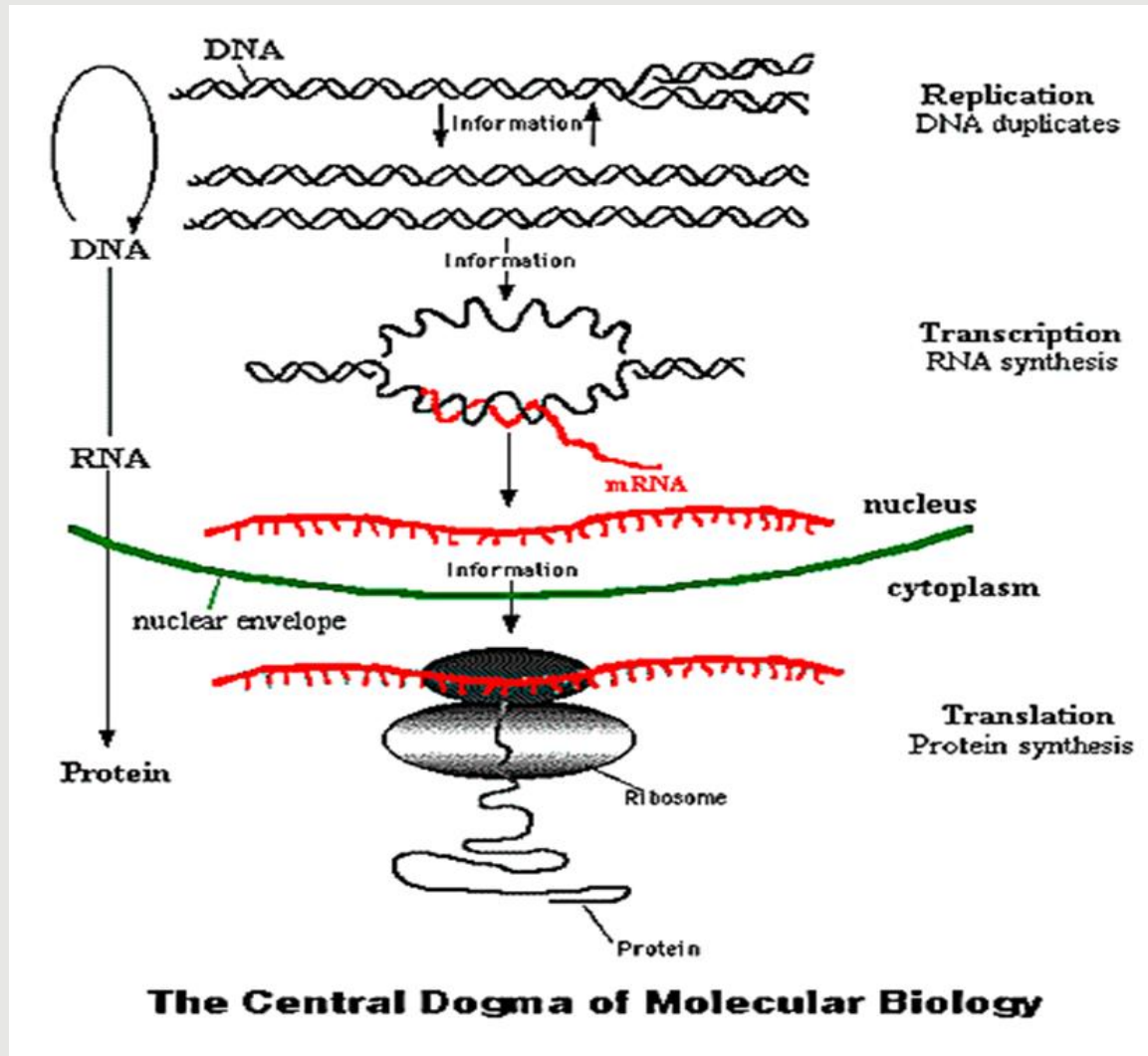
- Основы молекулярной биологии
- Молекулярно-биологические тесты для диагностики туберкулеза
- Рекомендации по применению при диагностике туберкулеза
- Рекомендации по применению при диагностике резистентного туберкулеза

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

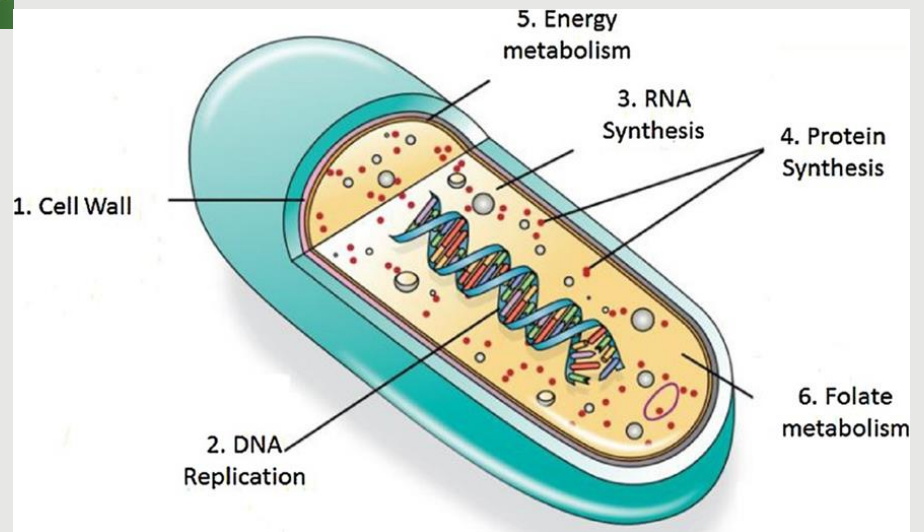
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Молекулярная биология — комплекс биологических наук, изучающих механизмы хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции нерегулярных биополимеров: нуклеиновых кислот и белков.

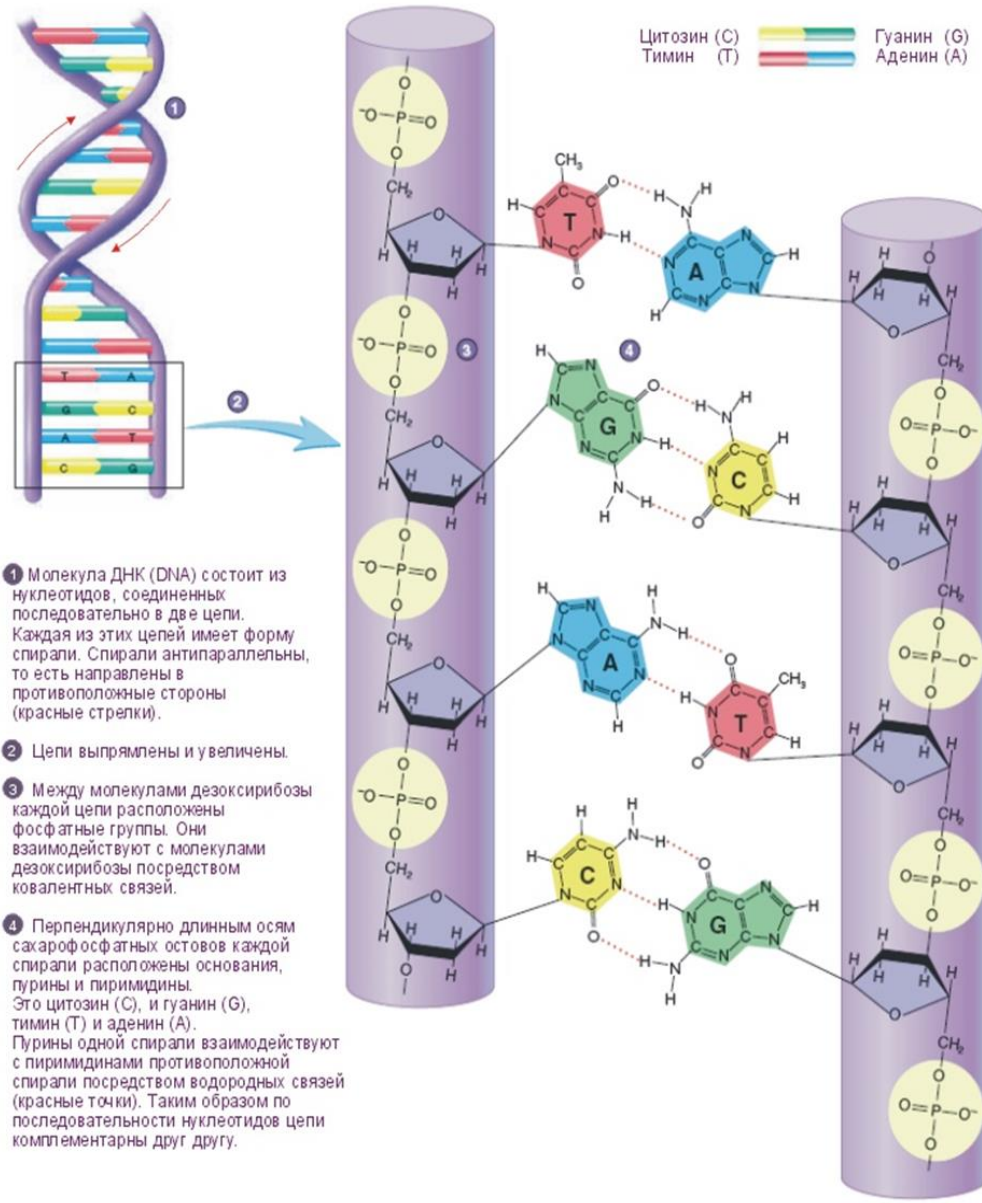
ЦЕНТРАЛЬНАЯ ДОГМА МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ



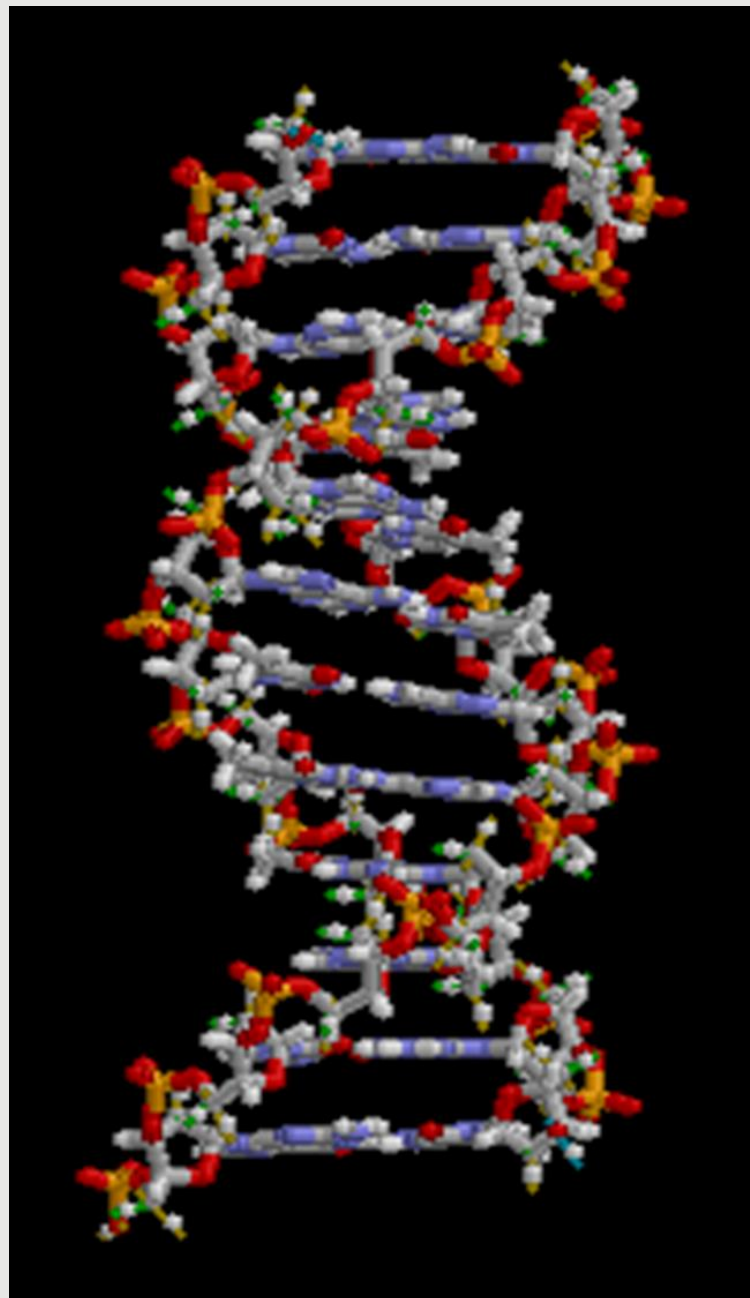
M.tuberculosis



ДНК

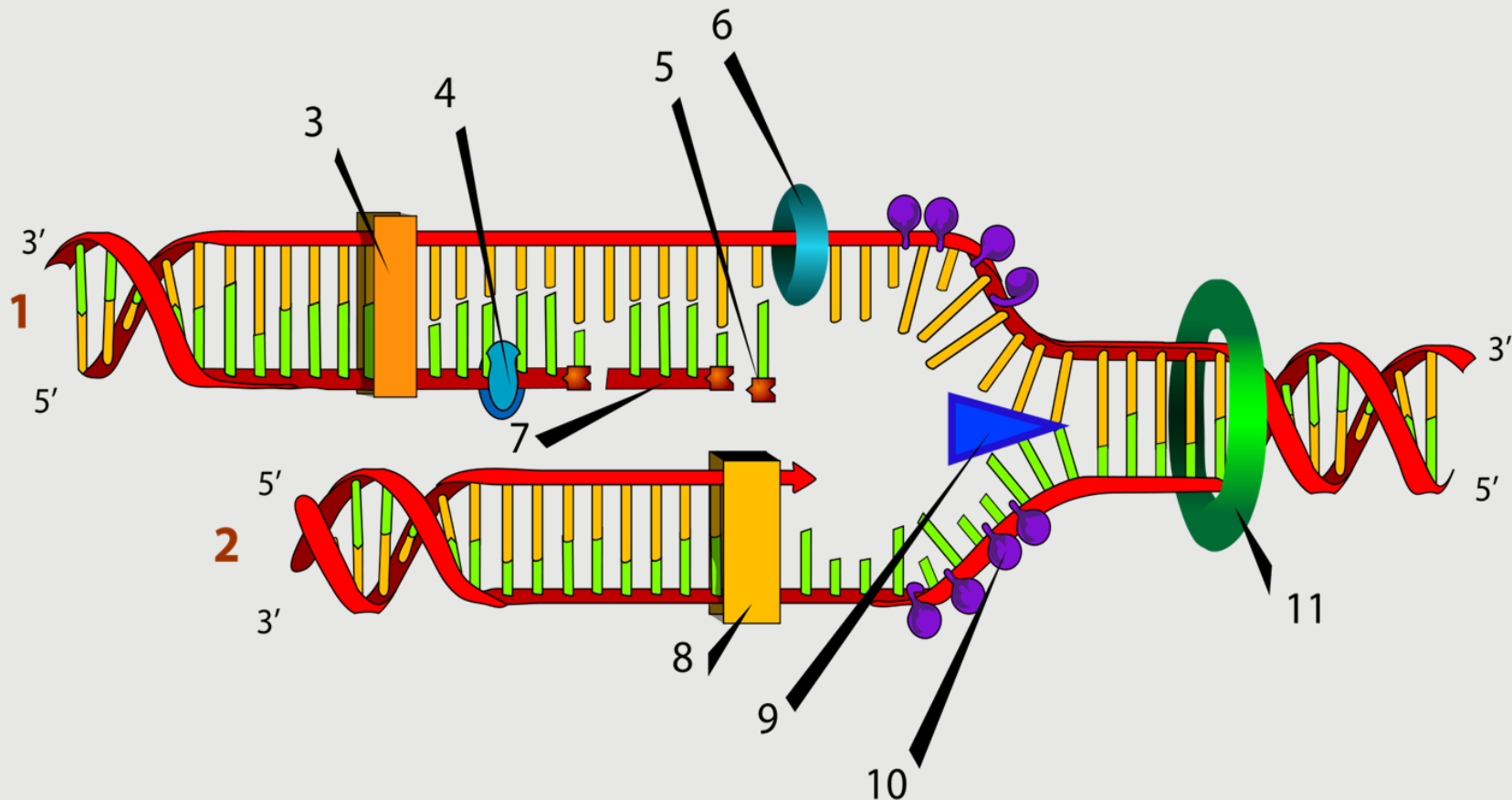


ДНК



РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

- **Репликация ДНК** — процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки.
- Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение. Репликацию ДНК осуществляет сложный ферментный комплекс, состоящий из 15—20 различных белков, называемый реплисомой (англ. replisome)



Схематическое изображение процесса репликации, цифрами отмечены:
 (1) запаздывающая нить, (2) лидирующая нить, (3) ДНК-полимераза ($\text{Pol}\alpha$), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) праймаза, (7) фрагмент Оказаки, (8) ДНК-полимераза ($\text{Pol}\delta$), (9) хеликаза, (10) одиночная нить со связанными белками, (11) топоизомераза

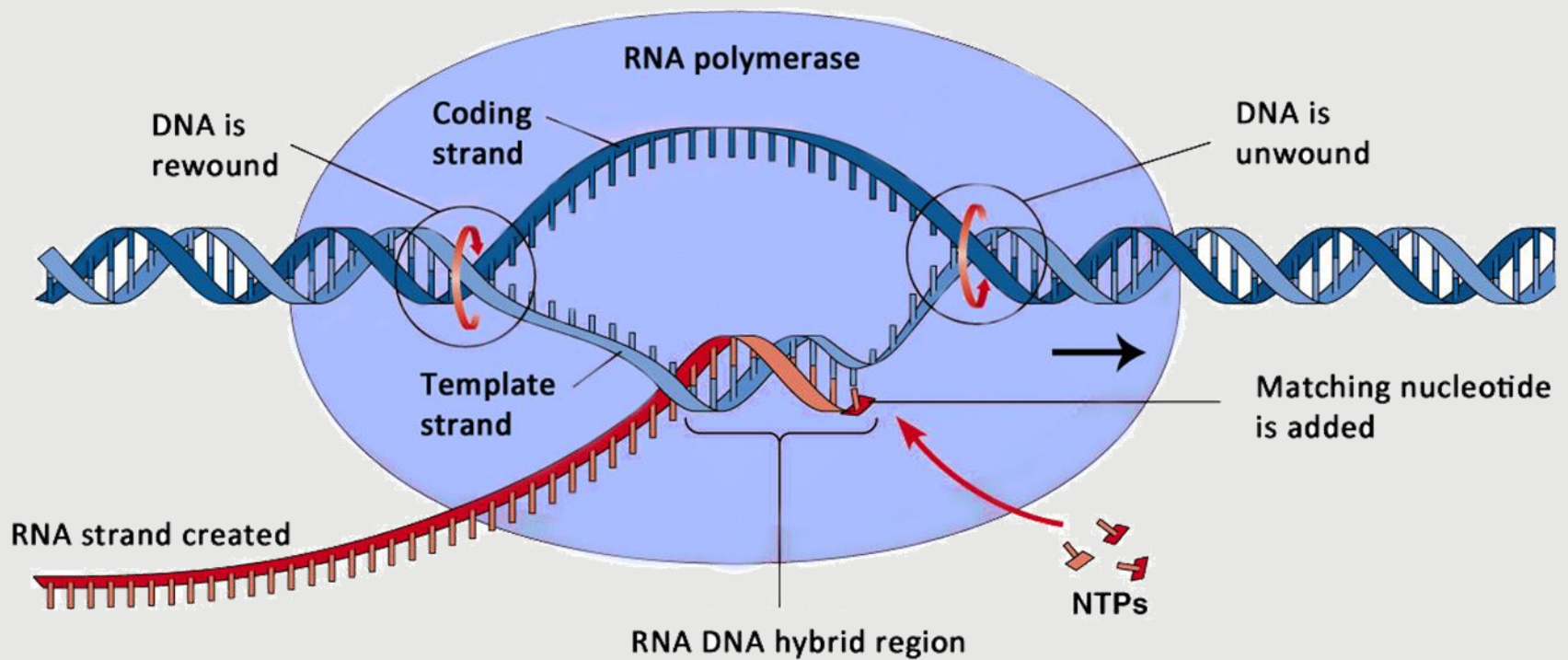
ТРАНСКРИПЦИЯ

Транскрипция (от лат. transcriptio — переписывание) — процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках.

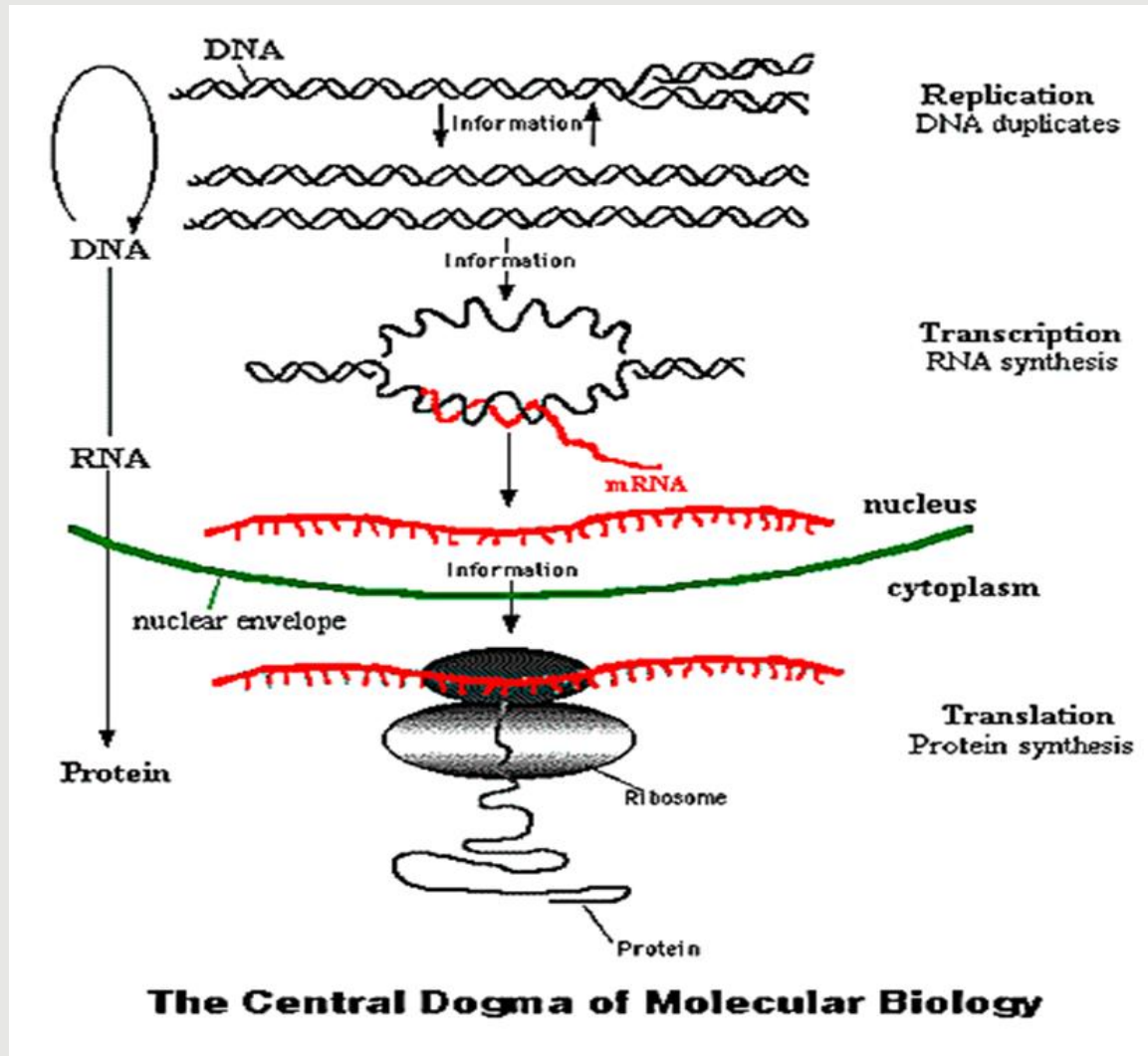
Другими словами, это **перенос генетической информации с ДНК на РНК.**

