

GeneXpert

План:

- Введение
- Мультирезистентный туберкулез
- Особенности мультирезистентного туберкулеза
- GeneXpert при туберкулезе
- Заключение
- Список литературы

Мультирезистентный туберкулез

это наиболее опасная форма туберкулеза, при которой микобактерии туберкулеза становятся устойчивыми как минимум к двум наиболее важным противотуберкулезным препаратам: изониазиду и рифампицину. Мультирезистентный туберкулез распространяется так же, как и обычный туберкулез.

При заражении устойчивыми к лекарствам микобактериями развивается мультирезистентный туберкулез, который характеризуется рядом особенностей течения и лечения.

Особенности мультирезистентного туберкулеза

Микобактерии при мультирезистентном туберкулезе обладают большей вирулентностью, следовательно:

- мультирезистентный туберкулез гораздо легче передается от больного к здоровому человеку;
- у пациентов с такой инфекцией сложнее определить, исчез ли риск передачи туберкулеза другому человеку или нет;
- мультирезистентный туберкулез требует госпитализации и изоляции на несколько месяцев;
- лечить мультирезистентный туберкулез гораздо труднее

Причины возникновения мультирезистентного туберкулеза

Мультирезистентный туберкулез возникает в результате неправильного лечения туберкулеза, а именно:

- при перерывах приема противотуберкулезных лекарств по любым причинам;
- в результате неправильно назначенного врачом лечения, или в результате самолечения, когда какой-либо противотуберкулезный препарат использовался недостаточное время или в недостаточных дозах
- из-за слишком длительного лечения туберкулеза каким-либо из противотуберкулезных препаратов;
- инфицирование мультирезистентными штаммами микобактерии туберкулеза

Лекарственная устойчивость М. Tuberculosis

- Лекарственная устойчивость МБТ – явления, созданное руками человека...(ВОЗ,1999)
- 1943 г. З. Ваксман и А.Шац открыли стрептомицин
- 1947 г. Ваксман ввел термин «Устойчивый туберкулез»

Классификация лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ

- Монорезистентные – к 1 ПТП
- Полирезистентные к 2 и более ПТП
- Множественно лекарственно устойчивые (МЛУ)
- Обширно лекарственно устойчивые (ОЛУ)
- Тотально лекарственно устойчивые (ТЛУ)

Проблемы устойчивости МБТ

ЛУ МБТ у больных с МБТ + различных групп:

- ...более чем у 50% впервые выявленных больных туберкулезом лёгких в мокроте выявляются ЛУ штаммы МБТ
- ...более чем у 80% больных с рецидивами туберкулеза лёгких в мокроте выявляются ЛУ штаммы МБТ
- ...практически у всех 100% больных неэффективно леченных имеется ЛУ МБТ, при этом почти в 1/3% случаев выявляются штаммы МБТ с МЛУ

Сокращение сроков

- Выявление возбудителя
- Видовой идентификации микобактерий
- Определения лекарственной чувствительности микобактерий достигается за счет применения культивирования диагностического материала на жидких средах и молекулярно-генетических методов

Инфекционный контроль должен соответствовать общим принципам, принятым для особо опасных заразных больных

1. Создание специализированных отделений или санаториев для больных туберкулезом лёгких, выделяющих ЛУ МБТ
2. Строгая изоляция и комплексное лечение этих больных до прекращения бактериовыделения
3. Строгие меры инфекционного контроля для сотрудников противотуберкулезных учреждений
4. Активная работа в очагах лекарственно-устойчивого туберкулеза лёгких и превентивное лечение контактирующих лиц

Комплексное лечение

1. Лечебное питание
2. Охранительный режим
3. Химиотерапия
4. Профилактика и лечение медикаментозных осложнений
5. Патогенетическое лечение
6. Коллапсотерапия
7. Хирургическое лечение
8. Лечение осложнений и сопутствующих заболеваний
9. Санаторное лечение
10. Медицинская и социальная реабилитация

Лечение

- Назначается 4 режим ХТ
- Коллапсотерапия (пневмоперитонеум, бронхоблокация)
- При отсутствии тенденции к закрытию полости через 2-4 месяца показана консультация хирурга
- Основной метод лечения МЛУ туберкулеза - хирургический

