

Российские инновации в лабораторной диагностике туберкулеза

**Новые методы иммунологической и
микробиологической диагностики
туберкулеза**

**НИИ фтизиопульмонологии Первого
МГМУ им.И.М.Сеченова**

**Коллабораторы: НИИЭМ им.
Н.Ф.Гамалея; ООО «МонА», ЗАО
«Синтол», кафедра иммунологии МГУ
им.М.В.Ломоносова,
Институт биофизики РАН, г.Пущино**

Методы иммунного анализа: прикладные разработки и практические результаты

- ❖ Разработка отечественной тест-системы «Тубинферон» для определения туберкулезного инфицирования у детей и подростков
- ❖ Определение и мониторинг специфического иммунного ответа индуцированного в образцах цельной крови *ex vivo* в присутствии *M.tuberculosis* специфических антигенов
- ❖ Диагностика и оценка активности туберкулезной инфекции

Туберкулезная инфекция у детей и подростков. Набор реагентов «Тубинферон»





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
№ ФСР 2011/11269

от 12 июля 2011 года Срок действия: не ограничен.

Настоящее удостоверение выдано

ООО "МонА", Россия, 121108, Москва, ул. Кастанаевская, д. 38, стр. 1

и подтверждает, что изделие медицинского назначения

Набор реагентов для иммунологического определения туберкулезного инфицирования по индукции интерферона гамма in vitro в присутствии специфических антигенов микобактерий туберкулеза "ТУБИНФЕРОН" по ТУ 9398-001-88410295-2010 в составе (см. приложение на 2 листах):

производства

ООО "МонА", Россия, 121108, Москва, ул. Кастанаевская, д. 38, стр. 1

класс потенциального риска 2а ОКП 93 9817

соответствующее комплекту регистрационной документации

КРД № 12195 от 11.04.2011

приказом Росздравнадзора от 12 июля 2011 года № 4095-Пр/11

разрешено к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации


Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития **Е.А. Тельнова**

013682

МЕТОДЫ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

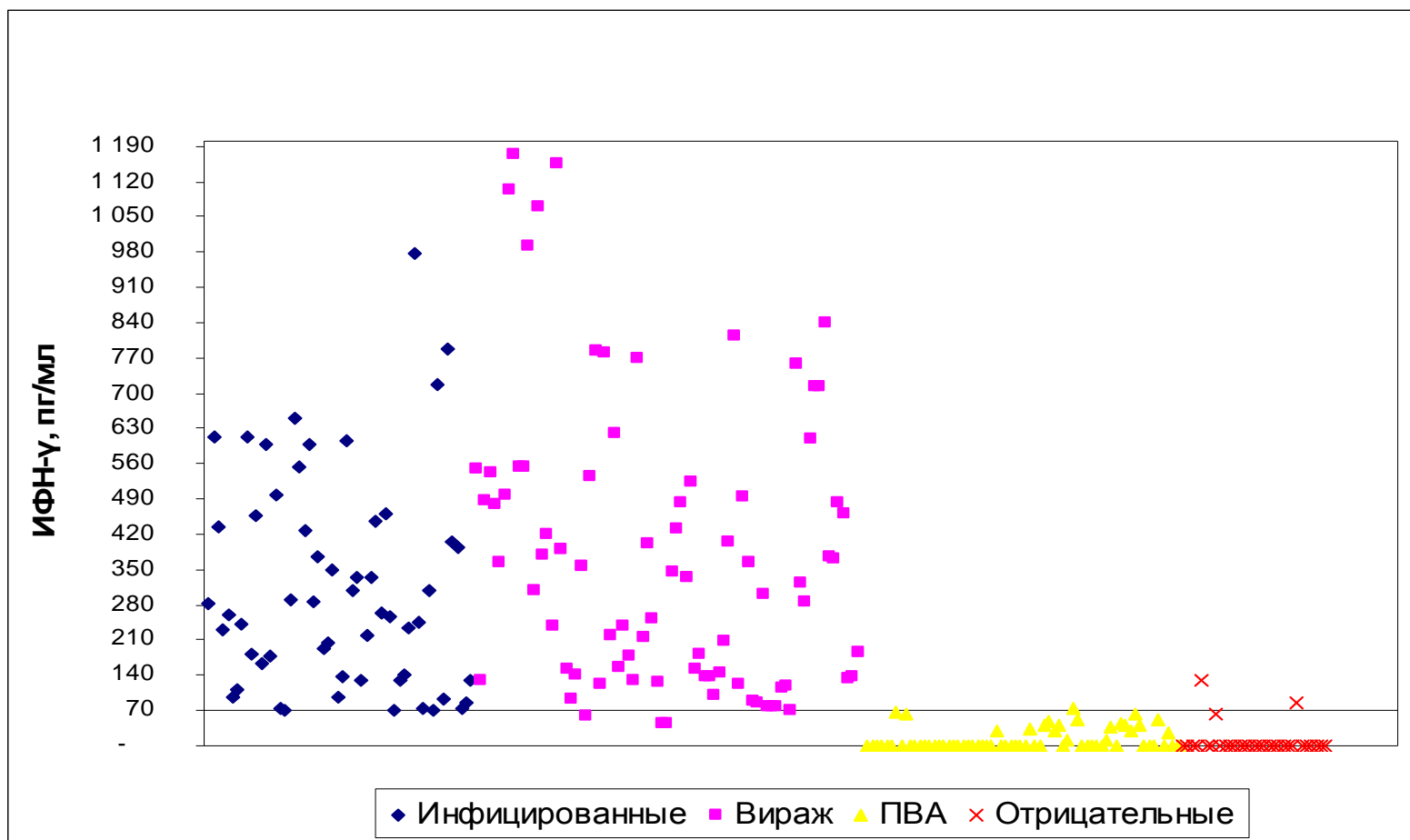
- Образцы цельной гепаринизированной крови инкубировались 22-24 часа в стерильных пробирках по 1 мл:
- Контрольная - без добавления антигена и две опытных, в которые добавляли по 10 мкг белка антигенов - туберкулин PPD и смесь рекомбинантных антигенов ESAT-6 и CFP-10, соответственно.
- В образцах надосадочной плазмы измеряли концентрации исследуемых цитокинов ИФН- γ и ФНО- α с помощью двух разработанных нами тест-систем количественного иммуноферментного анализа.

