

Новые возможности в диагностике ТБ и МЛУ/ШЛУ- ТБ

Сагальчик Е.

СНРЛ Гаутинг, Германия

Алматы, Казахстан
26-27 апреля, 2018



*Стоит только попристальнее
вглядеться в настоящее,
будущее вдруг выступит само
собой.*

А. Тоголь

Источники информации

FIND Because diagnosis matters

ABOUT ▾ PORTFOLIO ▾ TOOLS & SUPPORT ▾ PARTNERSHIP ▾ INFO CENTRE ▾

FOR RESEARCHERS & DEVELOPERS

- Overview
- Dx Pipeline Tracker
- Target product profiles
- Technology scouting & review
- Samples & reference materials
- Clinical trial platforms
- Support for Success

FOR IMPLEMENTERS & POLICYMAKERS

- Overview
- Implementation resources
Training materials, job aids, SOPs, implementation guidance
- Online trainings
- Negotiated product pricing
- *SIMplicity*
Global SIMs for global health

FOR ADVOCATES

- Resources for advocates
- Factsheets

TUBERCULOSIS

FIND manages several collections, including its own and two for WHO, of well-characterized TB specimens for use by researchers, developers and manufacturers of TB diagnostics. Providing access to these specimens serves to support the development and evaluation of new and existing tools to improve TB diagnosis. Sample types range

- Inactivated strains for assessment of LOD and dynamic range
- Sputum
- Urine
- Plasma
- Serum
- PAX gene tubes
- PBMC

Molecular Developers Toolset

Samples

TUBERCULOSIS
Diagnostics Technology Landscape
5th Edition, May 2017

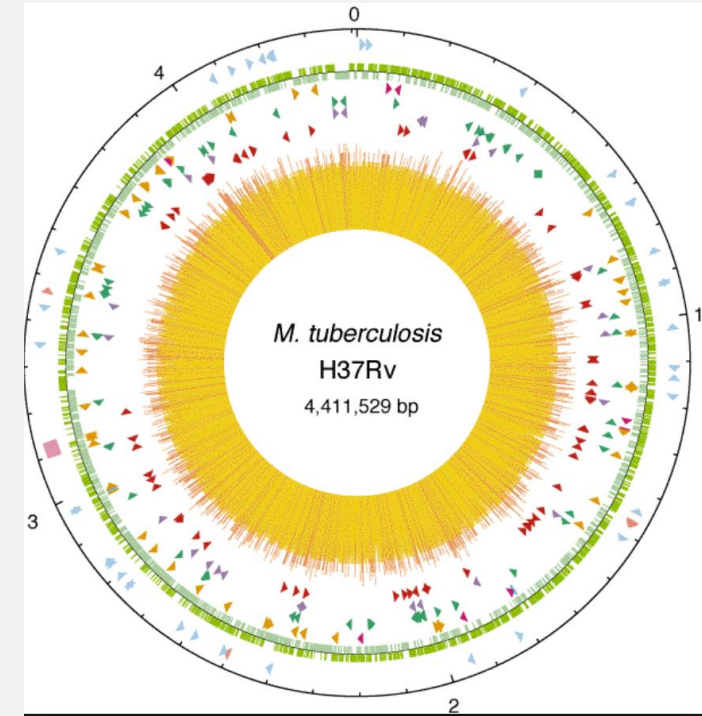
Unitaid
Innovation in Global Health

Технологии лабораторной диагностики

ФЕНОТИП



ГЕНОТИП



Автоматическая микроскопия

Signature Mapping Medical Sciences Inc.
(USA)

TBDx system

- Системы окраски мазков
- 50-200 мазков ФМ за 5 минут
- Результаты сопоставимы с результатами опытных микроскопистов



Автоматическая микроскопия



QuantuMDx (UK)

Capture-XT™

Концентрация клеток:

- 10мкл камера
- Специфический захват МБТ (патент)
- Визуализация – микроскопия

Время - 45 мин (1 микротеста)

Q-ROC™ платформа

- *Технология молекулярного подтверждения МБТ и ТЛЧ*

Транспортировка образцов



OMNIgene® SPUTUM DNA Genotek Inc. (Canada)

- Первичная обработка образца
- Без холодной цепи
- До 8 суток – до 40°C
- SSM, Сх, NAATs