Длительность фаз этиотропного лечения больных туберкулезом с МЛУ

Международные рекомендации

- Интенсивная фаза - 6 месяцев, минимум 5 ПТП
- Фаза продолжения - 12 месяцев, минимум 3 ПТП

GeneXpert

Эффективность молекулярно-генетического метода **GeneXpert** МТВ/RIF для диагностики туберкулеза

Молекулярно-генетические методы диагностирования туберкулеза – совокупность современных методов диагностики, благодаря которым сокращаются длительные диагностические мероприятия и проводится выявление и определение МКБ в исследуемом материале с высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет распознать МКБ и определить их чувствительность к лекарственному препарату. ольшую популярность в современных условиях стала приобретать внедренная система GeneXpert. Сама тест-система GeneXpert представляет собой полуколичественную гнездовую ПЦР, реакция проводится в картридже, для определения ДНК микобактерий туберкулеза в образцах мокроты. Также при помощи GeneXpert диагностики выявляются мутации устойчивости к рифампицину в тех образцах, получают от пациентов, у которых возможен риск развития устойчивости к данному лечебному препарату. Современная диагностическая система GeneXpert – это система закрытого типа, все диагностические мероприятия – определение, выделение проводят в одноразовом картридже, за счет чего предварительной обработки исследуемого материала не требуется, а это позволяет по максимуму избежать контаминации этого материала. По многочисленным клиническим исследованиям устойчивость к рифампицину обычно взаимосвязана с устойчивостью и к изониазиду, а это требует проводить полный диагностический тест к препаратам 1 — 2 ряда. Диагностика проводится только после выделения микобактерий туберкулеза. Затем результат диагностики обрабатывается на ПК и проясняет клиническую картину для решения вопросов лечения данного больного.

- К недостаткам этого метода исследования относится тот факт, что определить устойчивость возбудителя возможно только к одному препарату рифампицину, а это ведет к необходимости дальнейшей диагностики, чтобы определить мультирезистентность. Недостатком есть то, что для исследования возможно только использования мокроты и в современном мире ведутся работы, чтобы обеспечить возможность применения других биологических материалов, метод диагностики является достаточно дорогостоящим удовольствием, из-за этого имеет свои ограничения. Чаще всего такой метод проводят для обследования населения такой группы: ***ВИЧ инфицированные, лица, который имели тесный контакт с туберкулезным больным и ранее пролеченные больные***

Но, в тоже время, такой метод пользуется популярностью и преимущественно выделяется среди других за счет того, что процесс диагностики занимает по времени всего 2 часа, специфичность метода достигает 100%, для пациентов с положительным мазком мокроты высокая чувствительность – до 98%.

Проведение такого метода диагностики требует минимальный уровень навыков, т.к. проводится все в закрытом картридже нет необходимости выделять отдельную комнату для проведения диагностики. К недостаткам этого метода исследования относится тот факт, что определить устойчивость возбудителя возможно только к одному препарату рифампицину, а это ведет к необходимости дальнейшей диагностики, чтобы определить мультирезистентность.

Этот метод применяют в лабораториях 2 — 3 уровней для того, чтобы быстро определить и выявить МБТ, для своевременной изоляции и лечения больного. Такой современный метод диагностики туберкулеза позволяет улучшить качество, своевременность выявления и лечения туберкулеза в стране. На сегодняшний день, далеко не все лаборатории имеют систему GeneXpert, поэтому в рамках общегосударственной социальной программы по борьбе с туберкулезом, планируется полное оснащение лабораторий такой современной диагностической системой.

Чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов бактериологического, микроскопического методов и молекулярно-генетического метода GeneXpert MTB/RIF

Результаты	Название исследования					
	Бактериологическое		Микроскопическое		GeneXpert MTB\RIF	
	туберкулез	пневмония	туберкулез	пневмония	туберкулез	пневмония
Положительный результат	30	0	15	0	29	0
Отрицательный результат	0	10	15	10	1	10

GeneXpert

Одним из молекулярно-генетических методов выявления МБТ в мокроте является GeneXpert MTB/RIF, который обеспечивает быструю одновременную диагностику туберкулеза и устойчивости к рифампицину. GeneXpert MTB/RIF использует метод полуколичественной гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, проводимой *in vitro*.

