

Нетуберкулезные микобактерии.
Идентификация.
Определение лекарственной
чувствительности.
Схемы медикаментозной терапии.
Клиническая лабораторная диагностика.

Журавлев В.Ю.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Группа I - Фотохромогенные медленнорастущие

непигментированные при выращивании в темноте, но приобретают ярко-желтую или желто-оранжевую пигментацию после выдерживания на свету.

Потенциально патогенные штаммы медленно растущие (*M. asiaticum*, *M. kansasii*). Оптимальная температура роста варьирует: 25°C (*M. simiae*), 32-33°C (*M. marinum*) до 37°C (*M. asiaticum*). Быстрорастущие (например, *M. marinum*). Наибольшую клиническую значимость в России имеет вид *M. kansasii*.

Штамм *M. kansasii* (*M. luciflavum*) выделен и описан Булер и Поллак в 1953 г. как возбудитель заболеваний людей. На яичной среде растет в виде шероховатых или гладких колоний, температурный оптимум 37°C. Морфологически бактерии умеренной длины. Описаны 2 варианта *M. kansasii*: оранжевый (*auranticum*) и белый (*album*).



Группа II - Скотохромогенные медленнорастущие

Образующие пигмент в темноте:

M.aquae (*M.gordonae*) и *M.scrofulaceum*.

M.scrofulaceum относится к потенциально патогенным видам.

Скорость роста - 30-60 дней. Впервые он был выделен и описан из гноя лимфатического узла ребенка с лимфаденитом.

Растут при 25 - 37°C.



III группа - Нефотокромогенные медленно растущие

Не образующие пигмента или имеющие бледно-желтую окраску, которая не усиливается под воздействием света:

Растут в течение 2 - 3-х или 5 - 6-ти недель.

- *M. avium* (микобактерии птичьего типа) растут на среде Левенштейна-Йенсена в виде пигментированных колоний при 37°C и 45°C.

Встречаются в воде, в почве.

- *M. xenopi*. Выделен от жабы. Молодые культуры растут в виде непигментированных колоний; позднее появляется пигмент желтого цвета. Морфологически - длинные нитевидные палочки. Растут при 40-45°C, патогенны для человека.

- *M. terrae* впервые были выделены из редьки. Растут на среде Левенштейна-Йенсена в виде беспигментных колоний. Оптимум роста 37°C. Морфологически представлены палочками умеренной длины, сапрофиты.



IV группа - Быстрорастущие

Потенциально патогенные микобактерии *M. fortuitum*, а также сапрофиты, такие как *M. phlei*, *M. smegmatis* и др.

Рост - до 7-10 дней в виде пигментных или беспигментных колоний,

R-форма преобладает

Температура роста - 25°C.



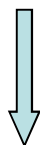
Наиболее распространенные НТМ, способные вызывать заболевание человека

Медленно растущие <i>Mycobacteria</i>	Быстро растущие <i>Mycobacteria</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. malmoense</i>	
<i>M. marinum</i>	
<i>M. simiae</i>	
<i>M. szulgai</i>	
<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. xenopi</i>	



Дифференциация микобактерий туберкулезного комплекса

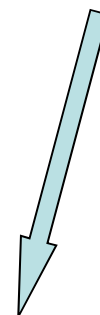
Рост на плотной среде
ЛЙ, Финн 2



1. Характеристика роста на среде Левенштейна-Йенсена. Финна 2
2. Ниациновый тест
3. Потребность в кислороде
4. Восстановление нитратов
5. Чувствительность к пиразинамиду
6. Чувствительность к ТСН 1мкг/мл, 5 мкг/мл
7. Чувствительность к циклосерину 40мкг/мл