Транскрипция катализируется ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК РНК-полимераза движется в направлении 3'->5'

ТРАНСКРИПЦИЯ



ЦЕНТРАЛЬНАЯ ДОГМА МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ



ГЕН

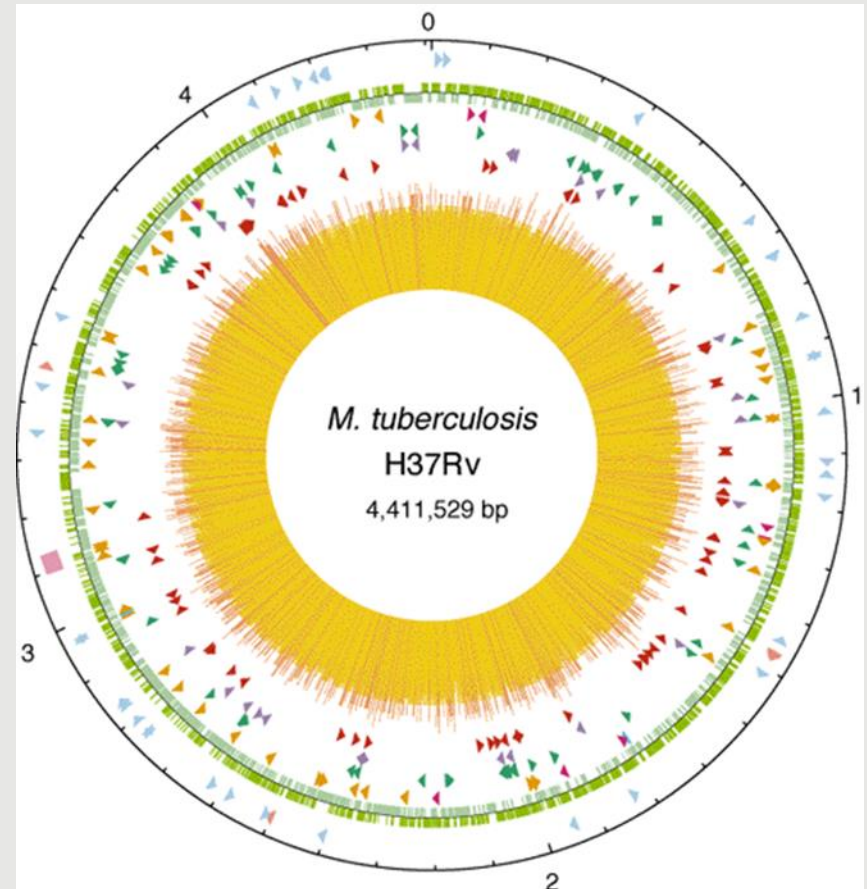
- Ген (др.-греч. γένος — род) — структурная и **функциональная единица** наследственности живых организмов. Ген представляет собой **участок ДНК, задающий последовательность определённого полипептида либо функциональной РНК.**
- Гены определяют наследственные признаки организмов, передающиеся от родителей потомству при размножении. При этом некоторые органеллы (митохондрии, пластиды) имеют собственную, определяющую их признаки, ДНК, не входящую в геном организма.

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

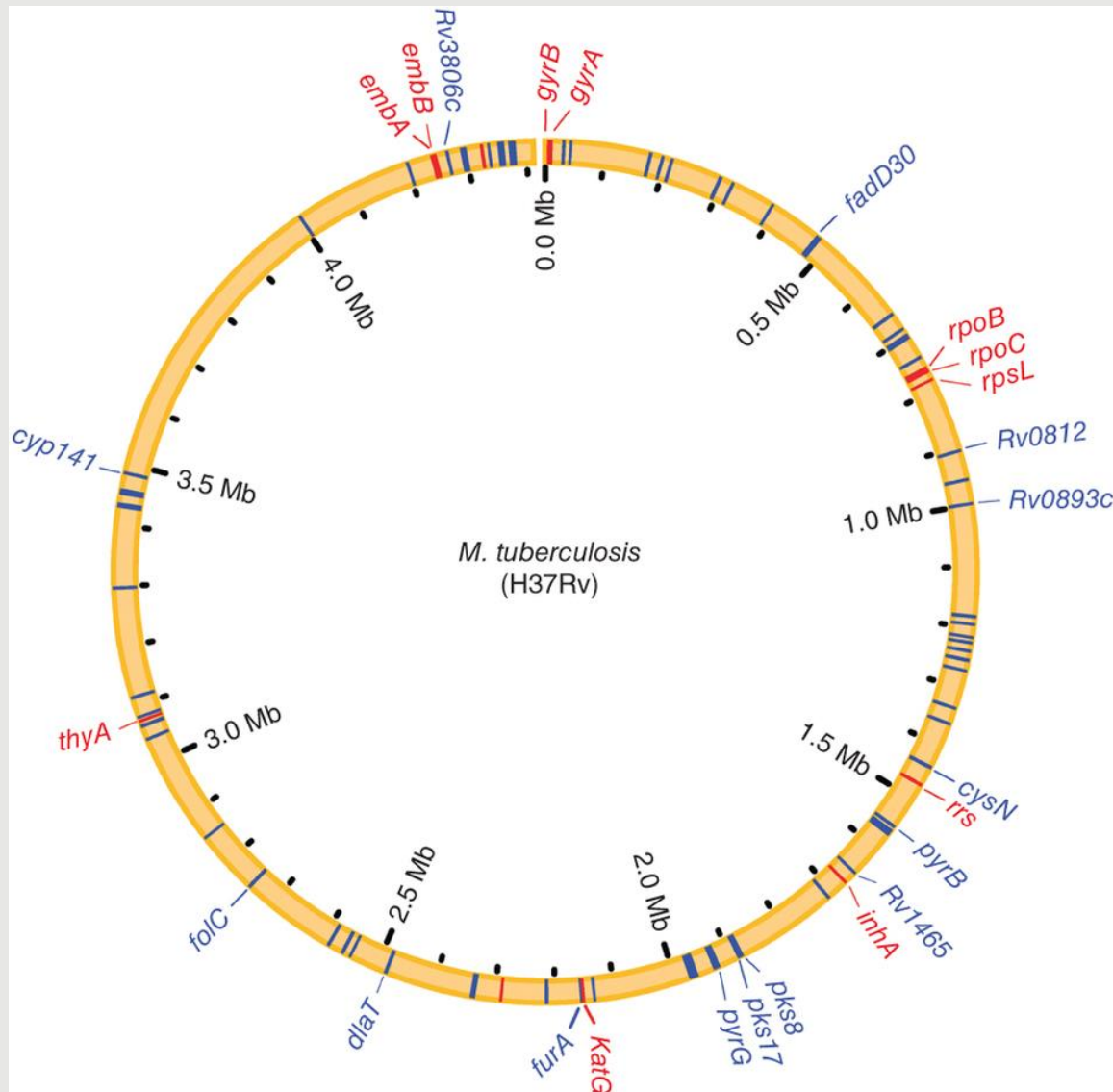
- Одним из наиболее используемых методов NATT в настоящее время является ПЦР.
- ПЦР — метод прямого определения специфического участка последовательности ДНК.
- Процесс ПЦР включает идентификацию специфической последовательности родительской ДНК для амплификации (копирования) с помощью двух коротких праймеров (участков ДНК), которые комплиментарны концевым участкам этой последовательности.
- Далее происходит удлинение последовательности ДНК за счет имеющихся в реакционной смеси в избытке дезоксинуклеозидтрифосфатов, катализируемое Taq полимеразой.
- В результате этого процесса образуются так называемые ампликоны — копии обнаруживаемой последовательности ДНК.

ГЕНОМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

В 1998 г. завершена расшифровка генома микобактерий туберкулеза. Геном кольцевой хромосомы *M. tuberculosis* H37Rv (стандартный штамм) имеет размер 4,4 мегабазы и содержит примерно 4000 последовательностей, кодирующих белки. С помощью баз данных установлены функции около 70% генов. Внимание исследователей сейчас сосредоточено на остальных 30% генов микобактерий, не имеющих аналогов в других бактериях.



ГЕНОМ M.TUBERCULOSIS



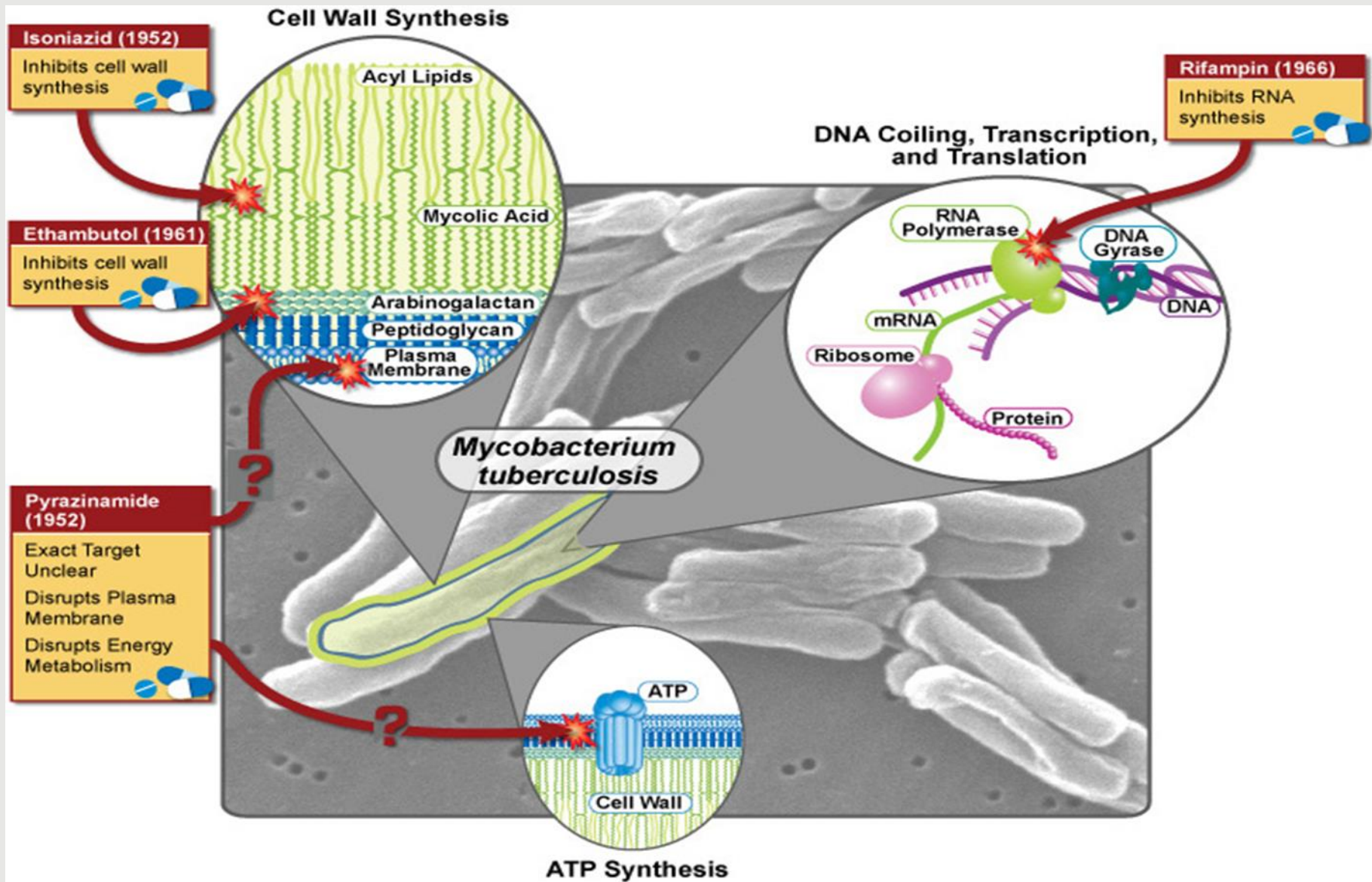


Illustration from National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Illustrator Krista Townsend