Система Genexpert MTB/RIF одобрена Всемирной организацией здравоохранения и реомендована для применения во всех странах мира как скрининговый тест выявления туберкулеза. В Украине применение Genexpert MTB/RIF проводится с 2012 года и в комплексе со скопией мазка мокроты и бактериологическими методами

Цель исследования

Изучить эффективность применения Genexpert MTB/RIF в выявлении микобактерий туберкулеза в мокроте у больных с новыми случаями заболевания и рецидивами туберкулеза легких путем сопоставления с положительными результатами скопии мазка и культуры.

Материалы и методы исследования

Проведен анализ 90 амбулаторных карт больных с положительными результатами определения МБТ в мокроте методом ПЦР с помощью Genexpert MTB/RIF. Все больные проходили обследование в Коммунальном учреждении «Запорожский областной противотуберкулезный клинический диспансер»

Результаты исследования

Среди 90 больных, включенных в исследование, с новыми случаями было 55 пациентов и с рецидивами туберкулеза – 35 пациентов. Мужчин было 77 (85,5%), женщин – 13(14,5%). Средний возраст составил 38,0

Стандартный 2 Международные стандарты медицинской помощи больным туберкулезом утверждает, что все пациентов с подозрением на туберкулез легких должны представить не менее двух образцов мокроты для бактериологического исследования. Когда это возможно, по крайней мере одного утреннего образца должны быть получены, ка мокроты, собранных на данный момент имеет самый высокий урожай.

Хpert MTB/RIF анализ может быть применен к мокроте или концентрированного осадка мокроты готовили из индуцированных или отхаркиваемой мокроты, которые либо кислотоустойчивых микобактерий мазок положительный или отрицательный тест предназначен для использования с образцами от пациентов, у которых есть клиническое подозрение на туберкулез легких, которые имеют: 1) не получили противотуберкулезные терапии, 2) было менее 7 дней терапии, или 3) не получили лечение в течение последних 60 дней.

1. Отхаркивается образцы мокроты

Примечание: процесс ровно столько образцов в одно время, так как есть Genexpert системы Dx модули, доступные для выполнения теста.

- На каждом Xpert MTB/RIF картридж с соответствующим идентификатором экземпляра
- Передача 1,0 мл мокроты отхаркивается к конической, с завинчивающимися крышками трубки с помощью стерильной пипетки передачи. Кроме того, весь образец могут быть обработаны в оригинальной герметичной контейнер забора мокроты

- Добавить 2,0 мл Xpert MTB/RIF образец реагента (2:1, об/об) в отхаркиваемой мокроты помощью стерильной пипетки передачи
- Замените крышку и встряхнуть трубку энергично 10-20 раз. Кроме того, смесь может быть встряхивали (30сек)
- Позвольте трубку стоять в течение 5 мин при комнатной температуре
- Встряхните трубка энергично 10-20 раз. Кроме того, использование вихря (30сек)
- Позвольте трубку стоять еще 10 мин при комнатной температуре
- Проверка образцов: Образцы должны быть сжиженный без видимых сгустков мокроты

2. Концентрированный осадков

Примечание: процесс ровно столько образцов в одно время, как есть Genexpert системы Dx модули, доступные для запуска тестов.

- На каждом Xpert MTB/RIF картридж с соответствующим идентификатором экземпляра
- Передача 1,5 мл Xpert MTB/RIF образец реагента конические, завинчивающимися крышками трубки с помощью стерильной пипетки передачи

- Добавить по крайней мере, 0,5 мл концентрированного осадка для образца содержащего реагента трубки с помощью стерильной пипетки передачи
- Замените крышку и встряхнуть трубку Vigorously 10-20раз. Кроме того, использование вихря (30 сек)
- Позвольте трубку стоять в течение 5 мин при комнатной температуре
- Встряхните трубка энергично 10-20 раз. Кроме того, использование вихря (30 сек)
- Позвольте трубку стоять еще 10 мин при комнатной температуре
- Проверка образцов образцы должны быть сжиженный без видимых сгустков мокроты