Бактериоскопия
с окраской по Ц-Н

Рост на жидкой
среде
ВАСТЕС MGIT 960



Хроматографический тест
BD MGIT™ TBc Identification Kit

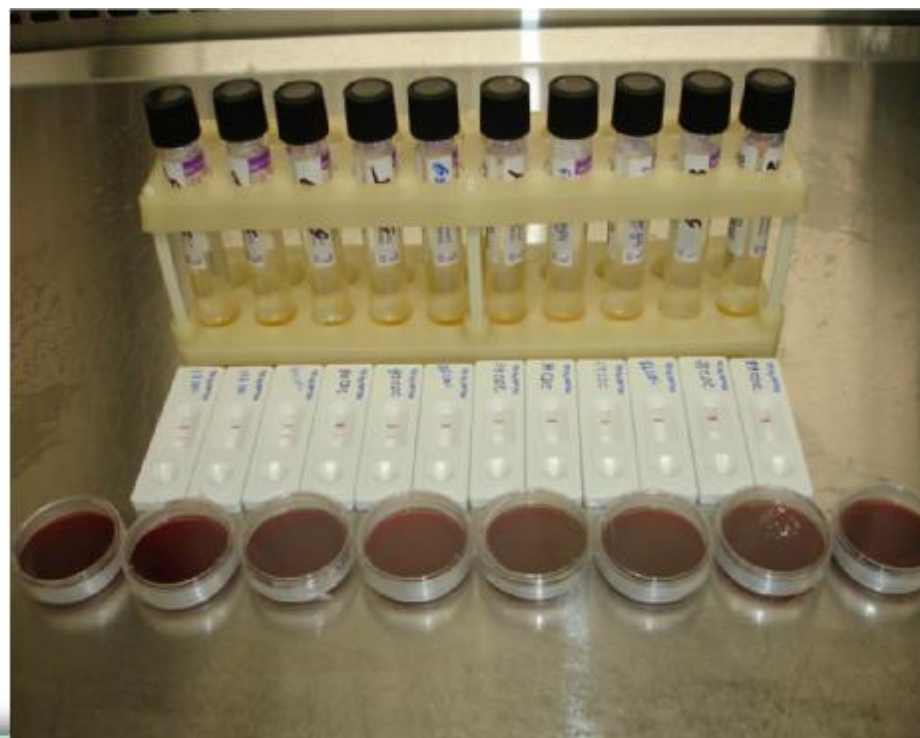
Посев на
кровяной агар

Внутренний
контроль
качества?



Методы дифференциации МБТ от НТМБ

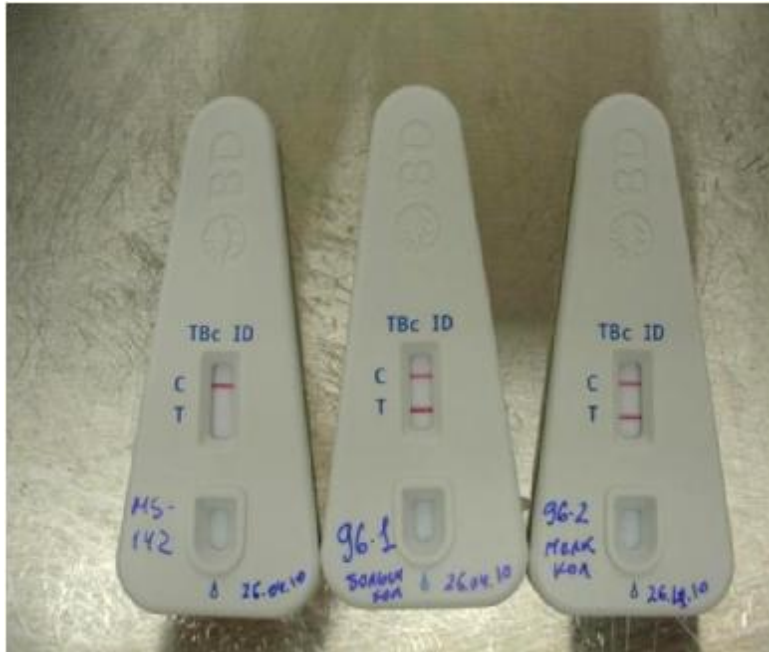
- ПЦР IS6110, выявляющая вставочную последовательность, присутствующую только у микобактерий туберкулезного комплекса.
- Иммунохроматографический метод (ID-test)



ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



TBc ID (BD)



- Используется для идентификации *M.tuberculosis*.
- Основан на хроматографическом иммуноанализе.
- Обнаруживает фракцию микобактериального белка МРТ64, которая выделяется из клеток МБТ в процессе культивирования.