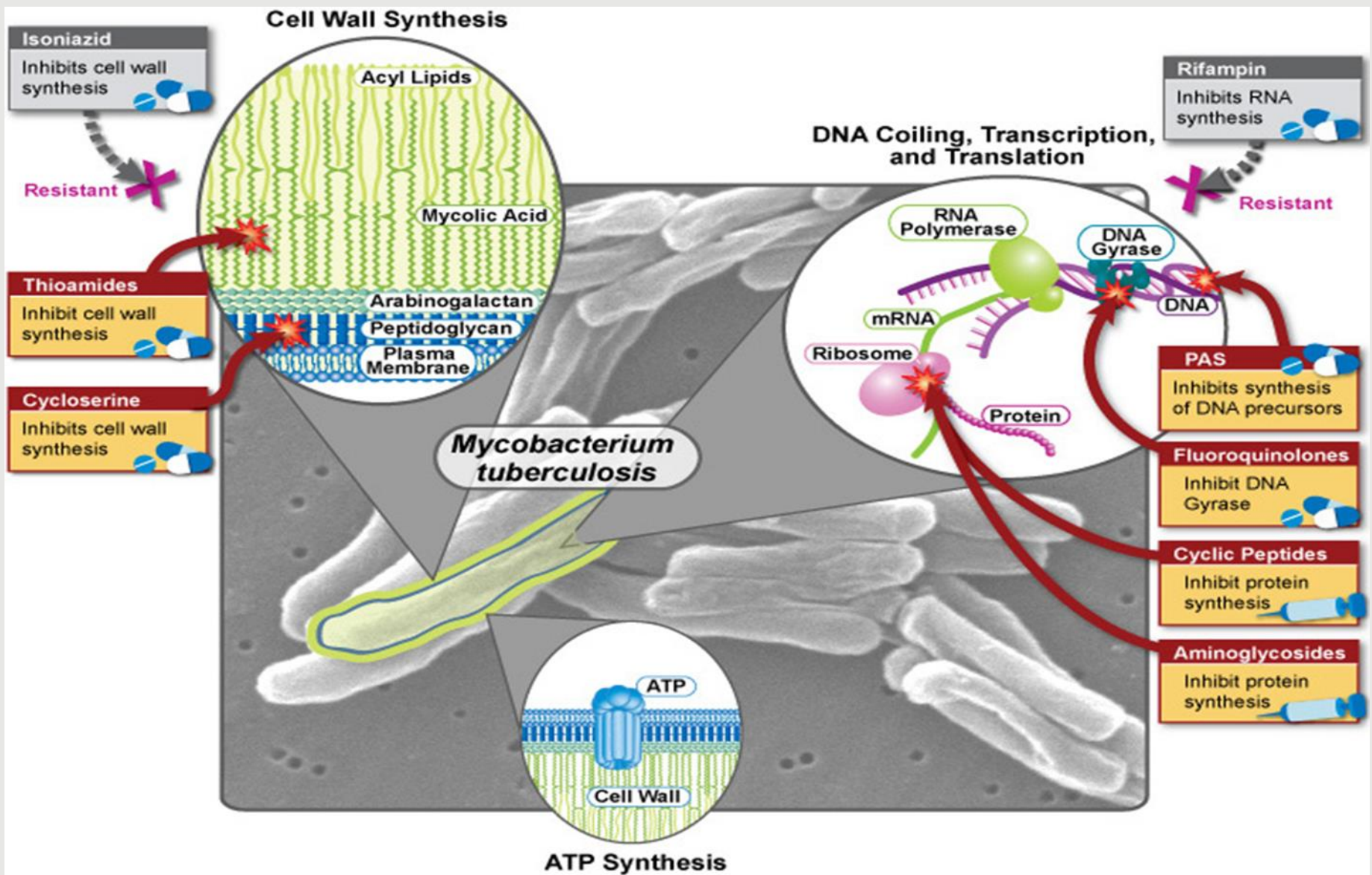


Illustration from National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Illustrator Krista Townsend

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

МОДУЛЬ 3
РАННЯЯ
ДИАГНОСТИКА ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ТБ

WHO
consolidated
guidelines on
tuberculosis

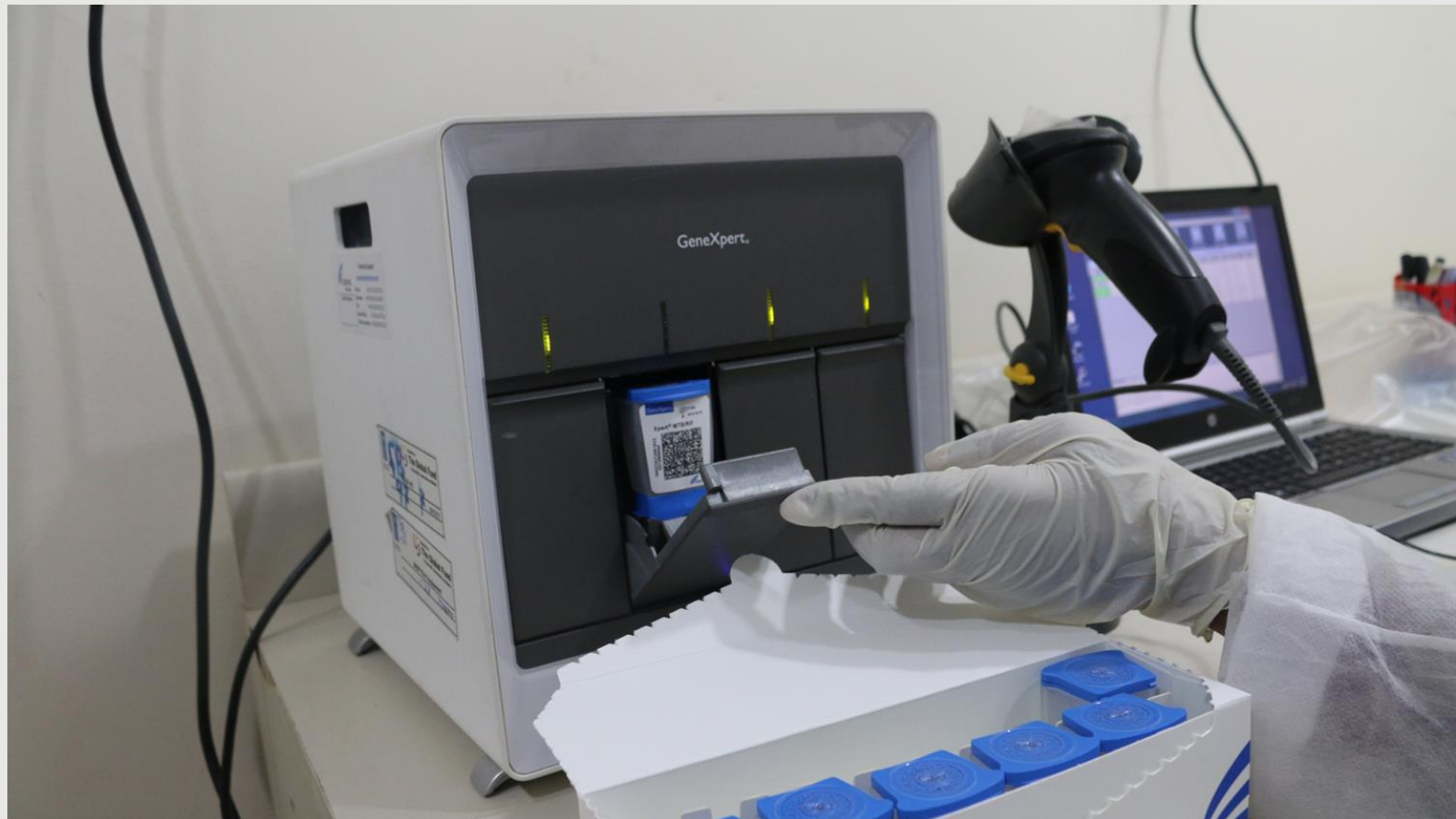
Module 3: Diagnosis

Rapid diagnostics for
tuberculosis detection

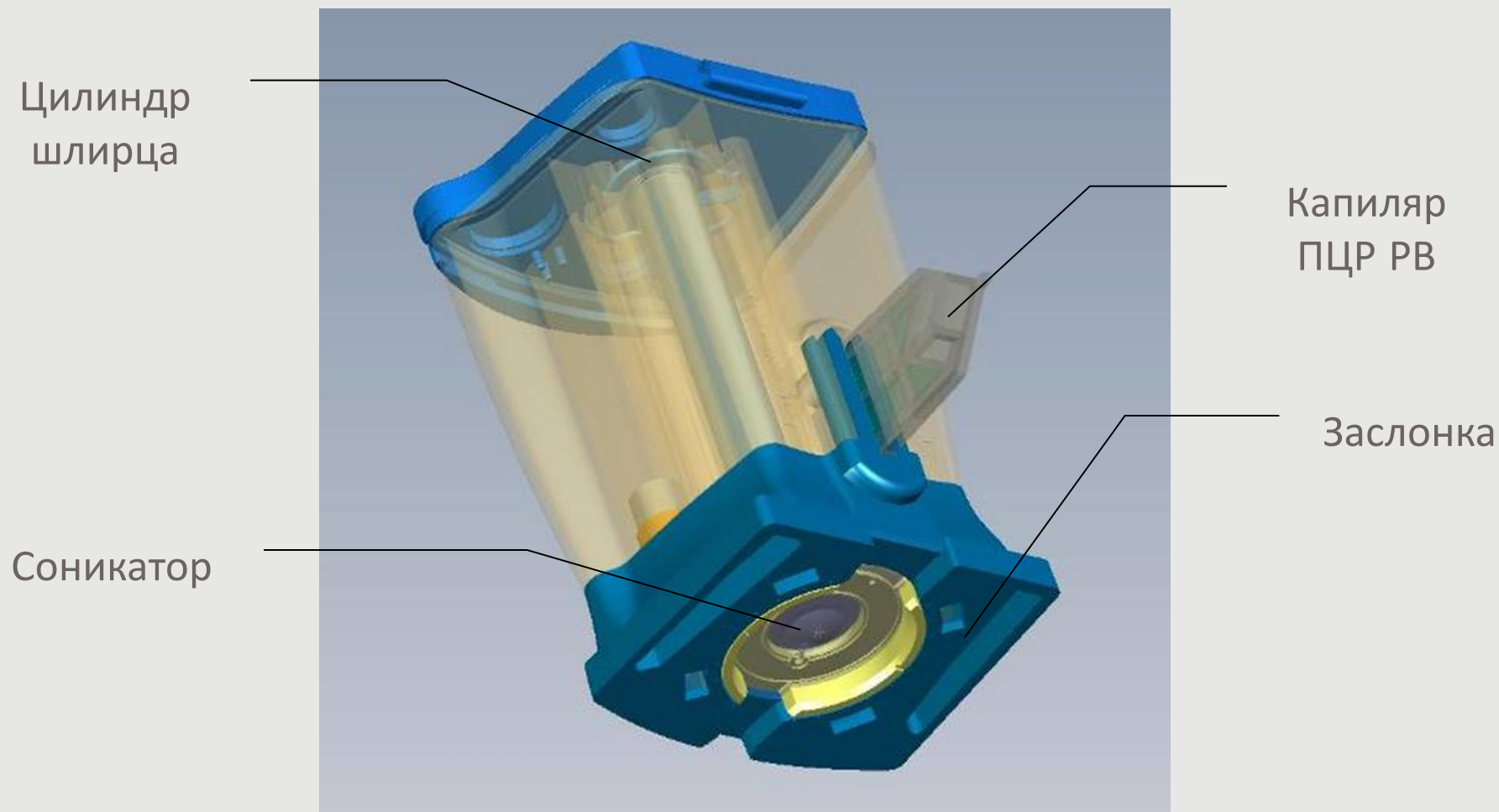
2021 update



СИСТЕМА GeneXpert (Cepheid Inc.)