Набор реагентов «Тубинферон»»



Пробирки с образцами крови после инкубации и набор реагентов

Индукция ИФН- γ в присутствии ESAT-6



Определение туберкулезного инфицирования детей и подростков методом индукции ИФН- γ в образцах крови ex vivo при использовании специфического антигена ESAT-6

Гр.	Диагноз	Чис ло	Продукция ИФН- γ , пг/мл – медиана, 25%-75% квартильные величины			
			PPD	p	ESAT-6	p
1	Манту-отрицат. здоровые	31	85 (48-181)	$p_{1-2} < 0,001$	0	
2	Поствакцинальная БЦЖ-аллергия	66	282 (208-440)		0	
3	«Вираз» пробы Манту	82	552 (338-862)	$p_{2-3} < 0,001$	351 (152-537)	$p_{2-3} < 0,001$
4	Инфицированные МБТ	56	552 (294-720)		336 (182-552)	
5	Туберкулез ВГЛУ	45	624 (323-1033)		377 (156-791)	
6	Плеврит тубэтиологии	15	327 (102-691)		388 (133-775)	
7	ПТК	4	969 (690-1462)	$p_{3-7} < 0,05$	704 (140-1610)	$p_{3-7} < 0,05$

«Тубинферон» – антиген-индуцированная продукция интерферона-гамма

Определение первичной туберкулезной инфекции

Дифференцирование от поствакцинальной аллергии

- **Чувствительность анализа -96 %**
- **Специфичность 98 %**
 - **Определение туберкулезной этиологии
экссудативного плеврита: при концентрации
ИФН-γ в плевральном экссудате выше 50 пг/мл**