Непал:

- контаминация с 12% до 2%
- высеваемость выросла на 9%

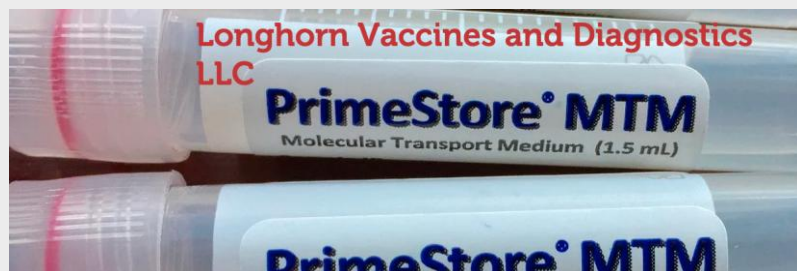
Мультисайтное исследование

Транспортировка образцов

PrimeStore[®] Molecular Transport Medium (PS-MTM) Longhorn Vaccines and Diagnostics LLC (USA)

- Обработка и обработка образца до ДНК
- Стабилизация ДНК до 28 суток
- Совместимы с NAATs системами

В процесс сертификации



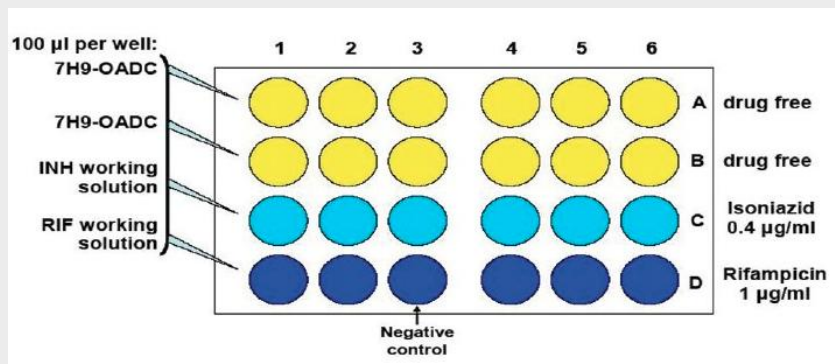
Культуральные исследования

BACTEC™ MGIT™ - BD (USA);
BacT/ALERT® 3D - bioMérieux (France);
Mycolor TK platform Salubris (Turkey)

Некоммерческие тесты

Microscopically observed drug susceptibility (MODS) assays

- Рост МБТ
- ТЛЧ 1/2 ряд
- Результат на 14 день (MGIT - 23 сутки)



Молекулярные диагностические тесты

Тип метода	Уровень лаборатории	Производительность	Диагностика	Сложность	Цена	Цена 1 теста
Point of care (POC) diagnostic tests/ экспресс тесты POC	3,2,1	С/Н	ТБ, ТЛЧ	Н	С/Н	Н
Modular NAATs/ Модульные NAATs	3,2,1	С	ТБ, ТЛЧ	В	Н	С
Microarrays/ Микрочипы	3,2	С	МТБ/НТМ, ТЛЧ	В	Н	Н/С
LPAs/ методы молекулярной гибридизации с типоспецифическими зондами	3,2	С	МТБ/НТМ, ТЛЧ	С	С	С
Automated batched PCR/ Автоматизированные закрытые ПЦР системы	3	В/С	МТБ/НТМ, ТЛЧ	В	В	Н
Open PCR platforms/ Открытые ПЦР платформы	3	С	МТБ, ТЛЧ	В	В	Н
NGS/ Секвенирование нового поколения	3	В	МТБ/НТМ, ТЛЧ, эпидемиология	В	В	С

Автоматизированные закрытые ПЦР системы

Преимущества:

- Автоматизация
- Невысокие требования к персоналу
- Быстрый результат
- Минимальный риск кросс-контаминации
- Альтернатива культуральным тестам

Автоматизированные закрытые ПЦР системы

Abbott Molecular (USA)

- **m2000sp:**

ПЦР МБТ из мокроты, БАЖ и осадка

- **RealTime MTB assay:**

MTBC и MTB RIF/INH

- **MaxRatio** (технология Abbott):

анализ и интерпретация результатов

94 образца за 7 часов (от подготовки проб до выдачи результатов)