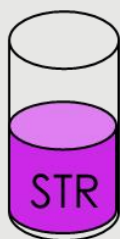
СИСТЕМА GeneXpert (Cepheid Inc.)



Хpert MTB/Rif Ultra ПРОТОКОЛ

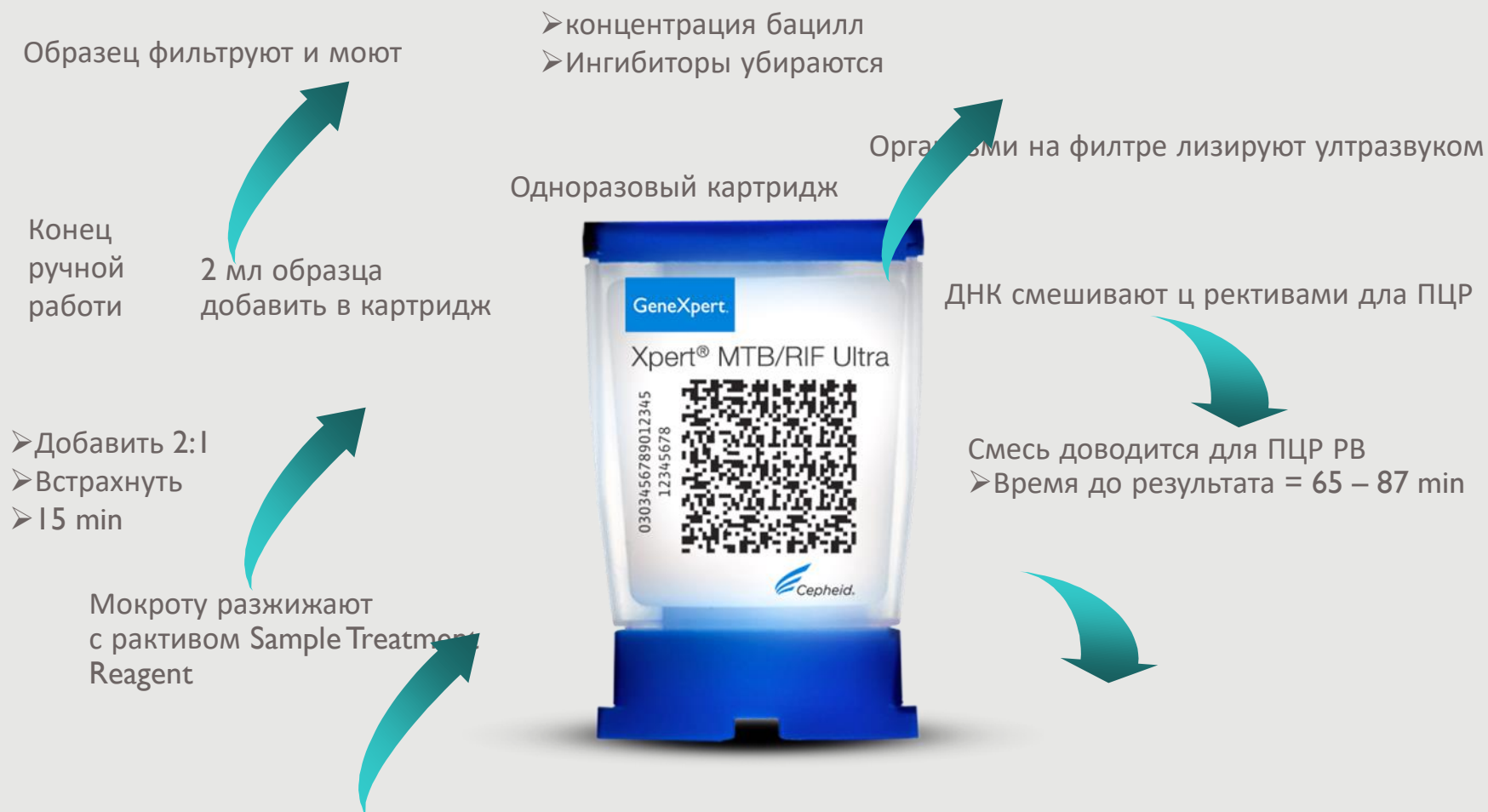
2 мин работа руками

15 мин инкубация

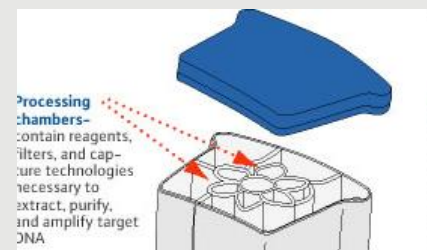


Время до результата = 65 до 87 мин

Xpert MTB/Rif Ultra TEST



Xpert MTB/Rif Ultra TECT

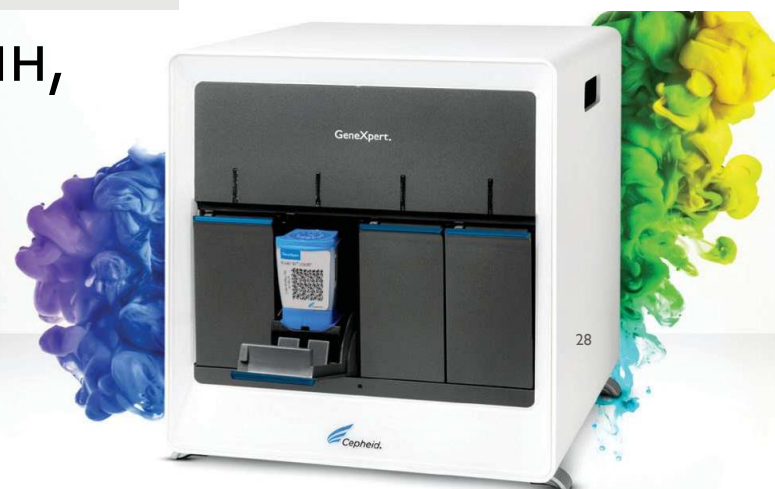


	MTB/RIF	MTB/RIF Ultra
Diagnosis	MTB complex	MTB complex
Resistance	Detects rifampicin resistance as a surrogate for MDR-TB	Detects rifampicin resistance as a surrogate for MDR-TB
Amplification for TB detection	Single target: rpoB core region	Multi-copy target: RpoB core region Insertion elements: IS6110 + IS1081
Resistance detection	Real-time PCR 5 probes bind to RpoB gene	Melting curve 4 probes bind to RpoB gene
Sputum input	2ml	2ml
PCR reaction	25ul	50ul
Assay TAT	112min	65-87min
Limit of detection	131cfu/ml	16cfu/ml
Cost	9.98USD	9.98USD

Short pieces of DNA, occurs multiple times in genome, conserved in MTBC

Xpert® MTB/XDR ТЕСТ

Xpert MTB / XDR можно использовать в качестве диагностического теста для выявления устойчивости к изониазиду (INH), фторхинолонам (FLQ), инъекционными препаратами второго ряда (SLID) (амикацин, канамицин, капреомицин) и этионамиду (ETH) в мокроте



Xpert® MTB/XDR TEST

Xpert® MTB / XDR
требуется 10-цветных
модулей GeneXpert®



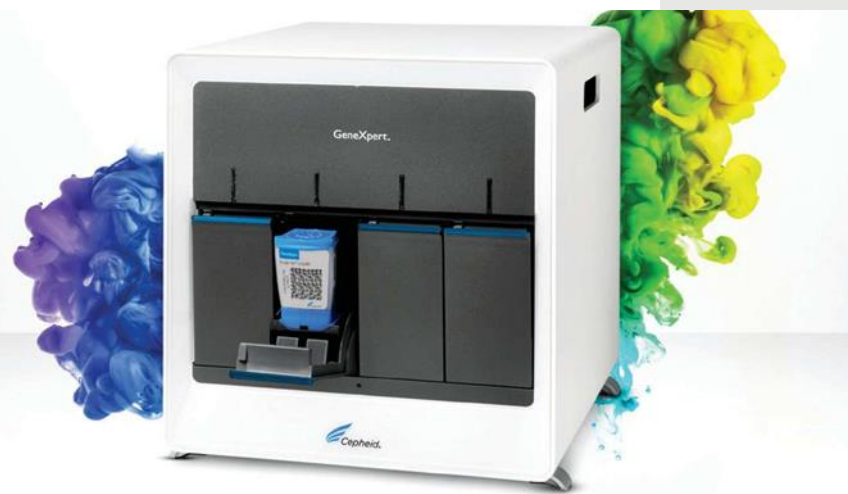
Drug Resistance	Gene Target	Codon Regions	Nucleotide Interrogated
isoniazid	<i>inhA</i> promoter	NA	-1 to -32 intergenic
	<i>katG</i>	311-319	939-957
	<i>fabG1</i>	199-210	597-630
	<i>oxyR- ahpC</i> intergenic region	NA	-5 to -50 intergenic (or -47 to 92)
ethionamide	<i>inhA</i> promoter	NA	-1 to -32 intergenic
fluoroquinolones	<i>gyrA</i>	87-95	261-285
	<i>gyrB</i>	531-544 (or 493-505)	1596-1632
amikacin, kanamycin, capreomycin	<i>rrs</i>	NA	1396-1417
	<i>eis</i> promoter	NA	-6 to -42 intergenic