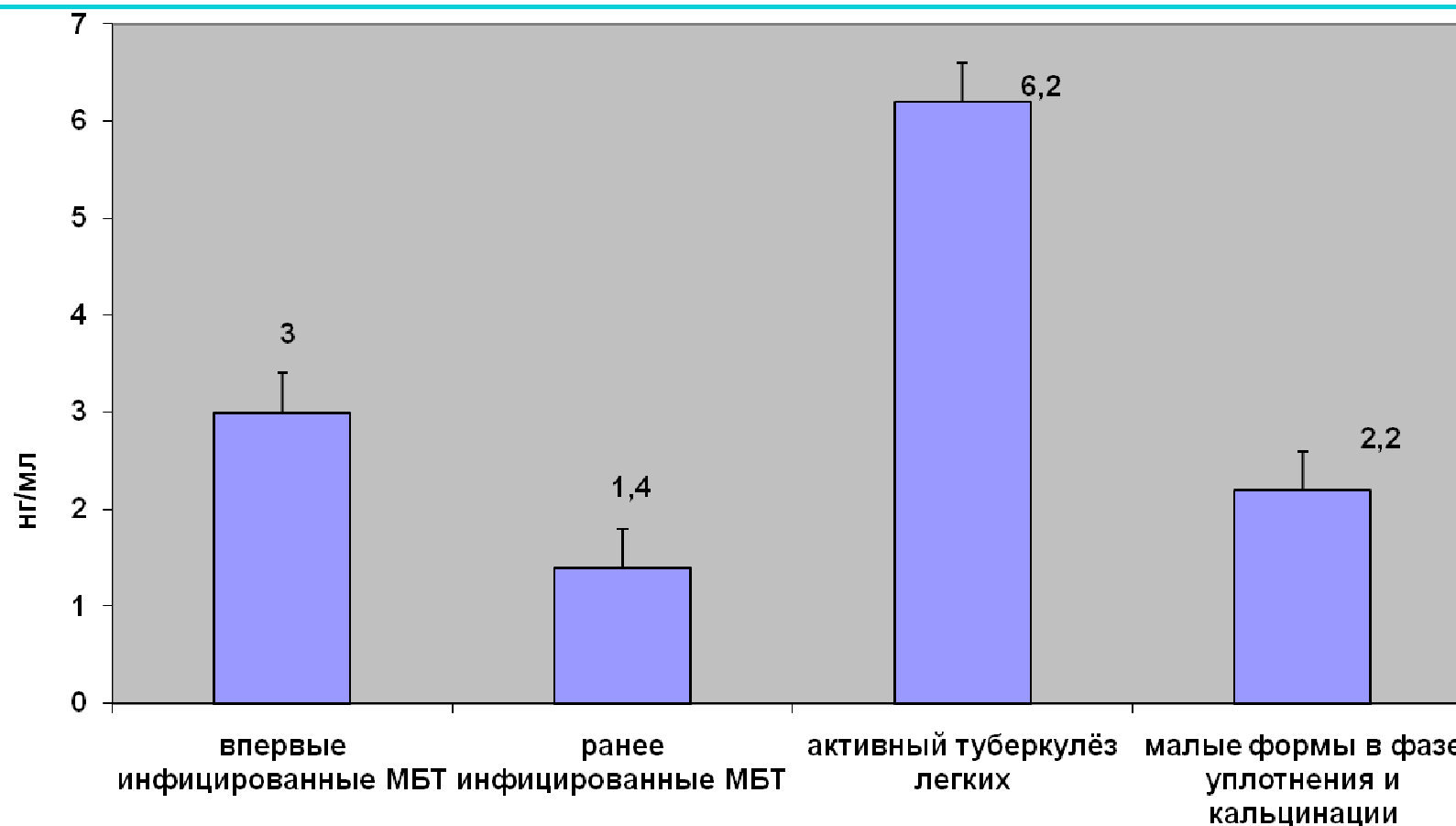
Уровень индукции ИФН-γ антигенами PPD и ESAT-6 в образцах крови ex vivo при первичной туберкулезной инфекции и туберкулезе легких

Группы	Диагноз	N	Продукция ИФН-γ, пг/мл (медиана и 25%-75% межквартильные различия)	
			PPD	ESAT-6
1	«Вираж» пробы Манту	82	552 (339-862)	351 (152-537)
2	Туберкулез ВГЛУ	45	624 (323-1033)	377 (156-791)
3	ПТК	4	969 (640-1642)	704 (140-1610)
4	Плеврит туб. этиологии	15	328 (102-691)	389 134-776
5	Туберкулез легких	122	213 (91-374)	47 (19-161)
	p		P_{5-1,2,3,4} < 0,05	P_{5-1,2,3,4} < 0,05

Индукция ФНО- α в образцах цельной крови инкубированных с ESAT-6 и CFP-10

Группы пациентов подростки	Концентрации ФНО- α в нг/мл	P
1. впервые инфицированные МБТ n=8	3,0 \pm 0,3	P ₁₋₄ < 0,01
2. инфицированные МБТ n=10	1,4 \pm 0,2	P ₁₋₂ < 0,01
3. Активный туберкулез легких n=20	6,2 \pm 0,6	P ₁₋₃ < 0,01
		P ₃₋₄ < 0,001
4. малые формы в фазе уплотнения и кальцинации n=8	2,2 \pm 0,3	P ₂₋₄ = 0,02