3. Загрузка Xpert MTB/RIF картридж

Обратите внимание: начало тегов в течение 30 минут после пробы в картридже

- Проверьте этикетки на Xpert MTB/RIF – картридж и образца ID
- Откройте крышку картриджа
- С помощью стерильной пипетки передачи при условии, аспирации сжиженного образец в передачи пипетки, пока мениск выше минимальной отметки и передачи пипетки, пока мениск выше минимальной отметки и передачи образцов в открытый порт Xpert MTB/RIF картриджа

Примечание: внесите медленно, чтобы
минимизировать риск образования аэрозоля

- Закройте крышку картриджа

4. Начало испытаний

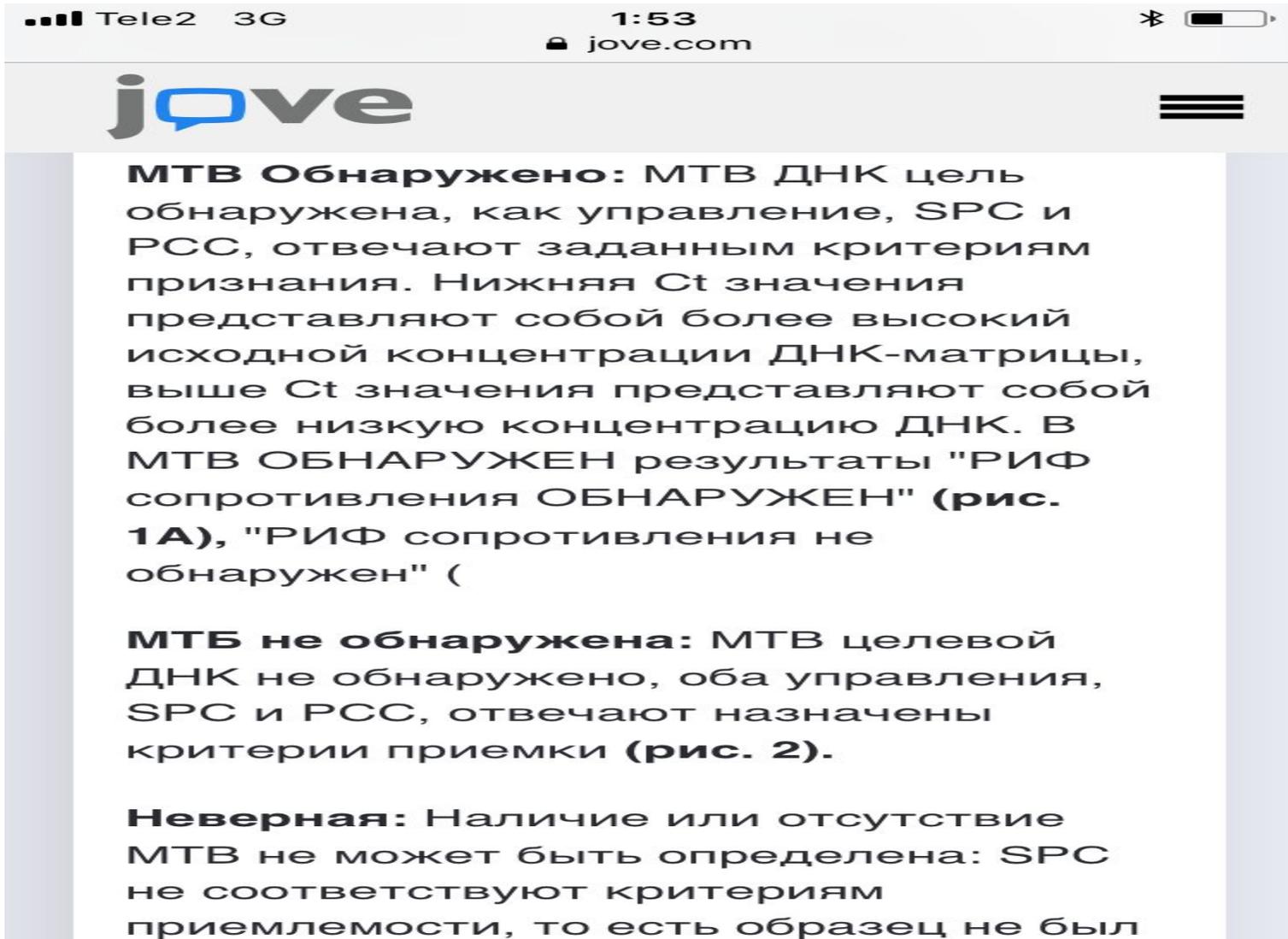
Примечание: перед началом теста, убедитесь, что система GeneXpert Dx оснащен GX2/1 программного обеспечения, и Xpert MTB/RIF анализа импортируется в программу