Xpert® MTB/XDR TEST

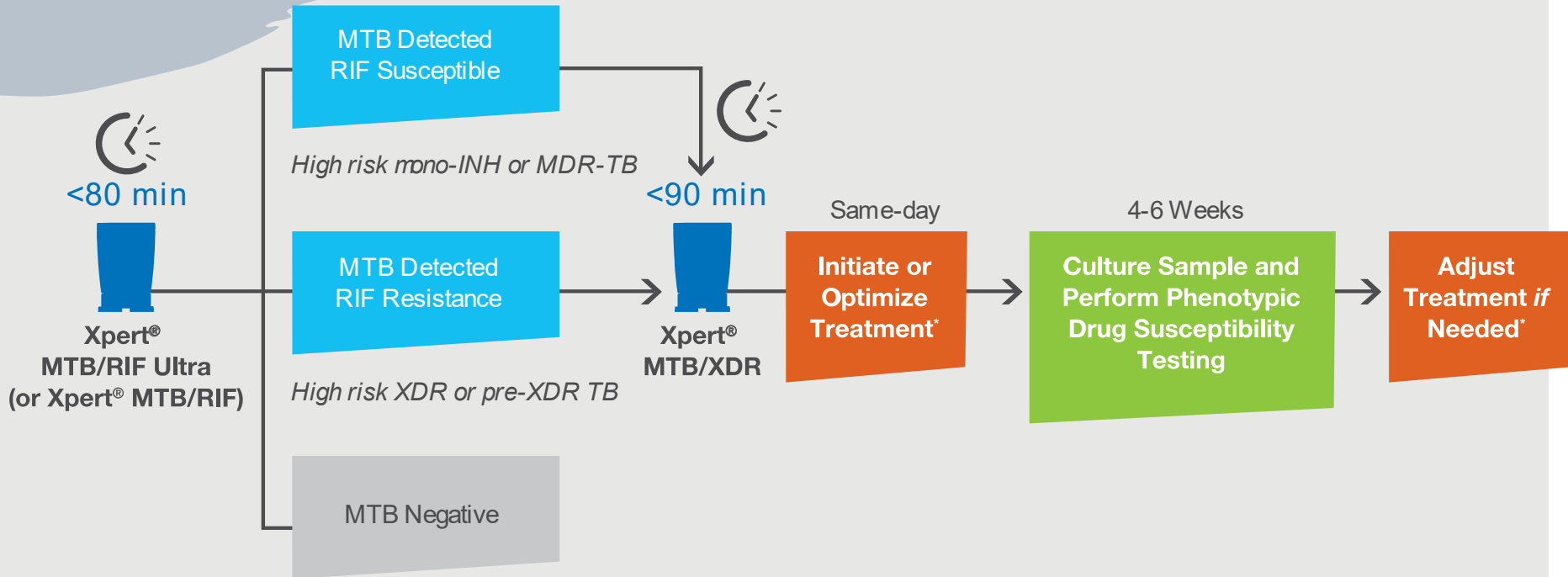
Performance⁸

	vs phenotypic DST [^]		vs sequencing	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
isoniazid	91.4%	99.1%	98.8%	100%
fluoroquinolones	93.1%	98.5%	93.3%	100%
amikacin	91.9%	99.4%	96.4%	100%
kanamycin	87.9%	99.6%	96.7%	100%
capreomycin	84.0%	100%	96.3%	100%
ethionamide	64.7% [#]	98.3%	97.2%	100%

Хpert® MTB / XDR
требует 10-цветных
модулей GeneXpert®



Xpert[®] MTB/XDR TECT



➤ Время до результата
< 90 min

Truenat MTB, MTB Plus and MTB-RIF Dx assays

- Trueprep Auto DNA extraction system;
- Truelab DuoDx and Truelab QuattroDx micro-PCR machines;
- Truelab MTB chip;
- Truelab MTB Plus chip; and
- Truelab MTB-RIF Dx chip.



PCR: polymerase chain reaction.

Source: Reproduced with permission of Molbio Diagnostics, © 2021. All rights reserved.

ПЦР в реальном времени и др

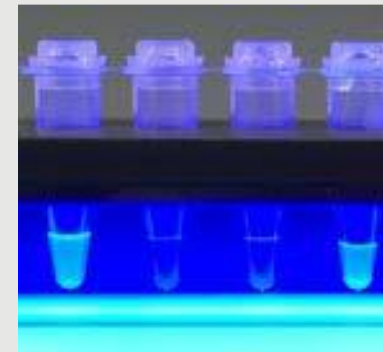
- **Abbott** RealTime MTB assay и RealTime MTB RIF/INH Resistance assay
- BD MAX MDR-TB (Becton Dickinson)
- cobas MTB- RIF/INH (Roche)
- FluoroType MTBDR Version 2.0 (Hain/Bruker)

В марте 2020 года Группа экспертов по диагностике (ERPD) Глобального фонда одобрила тесты Abbott RealTime MTB и MTB RIF / INH, а также тест BD MAX MDR-TB для выявления туберкулеза и устойчивости к РИФ и ИНЗ.



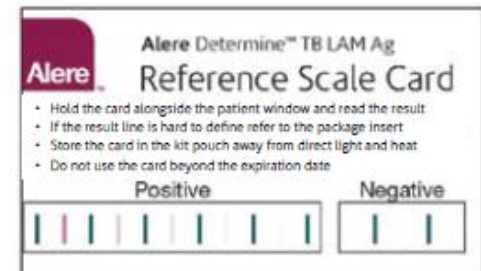
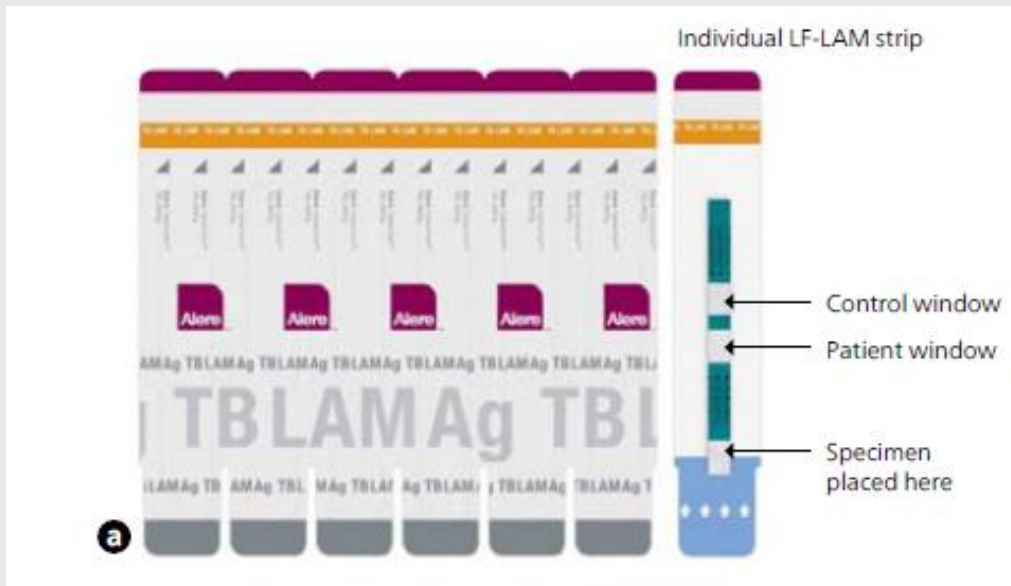
Loopamp™ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) detection kit (Eiken Chemical Company, Tokyo, Japan),

- Loop-mediated isothermal amplification – LAMP -Петлевая изотермическая амплификация



Alere Determine TB LAM Ag (USA),

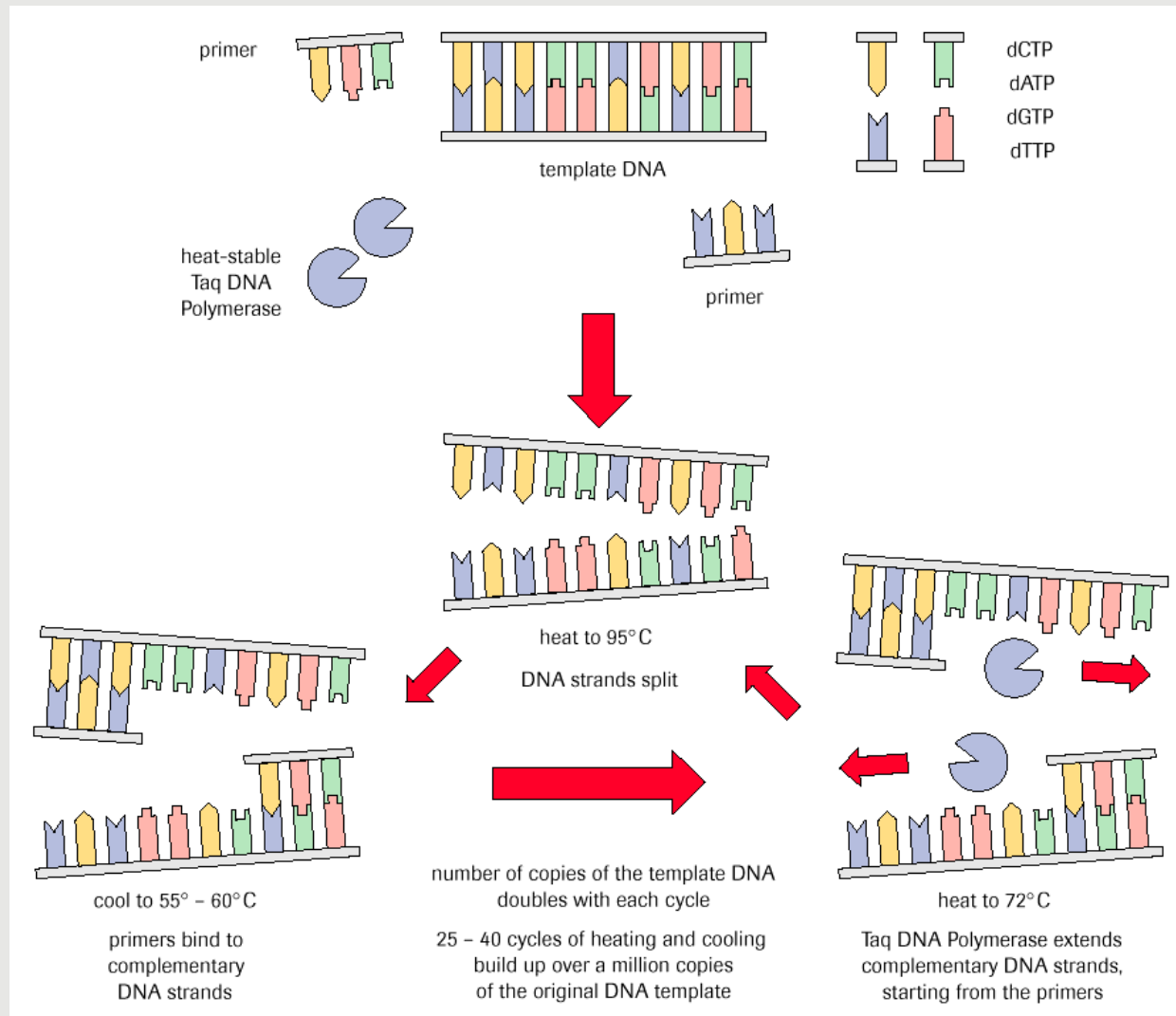
- Анализ латерального потока мочи на липоарабиноманнан
- ВОЗ настоятельно рекомендует использовать LF-LAM для диагностики активного ТБ у ВИЧ-положительные взрослые, подростки и дети:
 - 1.1. с признаками и симптомами туберкулеза (легочного и/или внелегочного)
 - 1.2. с продвинутой стадией ВИЧ-инфекции¹⁴ или тяжелобольными
- независимо от признаков и симптомов туберкулеза и при количестве клеток CD₄ менее 100 клеток/мм³
- ВОЗ не рекомендует использовать LF-LAM без симптомов ТБ и неизвестного количества клеток CD₄ или без симптомов ТБ и количества клеток CD₄ больше или равно 200 клеток/мм³