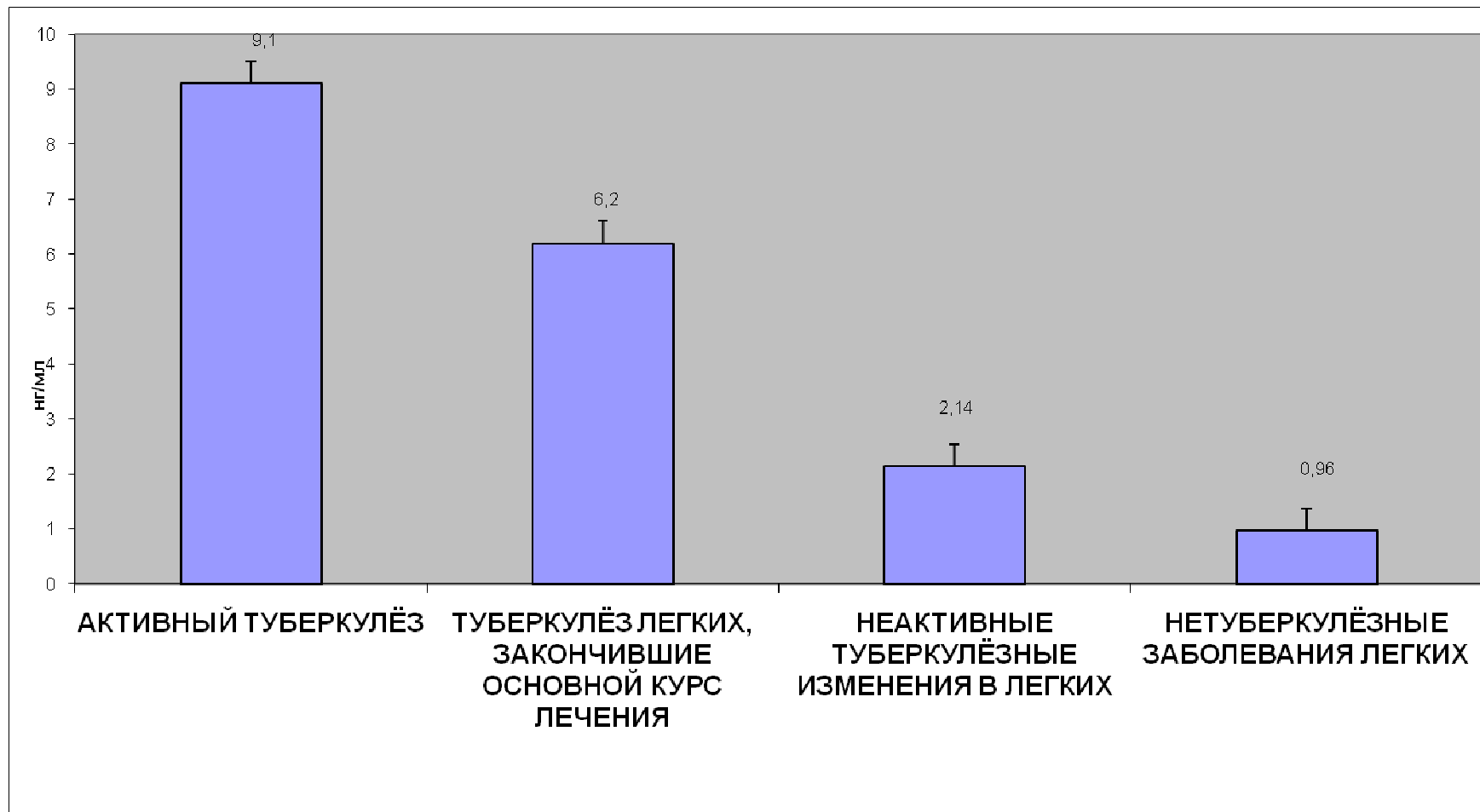
Подростки. Индукция ФНО- α в образцах крови, инкубированных с антигенами ESAT-6 и CFP-10 при различном уровне активности.