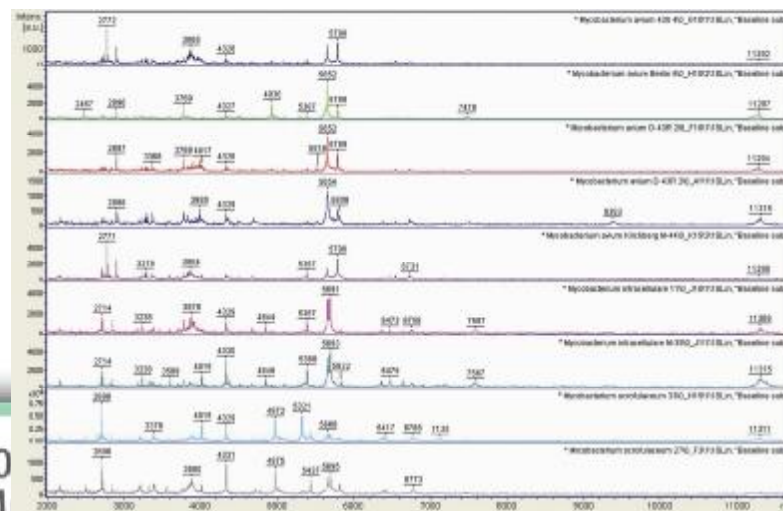
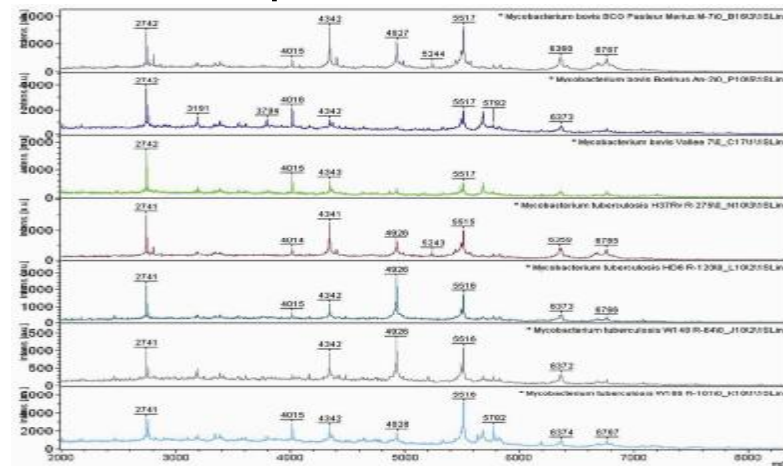
Преимущества:

1. Время проведения анализа - 20 минут
2. Достаточная чувствительность и специфичность
3. Удобство использования



Идентификация НТМБ до вида

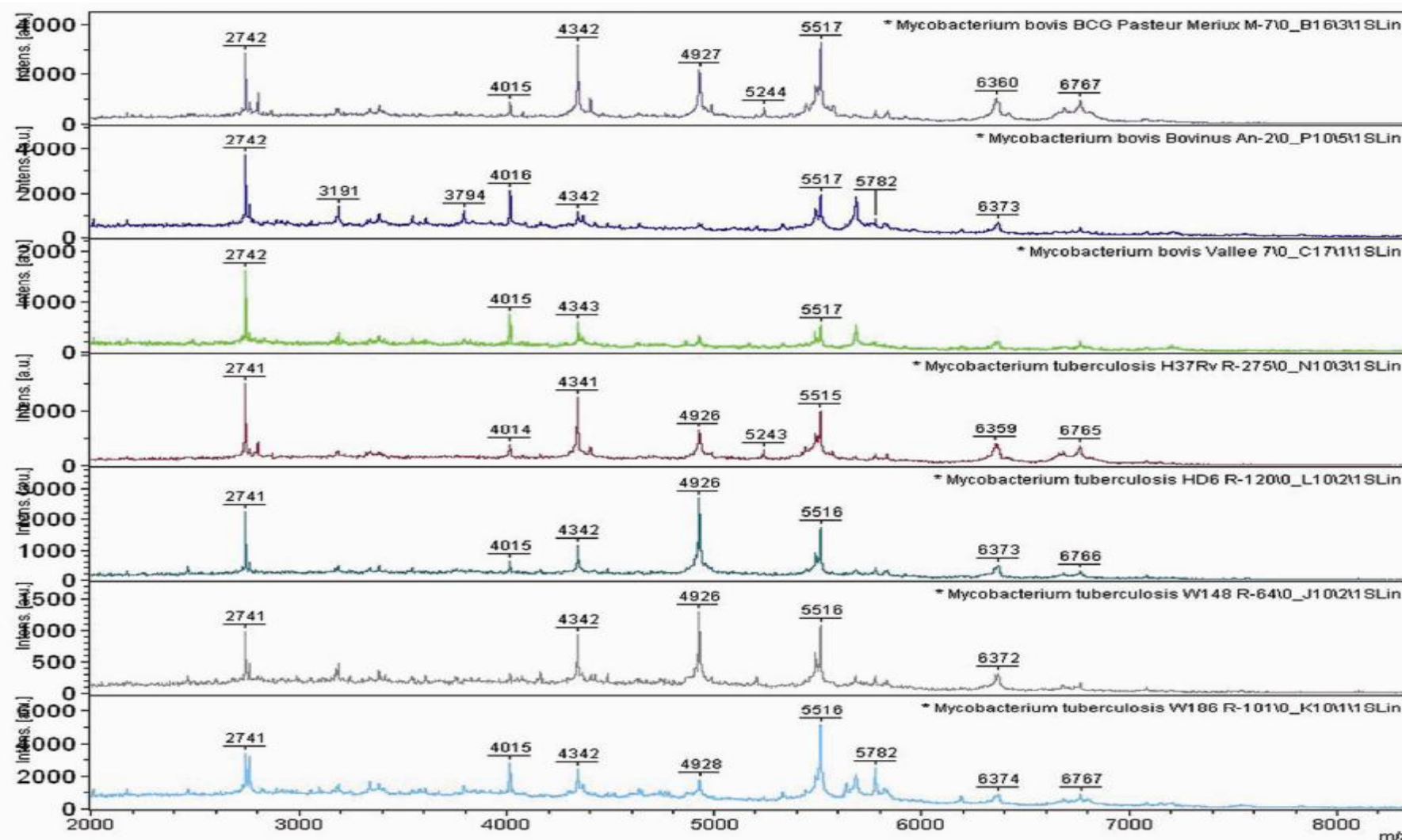
- MALDI-ToF масс-спектрометрия, позволяет получить белковые спектры, которые являются уникальными для каждого вида микобактерий.



ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



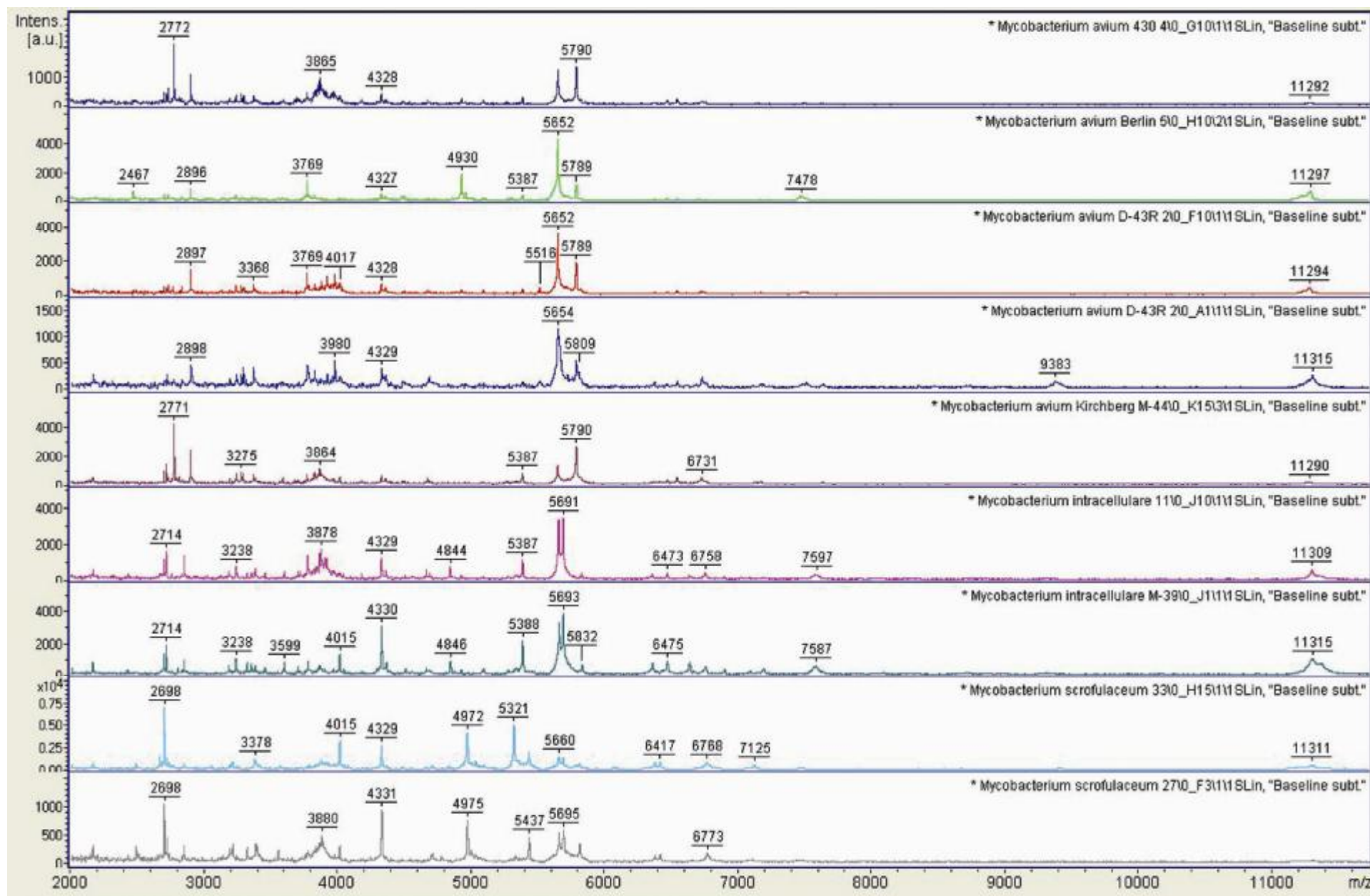
M.tuberculosis complex



ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



MAIS complex



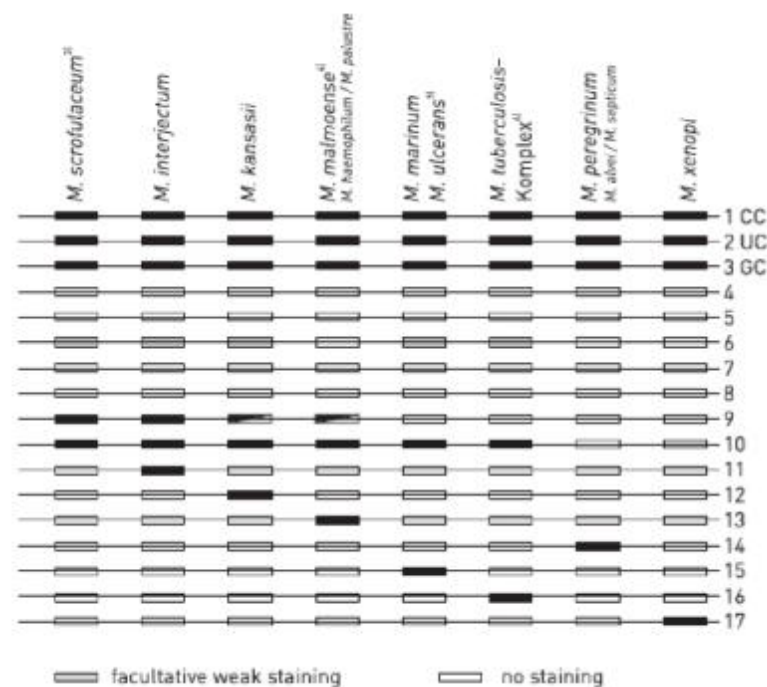
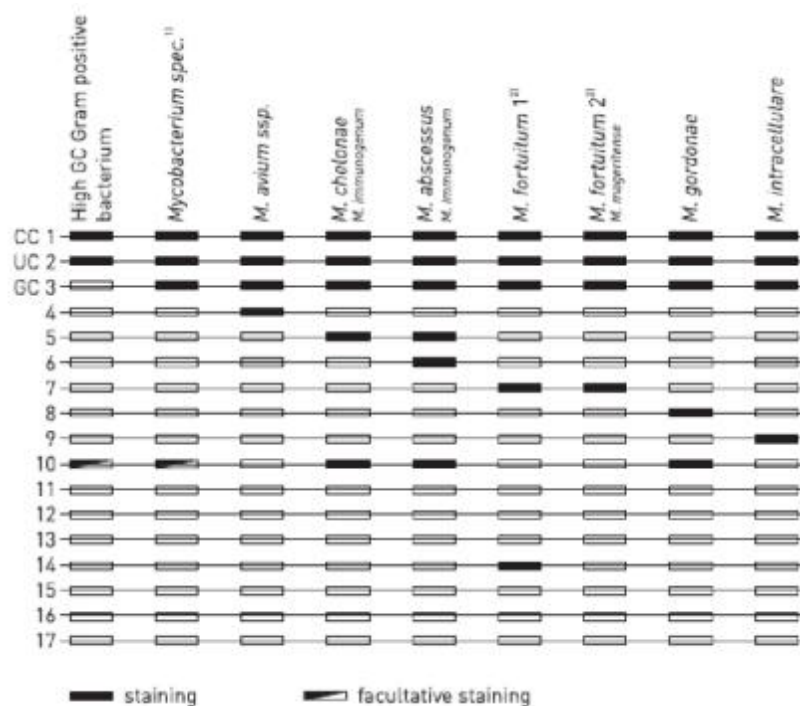
Идентификация НТМ до вида

- ДНК-стриповая технология (Hain Lifescience)
 - **GenoType® Mycobacterium CM**
 - *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* и *M. tuberculosis* complex и
 - **GenoType® Mycobacterium AS**
 - *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* и *M. shimoidei*.