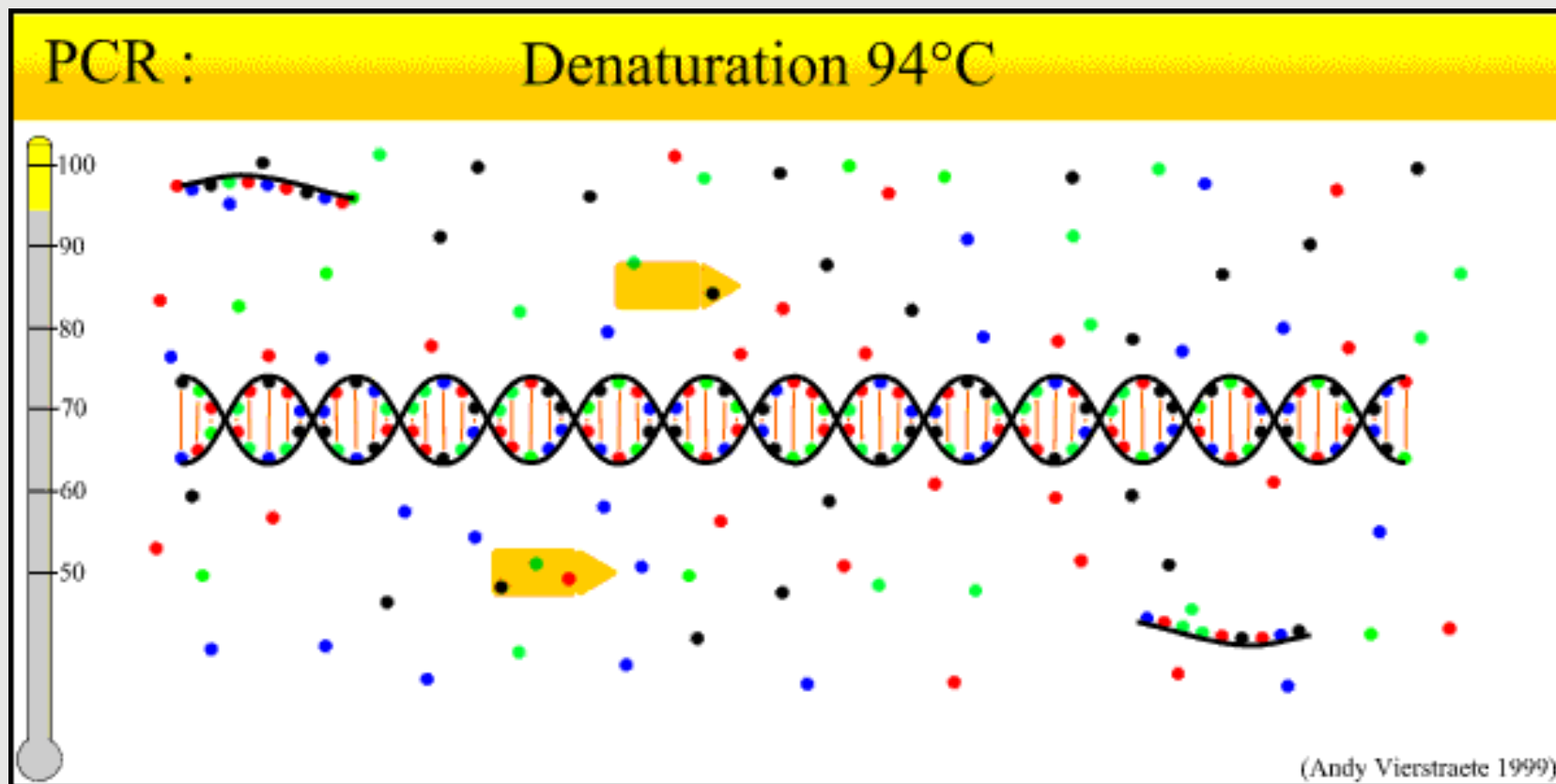
Source: Reproduced with permission of Abbott, © 2021. All rights reserved (24).

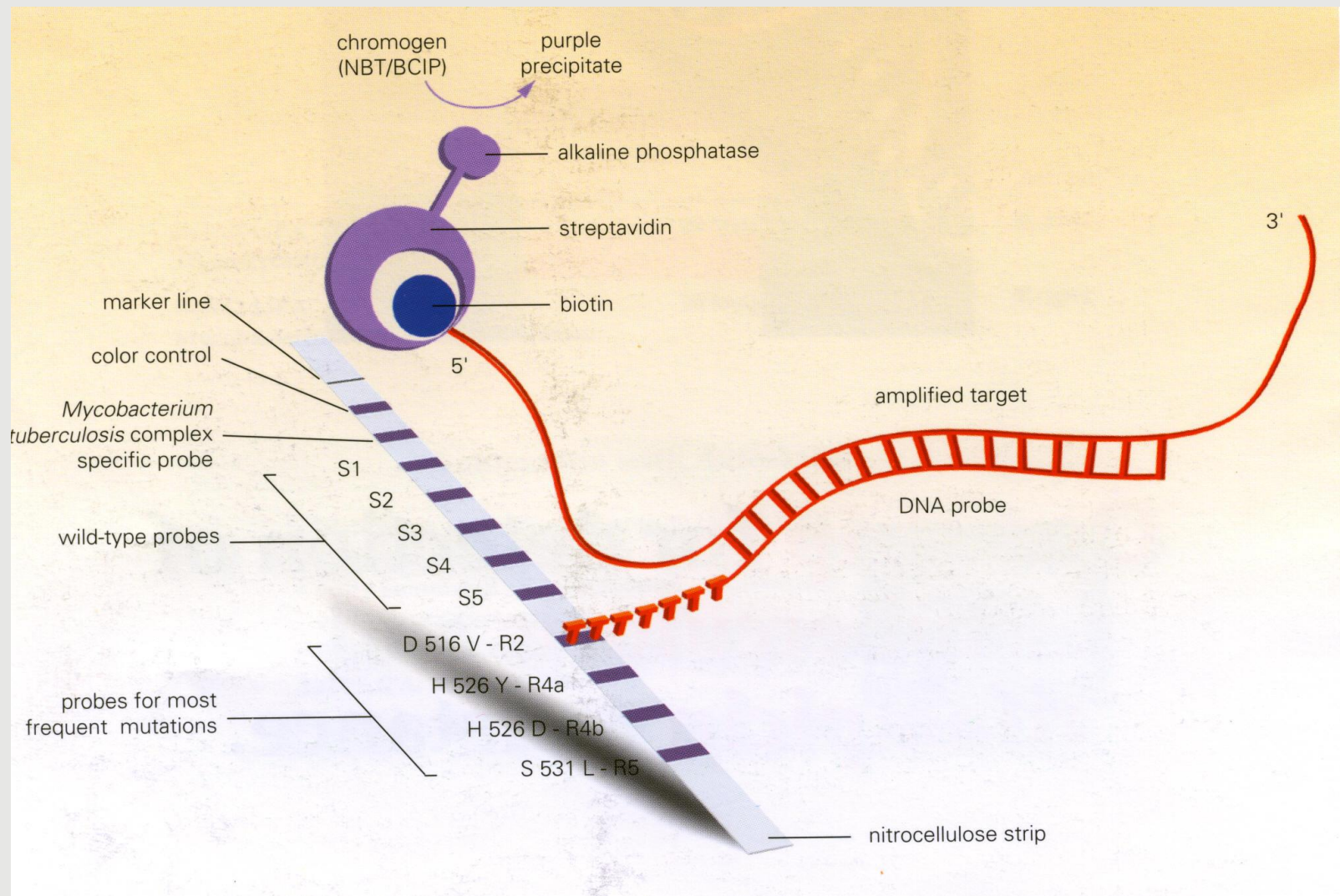
ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