Взрослые. Индукция ФНО-α в образцах цельной крови инкубированных с ESAT-6 и CFP-10

Группы пациентов	Концентрации ФНО в нг/мл			
	PPD	p	ESAT-6 и CFP-10	p
1.Активный туб-з легких n = 14	5,8 ± 1,0		9,1 ± 0,98	
2.Туберкулез легких, после основного курса n= 14	4,6 ± 0,37	P 1-2 н.д.	6,2 ± 0,46	p₁₋₂<0,05
3.Туберкулез легких (цирротич.) неясной активности n=9	4,03± 0,66		4,56± 0,61	p₁₋₃<0,01 P_{2- 3}<0,05
4. Неактивный туберкулез легких 3 гр. n= 14	2,8 ± 0,7	P_{2- 3}<0,05	2,14 ± 0,32	p₂₋₄<0,01
5. Нетуберкулезные заболевания легких n=19	0,8 ± 0,13	p_{3- 4}<0,01	0,96± 0,45	p₃₋₄<0,05

**Взрослые. Индукция ФНО-α в образцах крови,
инкубированных с антигенами ESAT-6 и CFP-10.
Активность, излеченность и нетуберкулезные
заболевания**



Антиген-специфическая индукция ФНО- α

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода определения антиген-специфической индукции фактора некроза опухоли в образцах цельной крови *ex vivo* в диагностике туберкулезной инфекции:

- - для дифференцирования активной и латентной туберкулезной инфекции;
- - для иммунологической оценки излеченности туберкулезного процесса;

Сравнительное исследование 26 детей и подростков с помощью анализа антиген-индуцированных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) и кожных тестов: р.Манту и Диаскин.

- **У 24-х пациентов** «вираж» туберкулиновой пробы, в том числе : у 5 – тубконтакт с бациллярным больным ; у 1 пациента экссудативный плеврит .
- Высокие уровни антиген-индуцированных цитокинов высокие наблюдались **в 23 случаях.**
- **Диаскин** – положительный **у 3-х пациентов** : у 2-х первичное тубинфицирование («вираж» р.Манту) и у 1-го пациента – экссудативный плеврит.
- **Выводы:** 1. Диаскин малоэффективен при выявлении первичного туберкулезного инфицирования.
- 2. При наличии высоких уровней антиген-индуцированных цитокинов более детальное обследование также необходимо.

Платформа –технология ПЦР в реальном времени.

Тест-системы для количественного определения ДНК МБТ и обнаружения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду

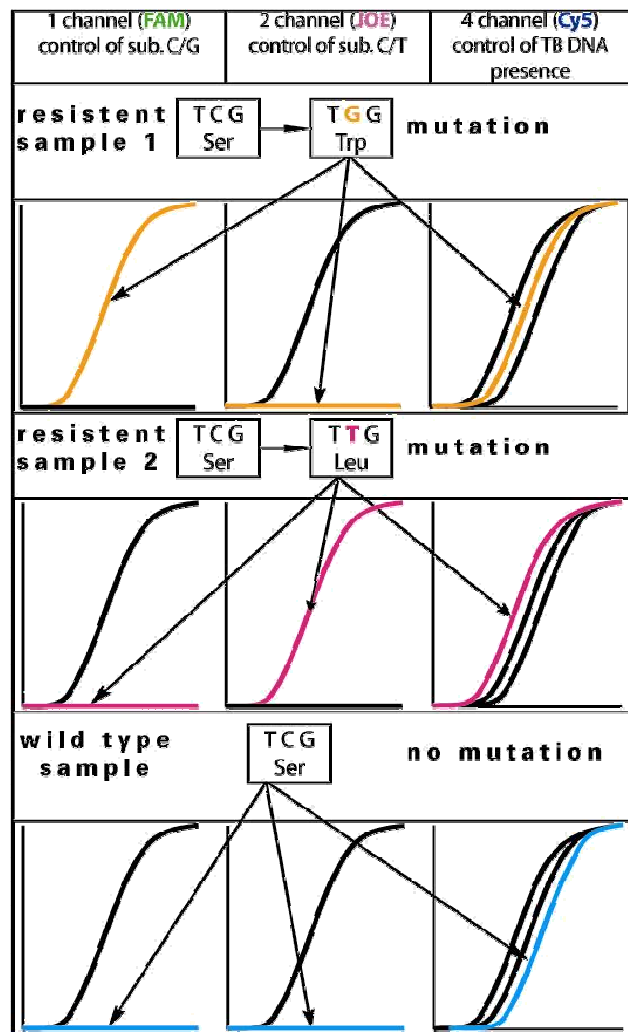


Определение ДНК МБТ: количественный ПЦР-анализ в сравнении с культуральным в системе Bactec. Шифрованные испытания.