- Включите компьютер, а затем включить прибор GeneXpert F Dx
- На рабочем столе дважды щелкните ярлык GeneXpert F Dx значок

- Вход в систему GeneXpert Dx программного обеспечения с использованием имени пользователя и пароля
- В системе окно GeneXpert Dx, нажмите кнопку **Создать тест. Штрих-код сканирования картриджа** появляется диалоговое окно.
- В поле **ID примера**, сканирование или введите образец ID
- Сканирование штрих-кодов на Xpert MTB/RIF картриджа. В окне **Создать тест**

- Нажмите кнопку **Пуск испытаний**
- Откройте дверь, приборного отсека с мигающий зеленый свет, и загрузить картридж
- Закройте дверь. Тест начинается и перестанет мигать и остается постоянно зеленый. Когда тест закончен, свет выключается.
- Подождите, пока система не освобождает замок в конце хода, откройте двери и модуль удаления картриджа
- Утилизация использованных картриджей в соответствующие контейнеры для отходов в соответствии со стандартной практикой вашей организации

5. Представитель результаты



Tele2 3G 1:53 jove.com

jove

МТВ Обнаружено: МТВ ДНК цель обнаружена, как управление, SPC и PCC, отвечают заданным критериям признания. Нижняя Ct значения представляют собой более высокий исходной концентрации ДНК-матрицы, выше Ct значения представляют собой более низкую концентрацию ДНК. В МТВ ОБНАРУЖЕН результаты "РИФ сопротивления ОБНАРУЖЕН" (рис. 1А), "РИФ сопротивления не обнаружен" (

МТВ не обнаружена: МТВ целевой ДНК не обнаружено, оба управления, SPC и PCC, отвечают назначены критерии приемки (рис. 2).

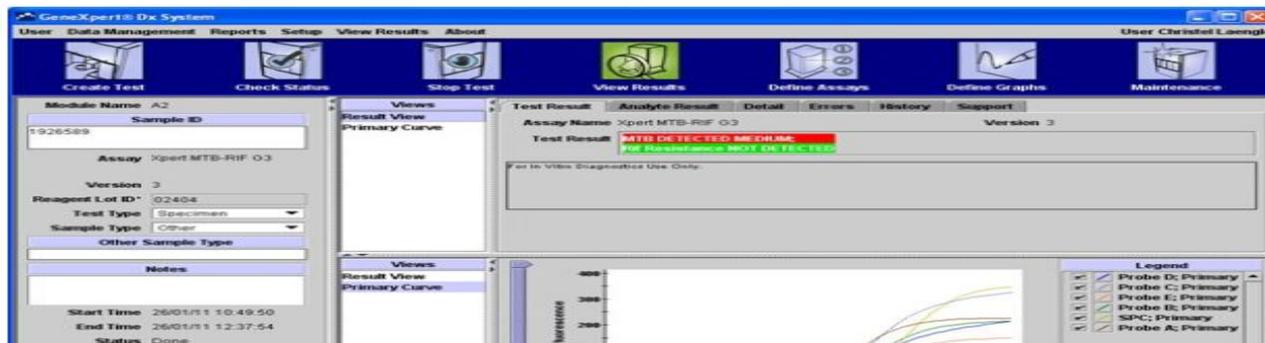
Неверная: Наличие или отсутствие МТВ не может быть определена: SPC не соответствуют критериям приемлемости, то есть образец не был