Аналитич.чувствительность: 17 cfu/mL



Автоматизированные закрытые ПЦР системы

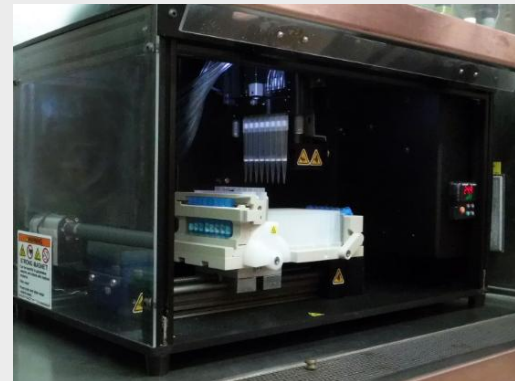
Akonni Biosystems (USA)

- **TruTip® Automated Sample Prep Workstation:**

Выделение ДНК/РНК из клинич.образцов
(мокрота, БАЖ, ткани, стул)

Может использоваться для других методов (LPA,
ПЦР, электрофорез, изотермические методы
амплификации, microarrays)

- Обработка одновременно 8 образцов
- Установка в БББ



Автоматизированные закрытые ПЦР системы

Hain Lifescience (Germany)

- **FluoroType[®] MTB** (real-time PCR)

Детекция ДНК МБТ

Аналитич.чувствительность: 15 cfu/mL

- **FluoroType[®] MTBDR**

Детекция ДНК МБТ и RIF/INH

Аналитич.чувствительность: 20 cfu/mL

До 96 тестов за 3 часа



- **M(X)DR-TB assay** (в разработке)

RIF, INH, AMGs и FLQs в 1 тесте (+PZA assay)

Автоматизированные закрытые ПЦР системы

BD (USA)

В разработке

- **Multiplexed real-time PCR**

Детекция МБТ

- **BD MAX™**

Генотип MTB RIF/INH

До 24 образцов мокроты одновременно

(планирование - 72 образца за 8 часов)



Автоматизированные закрытые ПЦР системы



Roche Diagnostics (Switzerland)

В разработке

Real-time PCR:

- **COBAS® MTB**
- **COBAS® MAI Mycobacterium avium infection**
- **COBAS® RIF/INH Test**

До 960! тестов за 8 часов

Автоматизированные
закрытые ПЦР
системы

Проблемные вопросы:

- Высокие требования к инфраструктуре
- Высокая стоимость оборудования
- Нет рекомендаций ВОЗ

Открытые ПЦР платформы

Преимущества:

- Низкая стоимость
- Универсальны по оборудованию

Проблемные вопросы:

- Практически нет информации о показателях производительности и клинических исследованиях в рецензируемой литературе
- Нет рекомендаций ВОЗ

LPAAs/
методы
молекулярной
гибридизации с
типоспецифиче-
скими зондами

Возможности:

- Диагностика ТБ
- Видовая идентификация МБ (МВТС/NTM)
- Генотип 1-2 ряд ПТП
- 1 проба
- Культура МБТ / КУБ+мокрота

LPAAs/
методы
молекулярной
гибридизации с
типоспецифиче-
скими зондами

Рекомендации ВОЗ:

Hain Lifescience (Germany)

- GenoType[®] MTBDRplus v2.0
- GenoType[®] MTBDRsl v2.0
- Mycobacterium CM/AS

NIPRO Corp. (Japan)

- NTM+MDRTB Kit 2

Валидируются:

**MolecuTech REBA MTB-MDR[®] (YD
Diagnostics)**

**TB Resistance Module INH/RIF FLQ AMG
(AID)**

LRAAs/
методы
молекулярной
гибридизации с
типоспецифиче-
скими зондами

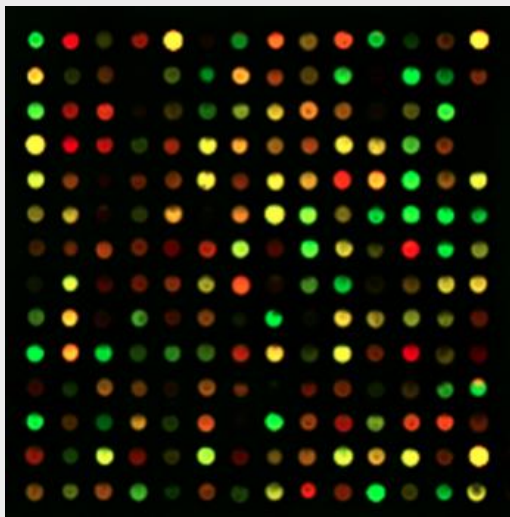
Преимущества:

- Относительно низкая стоимость
- Результат 1-2 дня
- Рекомендации ВОЗ

Проблемные вопросы:

- Высокие требования к инфраструктуре и персоналу
- Не оптимальная чувствительность

Microarrays/ Микрочипы



Альтернатива быстрым методам

Ассиметричная ПЦР + принцип
гибридизации

Возможности:

- Диагностика ТБ
- Видовая идентификация МБ
- Генотип ТВ/MDR-ТВ

Microarrays/ Микрочипы

Beijing Capital Biotechnology Ltd (China) GeneChip:

- Mycobacterial Species Identification Array Kit (MTB/NTM)
- M. tuberculosis Drug Resistance Detection Array Kit (INH/RIF)

Результат через 6 часов

Аналитич.чувствительность: 1000 cfu/mL

Цена US\$ 21-25

Microarrays/ Микрочипы

Akonni Biosystems (USA)

- платформа TruDx[®] 2000 + TruTip[®]
- тест система TruArray[®]

Мокрота и осадок

*Многообещающие результаты в программе NIH
На испытаниях в Китае, Перу, Молдове и
Мексике*

Аналитич.чувствительность: 32 cfu/mL (Перу)



Microarrays/ Микрочипы

Veredus Laboratories (Singapore)

- платформа VerePLEX™ Biosystem
- тест система VereMTB™ Detection Kit
MTB/NTM; INH/RIF

КУБ+ мокрота и культура МБТ

Результат через 2 часа для 5 образцов



Microarrays/ Микрочипы

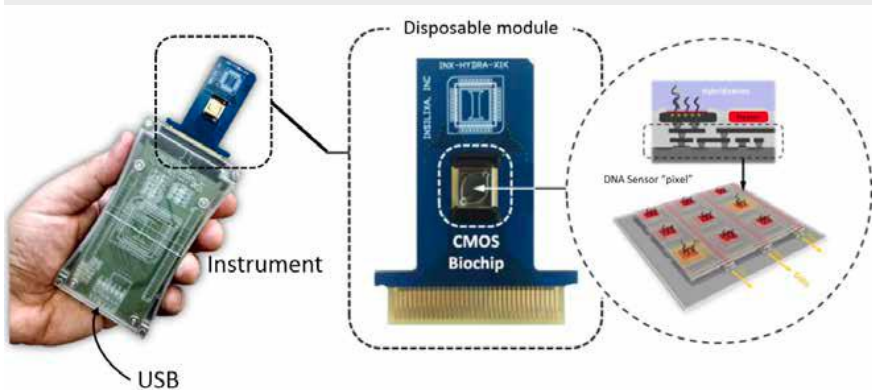
InSilixa Inc (USA) и Stanford University (USA)

- платформа Hydra-1K

Технология бесконтактной цифровой обработки изображений (CMOS)

INH/RIF/FLQ – по детекции 120 мутаций

Выход на рынок – через 1-2 года



Microarrays/ Микрочипы

Преимущества:

- Возможна большая достоверность, чем у LPA методов
- Больше зондов и контролей для 1 образца
- Низкая стоимость оборудования

Недостатки:

- Низкая пропускная способность по количеству тестов
- Необходимо дополнительное оборудование для чтения результатов
- Ограниченная информация в рецензируемой литературе
- Нет рекомендаций ВОЗ

Modular NAATs/ Модульные системы NAATs

Полная автоматизация при
тестировании

Возможности:

- Диагностика ТБ
- Детекция МТВС
- Генотип ТВ/MDR-ТВ

Cepheid Inc. Xpert[®] МТВ/RIF

Tosoh Bioscience (Japan)

Modular NAATs/ Модульные системы NAATs



Cepheid Inc. Xpert® MTB/RIF Ultra

- Повышение чувствительности и специфичности метода
- Детекция смешанных аллелей (гетерорезистентность)