Результаты исследований	Число полученных результатов	Проценты	Число <i>IS6110</i> фрагментов ($M \pm m$)
Число положительных результатов ПЦР-анализа	75	98,7	$2,2 \cdot 10^5 \pm 0,4 \cdot 10^5$
Число положительных результатов культивирования	49	64,5	$3 \cdot 10^5 \pm 0,5 \cdot 10^5$
Число отрицательных результатов культивирования	17	22,5	$5 \cdot 10^2 \pm 1,5 \cdot 10^2 *$
Число контаминаций	10	13	$3 \cdot 10^5 \pm 1,0 \cdot 10^5$

Технология «АМПЛИТУБ»:

III этап – ПЦР-РВ «АмплиТуб-МЛУ-РВ»



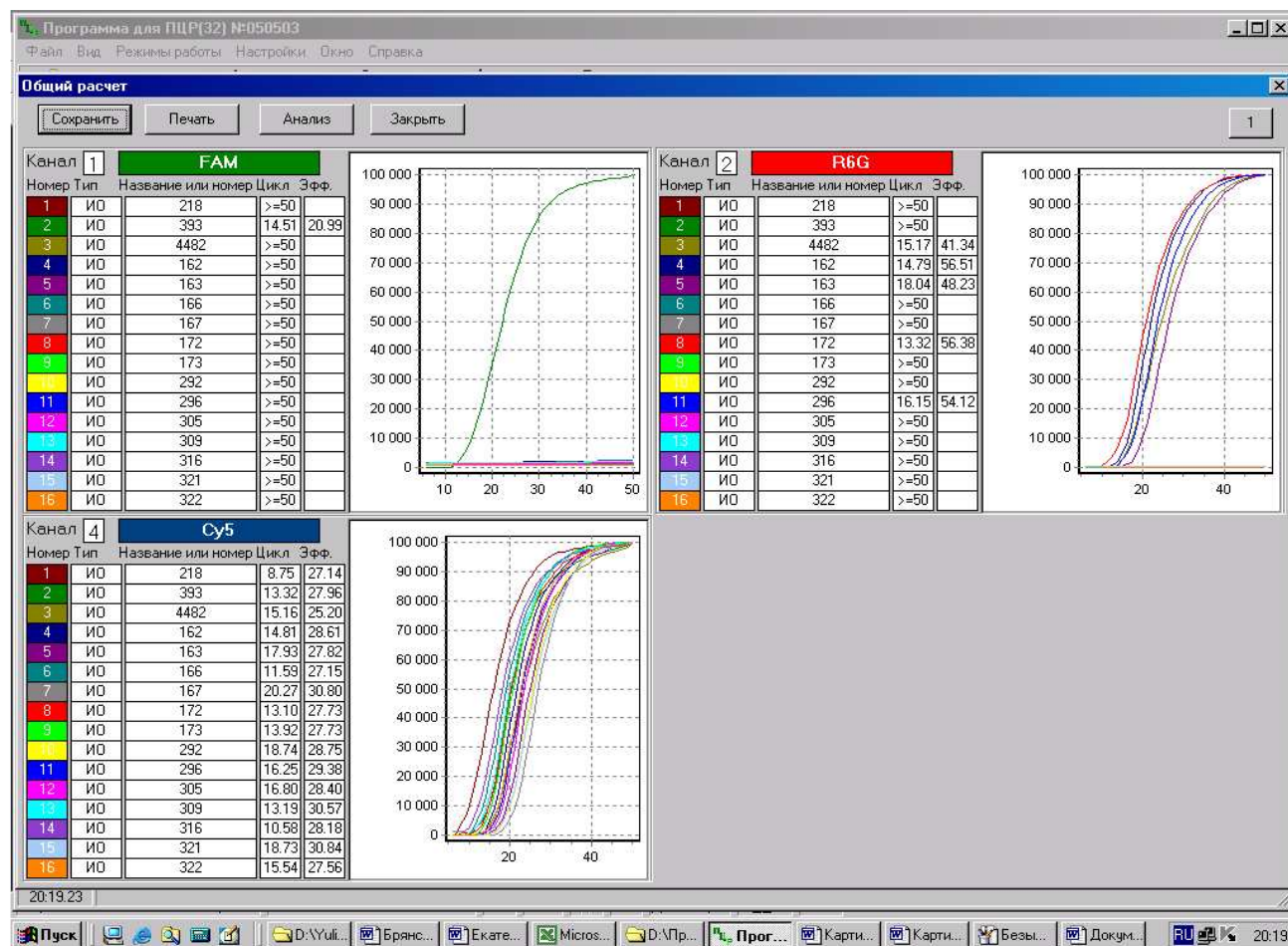
В основе лежит новая молекулярно-генетическая технология – **мультиконкурентная аллель-специфичная ПЦР-РВ.**