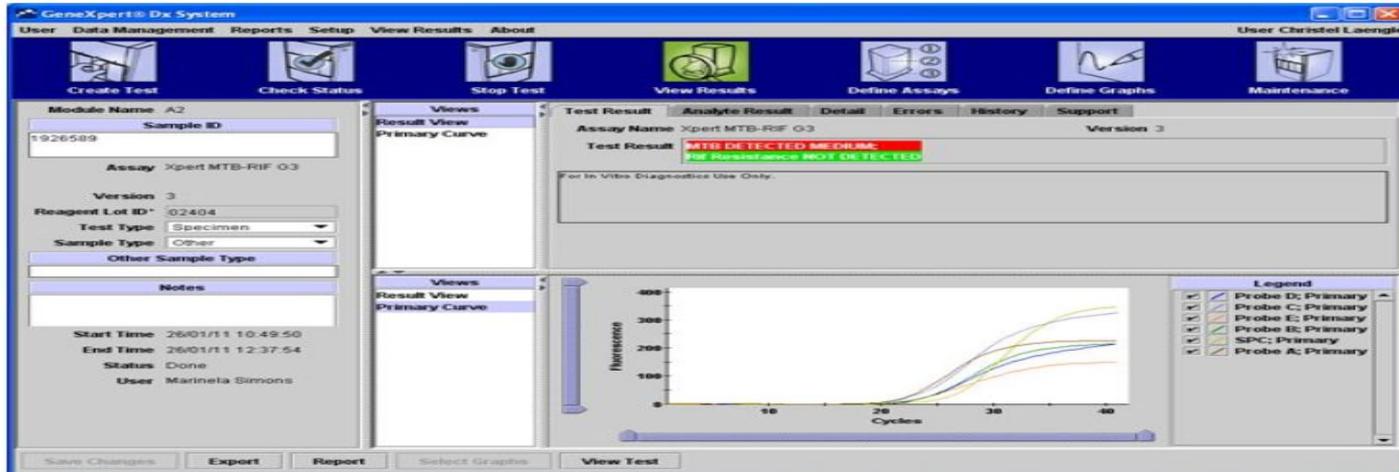
Неверная: Наличие или отсутствие МТВ не может быть определена: SPC не соответствуют критериям приемлемости, то есть образец не был должным образом обработан, или ПЦР подавляется (**рис. 3**). Примечание: повторный тест с дополнительным образца!

Ошибка: один или несколько результатов удалось PCC (FAIL). И МТВ и SPC отображения результата нет. Примечание: повторный тест с дополнительным образца! Если прошло PCC (PASS), ошибка вызвана отказом компонентов системы.

Рисунок 1: МТВ целевой ДНК обнаруживается, как управление, SPC и PCC, отвечают заданным критериям признания. Нижняя Ct значения представляют собой более высокий исходный Концентрация ДНК-матрицы,

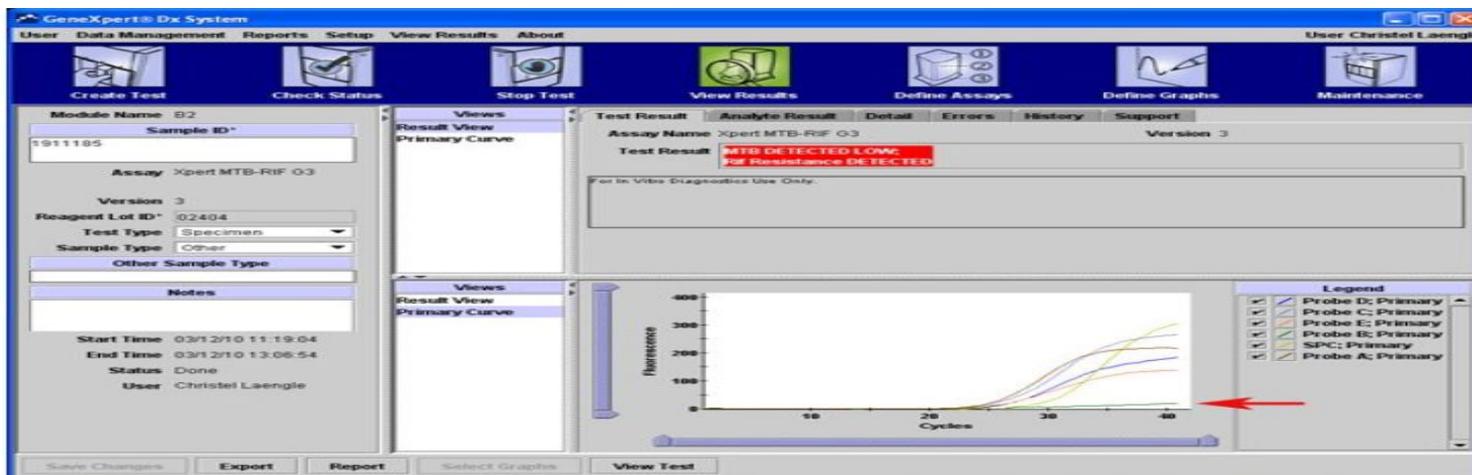
Рисунок 1: МТВ целевой ДНК обнаруживается, как управление, SPC и PCC, отвечают заданным критериям признания. Нижняя Ct значения представляют собой более высокий исходный Концентрация ДНК-матрицы, более высокие значения Ct представляет собой низкую концентрацию ДНК. В МТВ ОБНАРУЖЕН результаты "РИФ сопротивления не обнаружен" (рис. 1А), «РИФ сопротивления ОБНАРУЖЕН" (рис. 1В), или "РИФ сопротивление неопределенный" будет отображаться на отдельной линии.