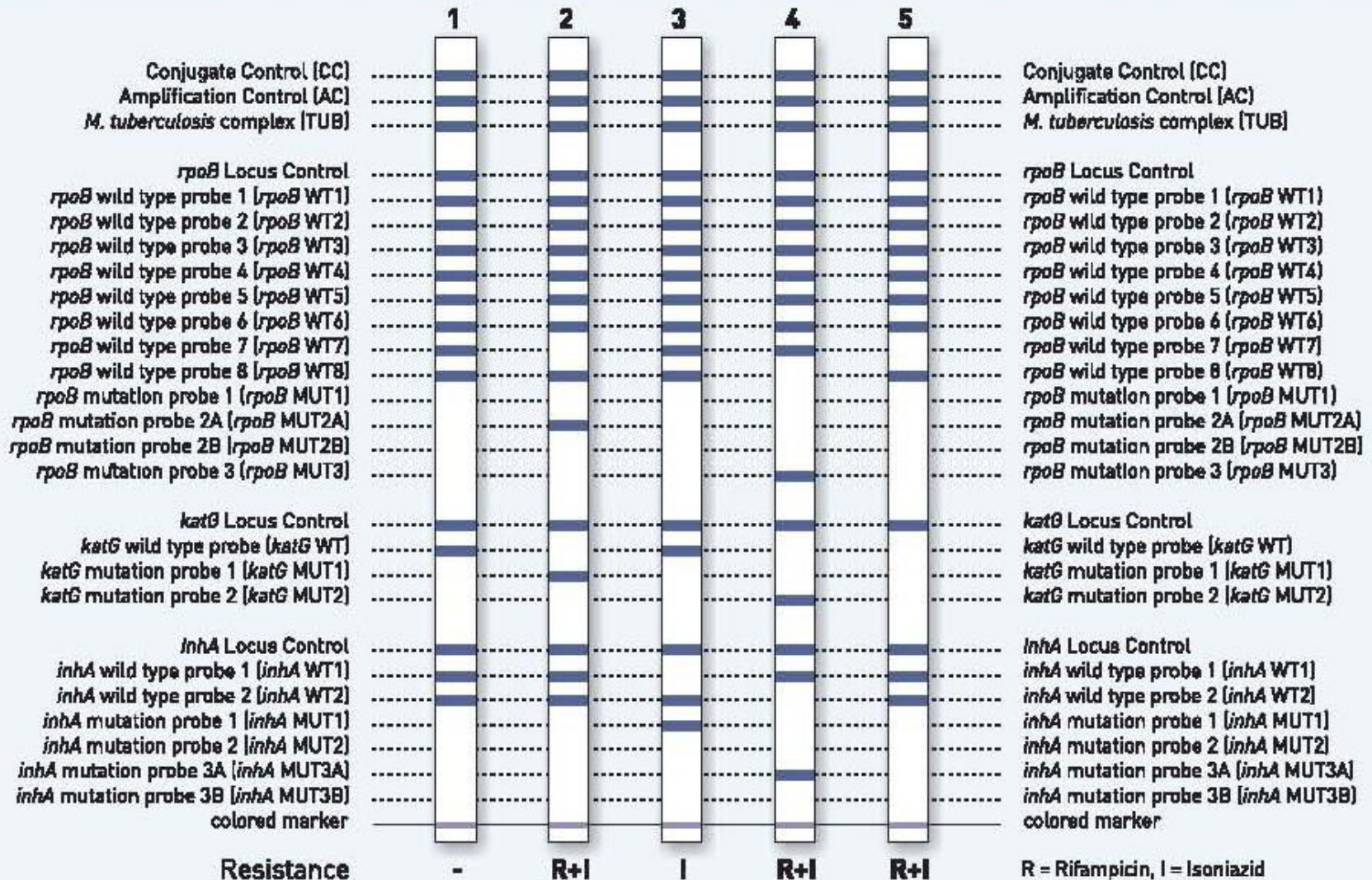


ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ



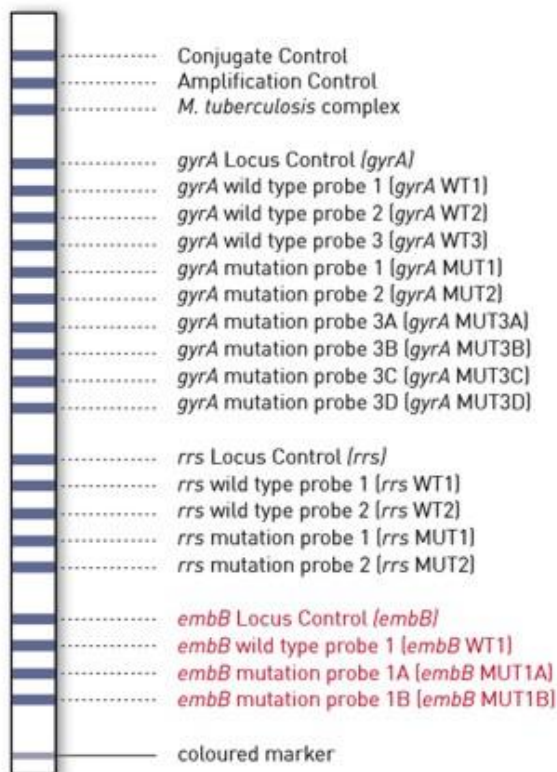


GenoType® MTBDR Plus

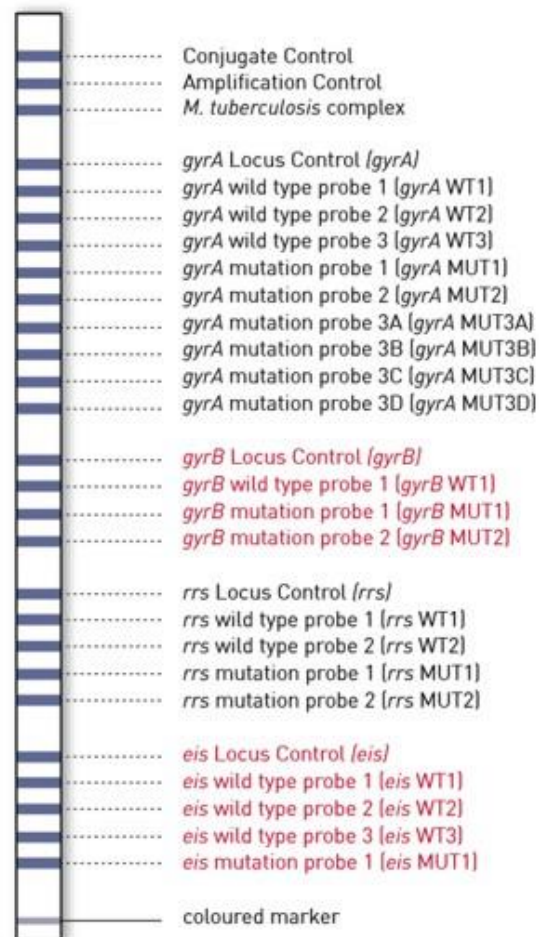


GenoType® MTBDRsI

GenoType MTBDRsI VER 1.0

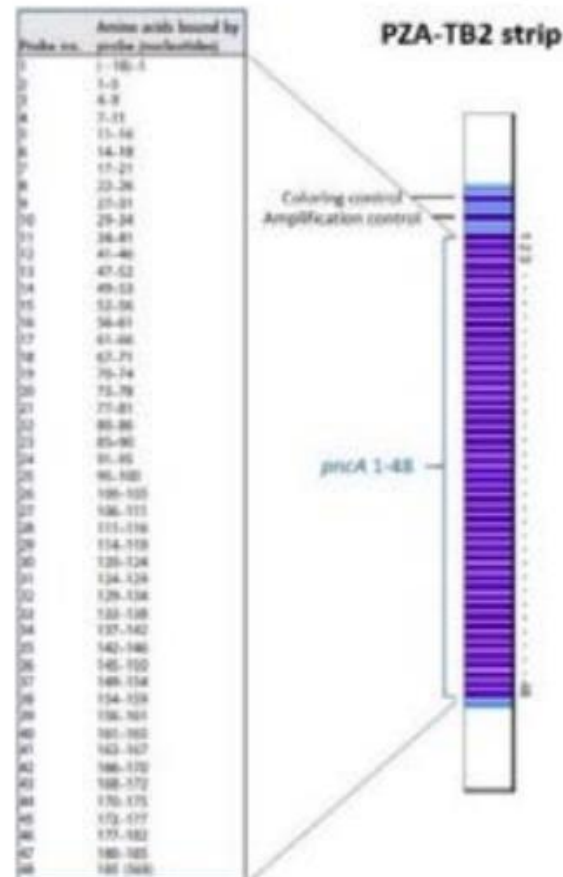
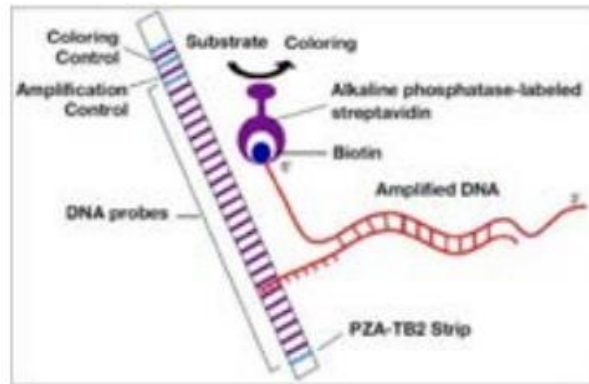


GenoType MTBDRsI VER 2.0



Differences between the two versions are marked in red

Nipro Genoscholar PZA-TB II test



Source: Reproduced with permission of Nipro, © 2021. All rights reserved.

ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ LRA

3 отделенных рабочих зон:

- Извлечение ДНК
- ПЦР подготовка смеси
- ПЦР (смешивают ДНК с смесью)

Оборудование:

- ✓ ПЦР термоциклер
- ✓ Твинкубатор - сухой термоблок или водную ванну с колеблющейся платформой для гибридизации
- ✓ центрифуга

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПРИ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

МОДУЛЬ 3
РАННЯЯ
ДИАГНОСТИКА ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ТБ

WHO
consolidated
guidelines on
tuberculosis

Module 3: Diagnosis

Rapid diagnostics for
tuberculosis detection

2021 update



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra

Последние проанализированные данные подтверждают продолжение использования Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra в качестве начальных диагностических тестов для легочного ТБ у пациентов любого возраста.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С ПРИЗНАКАМИ И СИМПТОМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

- 1. У взрослых с признаками и симптомами туберкулеза легких Xpert MTB / RIF следует использовать в качестве начального диагностического теста для выявления туберкулеза и устойчивости к рифампицину в мокроте, а не микроскопии мазка / посева и фенотипического ТЛЧ.
- 2. У детей с признаками и симптомами легочного туберкулеза Xpert MTB / RIF следует использовать в качестве начального диагностического теста для выявления туберкулеза и устойчивости к рифампицину в мокроте, желудочном аспирате, назофарингеальном аспирате и кале, а не микроскопии мазка / посева и фенотипическом ТЛЧ.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С ПРИЗНАКАМИ И СИМПТОМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

- 3. У взрослых с признаками и симптомами легочного ТБ и без предшествующего анамнеза ТБ (≤ 5 лет) или с отдаленным анамнезом лечения ТБ (> 5 лет после окончания лечения) Xpert Ultra следует использовать в качестве начального диагностического теста.
- 4. У взрослых с признаками и симптомами легочного туберкулеза и с предшествующим туберкулезом в анамнезе и прекращением лечения в течение последних 5 лет Xpert Ultra может использоваться в качестве начального диагностического теста на туберкулез и для выявления устойчивости к рифампицину в мокроте,
- 5. У детей с признаками и симптомами туберкулеза легких Xpert Ultra следует использовать в качестве первоначального диагностического теста на туберкулез и выявления устойчивости к рифампицину в мокроте или назофарингеальном аспирате

- Он также поддерживает использование Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra в диагностическом обследовании всех пациентов с внелегочным туберкулезом и детей с туберкулезом (особенно в образцах из желудка, носоглотки и **стула**). 6. – 10.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ

6 У взрослых и детей с признаками и симптомами туберкулезного менингита следует использовать Xpert MTB / RIF или Xpert Ultra в **спинномозговой жидкости (ЦСЖ)** в качестве начального диагностического теста на туберкулезный менингит,

7 У взрослых и детей с признаками и симптомами внелегочного туберкулеза Xpert MTB / RIF может использоваться при **аспирации лимфатических узлов, биопсии лимфатических узлов, плевральной жидкости, перитонеальной жидкости, перикардимальной жидкости, синовиальной жидкости или образцах мочи** в качестве первоначального диагностического теста для соответствующих форм внелегочного ТБ,

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ

8 У взрослых и детей с признаками и симптомами внелегочного ТБ Xpert Ultra можно использовать при аспирации лимфатических узлов и биопсии лимфатических узлов в качестве первоначального диагностического теста на ТБ лимфатических узлов,

9 У взрослых и детей с признаками и симптомами внелегочного туберкулеза для выявления устойчивости к рифампицину следует использовать Xpert MTB / RIF или Xpert Ultra,

10 У **ВИЧ-инфицированных взрослых и детей** с признаками и симптомами **диссеминированного** туберкулеза Xpert MTB / RIF можно использовать в крови в качестве начального диагностического теста на диссеминированный туберкулез.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С ПРИЗНАКАМИ И СИМПТОМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

- I1 У взрослых с признаками и симптомами туберкулеза легких, имеющих TRACE положительный результат Xpert Ultra при первоначальном тесте, повторное тестирование с помощью Xpert Ultra не может использоваться.
- I2 У детей с признаками и симптомами туберкулеза легких в условиях с вероятностью предварительного тестирования ниже 5% и отрицательным результатом Xpert MTB / RIF при первоначальном тесте повторное тестирование с помощью Xpert MTB / RIF в мокроте, желудочной жидкости, аспирате из носоглотки или образцах кала может не использоваться.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra В КАЧЕСТВЕ НАЧАЛЬНЫХ ТЕСТОВ У ВЗРОСЛЫХ И ДЕТЕЙ С ПРИЗНАКАМИ И СИМПТОМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

- 13 У детей с признаками и симптомами туберкулеза легких в условиях с вероятностью предварительного тестирования 5% или более и отрицательным результатом Xpert MTB / RIF при первоначальном тесте, повторное тестирование с помощью Xpert MTB / RIF (всего два теста) в мокроте, желудке. Можно использовать образцы жидкости, носоглоточного аспирата и стула.
- 14 У детей с признаками и симптомами туберкулеза легких в условиях с вероятностью предварительного тестирования ниже 5% и отрицательным результатом Xpert Ultra при первоначальном тесте повторное тестирование с помощью Xpert Ultra в образцах мокроты или носоглоточного аспирата не может использоваться.
- 15 У детей с признаками и симптомами туберкулеза легких в условиях с вероятностью предварительного тестирования 5% или более и отрицательным результатом Xpert Ultra при первом начальном тесте следует повторить один тест Xpert Ultra (всего два теста) в образцах мокроты и носоглоточного аспирата. может быть использовано.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ПРИ ДИАГНОСТИКИ РЕЗИСТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ LPA

3.1 Для лиц с положительным мазком мокроты или культивированным изолятом МТВС коммерческие молекулярные LPA могут использоваться в качестве начального теста вместо ТЛЧ на основе фенотипических культур для выявления устойчивости к рифампицину и изониазиду.

(Условная рекомендация, умеренная уверенность в доказательствах точности теста)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ LPA. ЗАМЕЧАНИЕ

1. Эти рекомендации относятся к использованию LPA для тестирования образцов с положительным мазком мокроты (прямое тестирование) и культивированных изолятов МТВС (непрямое тестирование) как из легких, так и из внелегочных тканей.
2. LPA **не рекомендуются** для прямого тестирования образцов мокроты с **отрицательным мазком мокроты**.
3. Эти рекомендации относятся к выявлению МТВС и диагностике МЛУ-ТБ, но подтверждают, что точность определения устойчивости к рифампицину и изониазиду различается, и, следовательно, точность диагностики МЛУ-ТБ в целом снижается.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ LPA. ЗАМЕЧАНИЕ

4. Эти рекомендации не исключают необходимости проведения традиционных ТЛЧ на основе культур, которые будут необходимы для определения устойчивости к другим противотуберкулезным агентам и для мониторинга появления дополнительной лекарственной устойчивости.

5. Традиционные ТЛЧ на изониазид на основе культуральных исследований все еще можно использовать для оценки пациентов, если результат LPA не выявляет устойчивости к изониазиду. Это особенно важно для групп населения с высокой вероятностью устойчивости к изониазиду до проведения теста.

6. Эти рекомендации применимы к применению LPA у детей на основе обобщения данных взрослых.

8

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!