В формате одной пробирки используются 5'-флуоресцентно-меченые аллель-специфичные праймеры с общим комплементарным им 3'-меченым олигонуклеотидом-гасителем и контрольный флуоресцентный зонд, комплементарный участку ДНК без мутаций.

При отсутствии мутаций в ДНК нарастание флуоресценции в ходе ПЦР-РВ наблюдается только по флуорофору зонда.

При наличии мутаций в ДНК нарастание флуоресценции в ходе ПЦР-РВ наблюдается как по флуорофору зонда, так и по флуорофору 5'-флуоресцентно-меченого аллель-специфичного праймера.

Пример анализа образцов *Mycobacterium tuberculosis* (г. Кемерово), устойчивых к рифампицину, по гену *rpoB* 531 кодон методом ПЦР в реальном времени на приборе АНК-32



На 1-м канале флуоресценции – контроль на 1 мутацию; на 2-м канале – контроль на 2-ю мутацию и 4 положительных результата на 2-ю мутацию из 13 изученных исследуемых образцов. 3-й канал – контроли всех исследуемых образцов дают подъем флуоресценции на присутствие ДНК МБТ

Результаты сравнительных шифрованных испытаний анализа лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду.

- ❖ Общая совпадаемость (конкордантность)
«Амплитуб-МЛУ-РВ» и **ВАСТЕС** – **91,7%**
- ❖ Чувствительность тест-системы «Амплитуб-
МЛУ-РВ» - **92%**
- ❖ Специфичность - **96%**
- ❖ Эффективность ПЦР-анализа - **86%,**
против **69,6%** в системе **Bactec**

Развитие и внедрение молекулярной диагностики. Проблема выбора: отечественные тест-системы или GeneXpert. Цена/качество.

1. Для обнаружения МБТ и определения лекарственной устойчивости должны использоваться тест-системы различающиеся по задачам. Чувствительность Амплитуб-РВ выше культурального анализа на 20% ; GeneXpert – ниже культурального на 10%.
2. Амплитуб-МЛУ-РВ определяет лекарственную устойчивость к рифампицину и изониазиду (готовится к регистрации анализ для 2-го ряда препаратов); GeneXpert – только к рифампицину.
3. Цена всех расходных материалов для выявления МБТ при работе с Амплитуб-РВ – 150 руб; для определения лекарственной устойчивости с Амплитуб-МЛУ-РВ– в пределах 400 руб.

Технология ПЦР в реальном времени может стать массовой и доступной для обнаружения МБТ в диагностических материалах

- 1. Адаптация отечественных реагентов для работы с автоматическими станциями для выделения ДНК (40 образцов за 2 часа) и разработка отечественных автоматов для выделения ДНК.**
- 2. Новые реагенты для инактивации инфекционных свойств и сохранности ДНК в клинических образцах позволят транспортировать материалы в централизованные лаборатории .**
- 3. Централизованная региональная ПЦР-лаборатория с 2-3 сотрудниками может обеспечить около 20 тысяч исследований в год**

Выделение ДНК



«М-СОРБ-ТУБ» для ручного выделения ДНК



Сочетает сорбцию ДНК на магнитных частицах и осаждение ДНК в присутствии осаждающего реагента, специально разработан для выделения туберкулезной ДНК из клинического материала.

«М-СОРБ-ТУБ-АВТОМАТ» для автоматического выделения ДНК



Адаптирован для автоматического выделения ДНК микобактерий на роботизированных станциях TECAN

Устройство для сбора МБТ в воздушной среде с использованием нанофильтра и ПЦР-анализа