На рис. 1А МТВ обнаружены; РИФ сопротивления не обнаружено, то есть только дикий тип нуклеиновой кислоты из 81-ВР РИФ сопротивления определения региона (RRDR) гена *groB* присутствовало ⁶. [Нажмите здесь, чтобы увеличить рисунок](#) .





На рис. 1В МТВ обнаружены; РИФ сопротивления обнаружено. Заполните бросают Probe В (стрелка), которая охватывает позиции 513 до 517 R RDR гена *groV*.⁶ В, например, частичное секвенирование показало, что ген мутации *groV* D516V было обнаружено 8. [Нажмите здесь, чтобы увеличить рисунок](#) .

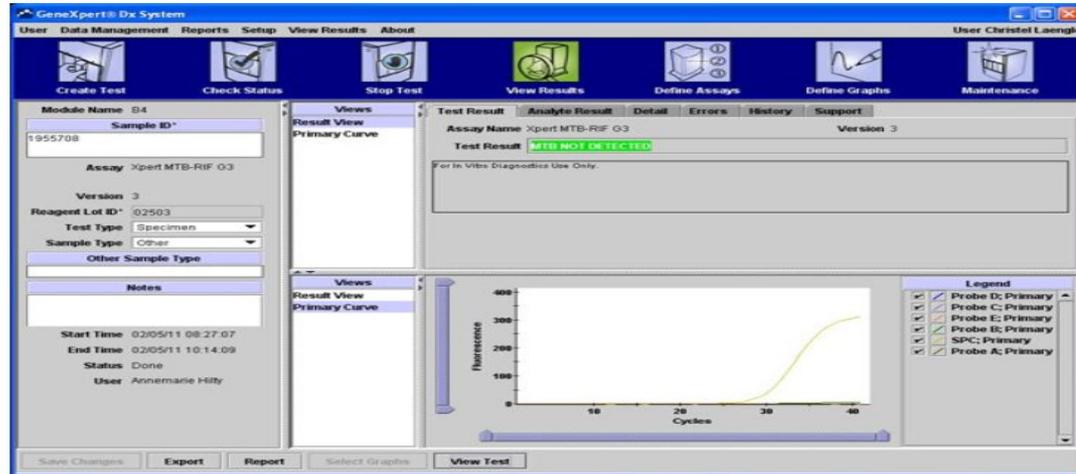
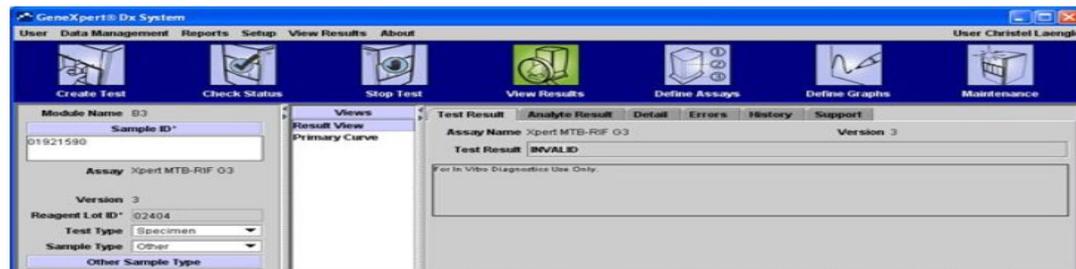