Получение результата в течение 1-2 дней



Интерпретация результатов The GenoType Mycobacterium CM

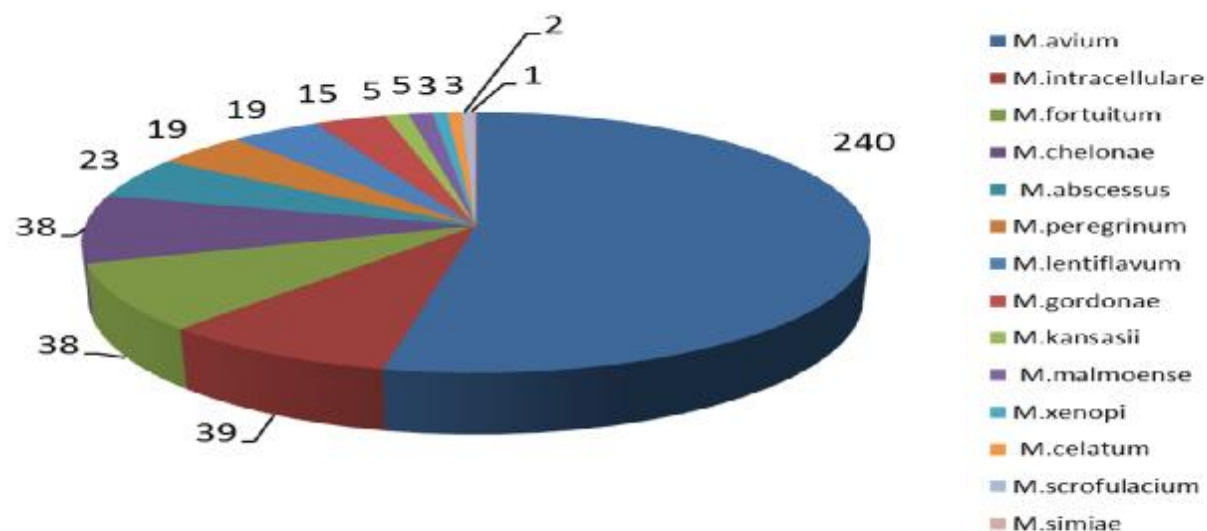
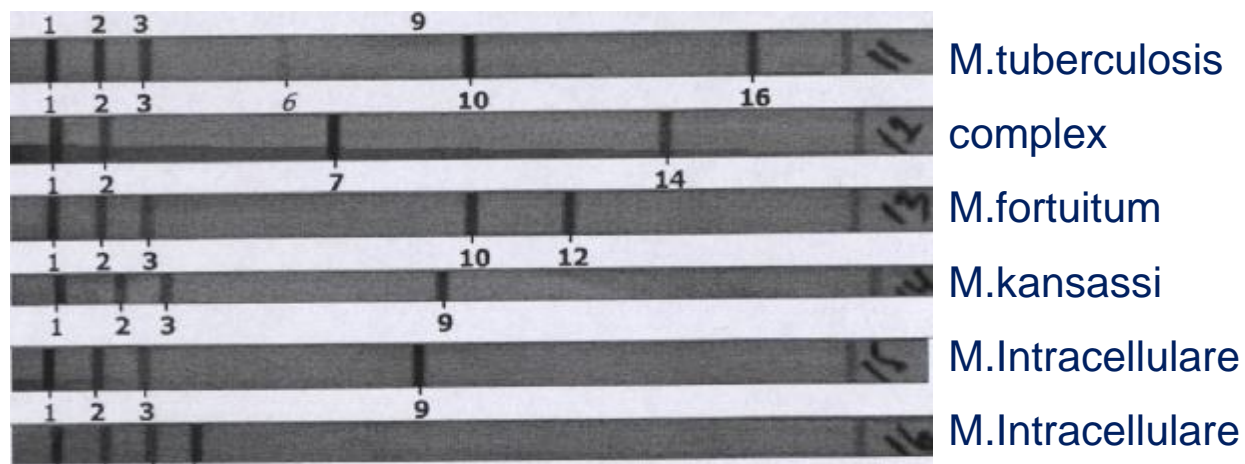


Band No. 1 (CC): Conjugate Control
 Band No. 2 (UC): Universal Control
 Band No. 3 (GC): Genus Control

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Идентификация НТМБ GenoType CM/AS (HAIN Lifescience)



450 культур НТМБ
от 359 пациентов
(2012-2014)



Определение устойчивости НТМБ

- Нетуберкулезные микобактерии резистентны к большинству противотуберкулезных препаратов.
- Важно дифференцировать микобактериозы и MDR/XDR туберкулез.
- Для определения лекарственной чувствительности НТМ применяется планшетное титрование Sensititre TREK Diag (Magellan Biosciences)



Спектр антибактериальных препаратов (Sensititre TREK Diag, Magellan Biosciences)

- **Быстрорастущие**

- Триметоприм /сульфамтоксазол
- Ципрофлоксацин
- Моксифлоксацин
- Цефоксицин
- Амикацин
- Доксциклин
- Тайгециклин
- Кларитромицин
- Линезолид
- Имипенем
- Цефепим
- Амоксициллин /клавулоновая кислота
- Цефтриаксон
- Миноциклин
- Тобрамицин

- **Медленнорастущие**

- Кларитромицин
- Ципрофлоксацин
- Стрептомицин
- Доксциклин
- Этионамид
- Рифабутин
- Этамбутол
- Изониазид
- Моксифлоксацин
- Рифампицин
- Триметоприм
- Амикацин
- Линезолид



Лечение микобактериозов

- **M.avium complex:**

1-я линия: Рифампицин, этамбутол, кларитромицин, канамицин.