Рисунок 2 МТВ целевой ДНК не была обнаружена,.. И управления, SPC и РСС, отвечают заданным критериям принятия [Нажмите здесь, чтобы увеличить рисунок](#) .



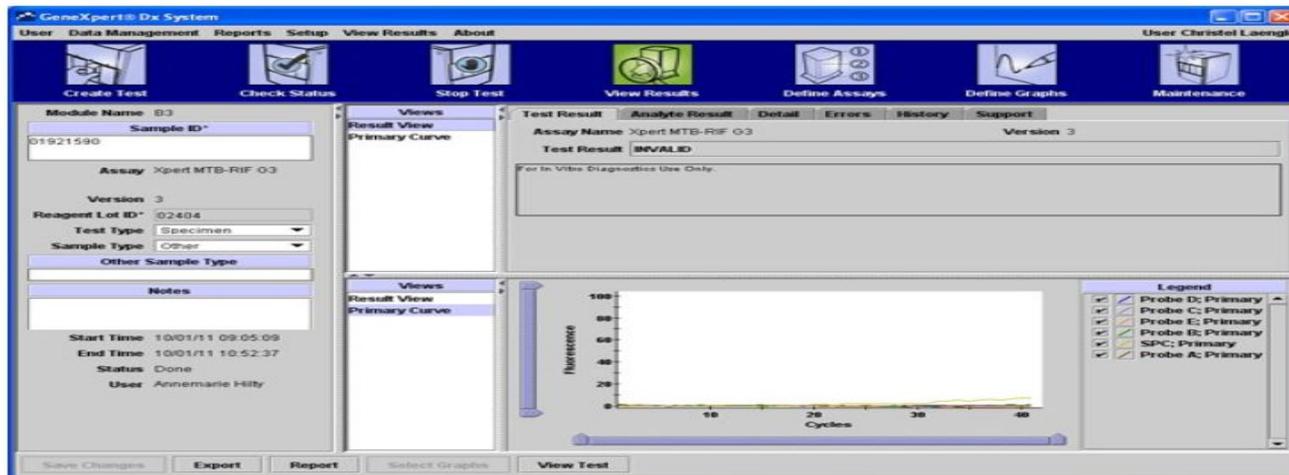


Рисунок 3. Неверный результат теста, то есть наличие или отсутствие MTB не может быть определена: SPC не соответствуют критериям приемлемости, поскольку выборка не была должным образом обработана, или потому, что ПЦР было законсервировано.3547fig3large.jpg "целевых =" _blank "> Нажмите здесь, чтобы увеличить цифру.

Заключение.

Молекулярно-генетический метод GeneXpert MTB/RIF является эффективным и быстрым методом диагностики туберкулеза. Высокая эффективность метода GeneXpert MTB/RIF доказана в обеих группах и составила не менее 97,5 %. Являясь полностью автоматизированным методом, он помогает обеспечить должный уровень биологической безопасности персонала, проводящего исследования на туберкулез. Метод позволяет быстро, за 2 часа, выявить ДНК *M. tuberculosis* в биологическом материале, а также установить наличие лекарственной устойчивости микобактерии к рифампицину. Результаты лекарственной устойчивости к Rif, полученные бактериологическим методом и методом GeneXpert MTB/RIF, сопоставимы. Вследствие этого возможно произвести раннюю своевременную коррекцию схемы химиотерапии.

Список литературы

1. Егоров А.М., Сазыкин Ю.О.//Антибиотики и химиотерапия. -2000.-Т45.№5.-С. 3-5.
2. Скрягина Е.М., Гуревич Г.Л., Зюзиков В.Ф. // В кн.: 11-ый Национальный конгресс по болезням органов дыхания. М., 2000. – С.361
3. Google chrome