2-я линия: фторхинолон, амикацин, этионамид, циклосерин, клофазамин (бисептол, сульфадиметоксин)

- Длительность 15-18 месяцев
- Ожидаемая эффективность – 50-75%



Лечение микобактериозов

- **M.kansassi**
 - **1-я линия:** рифампицин, этамбутол, изониазид, стрептомицин.
 - **2-я линия:** + фторхинолоны, линезолид
 - Длительность – 15-18 месяцев.
 - Ожидаемая эффективность – 90%



Лечение микобактериозов

- **M.fortuitum**
 - 1-я линия: кларитромицин, доксициклин, амикацин.
 - 2-я линия: фторхинолоны, имипенем,+ сульфаниламиды, 5нок.
 - Длительность – по клинико-рентгенологической динамике.
 - Ожидаемая эффективность – 50-75%



Лечение микобактериозов

- **M.marinum**
 - 1-я линия: кларитромицин, доксициклин, (моноциклин).
 - 2-я линия: рифампицин, этамбутол.
 - Длительность – 2-6 месяцев.
 - Ожидаемая эффективность – 80-100%



Лечение микобактериозов

- **M.xenopi, M.szulgary, M.malmoense, M.simiae.**
- **1-я линия:** рифампицин, этамбутол, кларитромицин, стрептомицин.
- **2-я линия:** амикацин, фторхинолон, этионамид, циклосерин, клофазамин, линезолид
- Длительность – 18-36 месяцев.
- Ожидаемая эффективность – незначительная



Диагностический минимум лабораторного обследования.

- Клинический анализ крови.
- Общий анализ мочи.
- Биохимическое исследование крови.
- Анализ мокроты методом микроскопии с окраской по Циль-Нильсену (для обнаружения кислотоустойчивых микроорганизмов).



Клинический анализ крови

- Слабовыраженная анемия,
- Отсутствие выраженного лейкоцитоза (в пределах верхней границы нормы),
- Лимфопения,
- Моноцитоз,
- Незначительное ускорение СОЭ



Исследование мочи.

- Макро и микрогематурия – один из ранних признаков туберкулеза почек. (чаще интермиттирующий характер),
- Эритроцитурия без лейкоцитурии (ранние стадии туберкулеза почек),
- Моносимптомная макрогематурия – один из ранних признаков туберкулеза почки.
- Лейкоцитурия – самый частый симптом туберкулеза мочевой системы.



Биохимические тесты

Наибольшее диагностическое значение – определение активности фермента аденозиндеаминазы (АДА) в биологических жидкостях:

Для туберкулезного плеврита в экссудате:

- АДА > 35 ед/л. (чувствительность теста > 86%),

Для туберкулезного менингита в ликворе:

- АДА > 7,0 ед/л. (чувствительность теста > 92%),

Для туберкулезного асцита в жидкости:

- АДА > 40,0 ед/л. (чувствительность теста > 93%),

Для туберкулезного перикардита:

- АДА > 40,0 ед/л. (чувствительность теста > 95%),



Исследование ликвора (туберкулезный менингит)

Диагностические критерии:

- Плеоцитоз 100-300 клеток в мм³ (норма ≤ 5 кл./мкл.),
- Повышение количества белка от 0,66 до 3,0 г/л (норма = 0,2-0,4 г/л),
- Снижение сахара (норма = 2,78-3,89 ммоль/л) и хлоридов (норма = 120-128 ммоль/л.),
- Выпадение фибриновой пленки,
- Преобладание лимфоцитов (нейтрофилы не более 8%)



Серологические методы диагностики туберкулеза

- Определение противотуберкулезных антител в комплексе серологических реакций (гуморальный иммунитет):
- РНГА с туберкулином (ППД) $> 1/8$ (диагностический титр), эффективность не более 30%,
- РПК с ППД $> 17,0$ усл.ед. эффективность не более 40%,
- РГЛ с ППД $> 7,0$ усл.ед. эффективность не более 35%,
- ИФА с ППД $> 2,0$ усл.ед. эффективность не более 45%,
- Постановка пула из 4-х реакций – диагностическая эффективность не более 60%

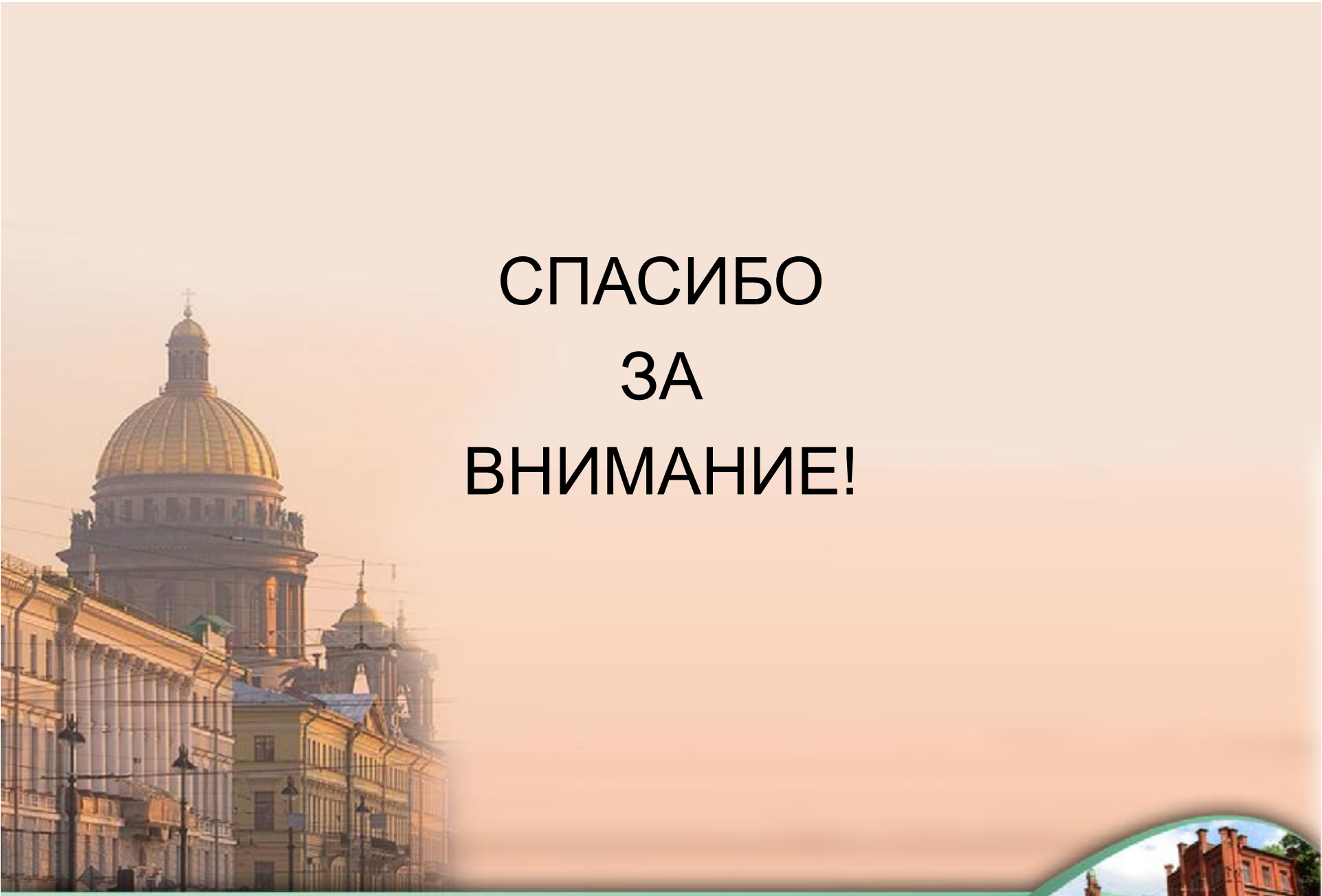


Клиническая иммунология

Оценка состояния клеточного иммунитета:

- РБТЛ с ППД $> 3,0\%$ (определяет уровень специфической сенсибилизации) диагностическая эффективность не более 40%,
- РБТЛ с ФГА $< 50,0\%$ (определяет функциональную активность лимфоцитов)
- Характерно угнетение пролиферативной активности лимфоцитов, сниженное содержание Т-хелперов, повышенное содержание В-лимфоцитов, нормальное число цитотоксических клеток, увеличение экспрессии HLA-II⁺ антигенов и рецепторов к IL-2





СПАСИБО
ЗА
ВНИМАНИЕ!

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