Цена для стран из списка FIND –

US\$ 9.98

План – XDR-TB: INH, FLQ, AMG (на испытаниях)

Modular NAATs/ Модульные системы NAATs



Tosoh Bioscience (Japan)

- Чувствительность 87%
Специфичность – 98%
- Аналитич.чувствительность: 30-50 cfu/mL

До 8 тестов одновременно

Весь процесс 1,5 часа

Используется в Японии и Европе

Нет информации; по ценам,
стабильности реагентов и
сертификации технологии

Modular NAATs/ Модульные системы NAATs

Преимущества:

- Высокая чувствительность теста
- Невысокие требования к квалификации сотрудника
- Результат в день тестирования
- Рекомендации ВОЗ Xpert®

Недостатки:

- Невысокая пропускная способность по количеству тестов
- Высокая коммерческая цена

NAATs для перифери- ческих центров

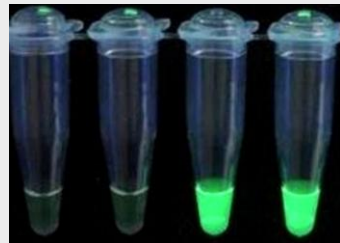
Уровень: микроскопические
лаборатории BSL-1

Возможности:

- Диагностика ТБ
- Детекция МТВС
- (Генотип ТБ/MDR-ТБ)

LAMP (Loop mediated Isothermal
Amplification)

NAATs для перифери- ческих центров



**Eiken Chemical Corp. (Japan) +
HUMAN Diagnostics Worldwide (Germany):**

Loopamp™ MTBC Detection kit

- 20 исследований в 17 странах
 - Чувствительность –
77-80% (общая), 95%
(SSM+)
 - Специфичность – 97-98%
 - *Результат: 40 мин + 45 мин*
- 1 тест – € 7-8*
Оборудование - €2450

NAATs для
перифери-
ческих центров

Genedrive[®] MTB/RIF assay –

Epistem Ltd (UK) - *rpoB*

Truenat[™] MTB / Truenat[™] MTB-RIF -

Molbio Diagnostics (India)

EasyNAT[™] TB assay - Ustar Biotechnologies
(China)

Tangen Biosciences (USA)

GeneXpert[®] Omni - Cepheid Inc. (USA)

(Xpert[®] MTB/RIF assay and Xpert[®] Ultra MTB/RIF)

Q-POC[™] - QuantuMDx Group (UK)

TBDx system - KGI (USA)

Scanogen (USA)

NAATs для перифери- ческих центров

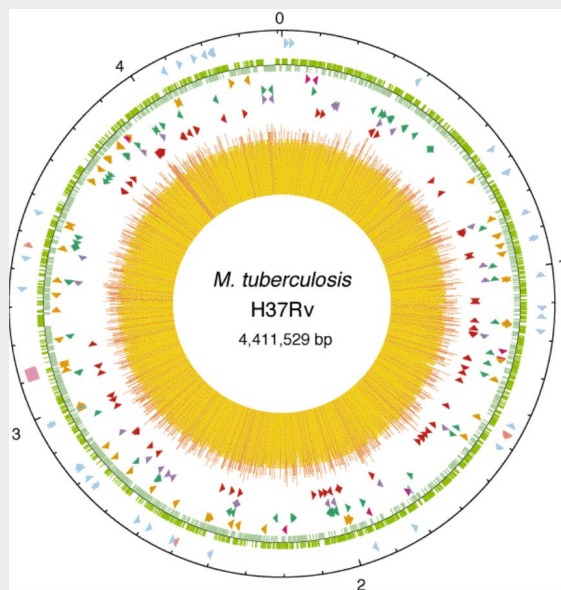
Преимущества:

- Доступность
- Невысокие требования к квалификации сотрудника
- Результат в день тестирования
- Рекомендации ВОЗ для TB-LAMP

Недостатки:

- Невысокая пропускная способность по количеству тестов
- Нет рекомендаций ВОЗ

Секвенирование: NGS



Множественные тесты из 1 образца:

- ✓Выявление МТБ
- ✓Генотипирование лекарственной устойчивости
- ✓Молекулярная эпидемиология

Цена платформ: *US\$ 80 000—>750 000*

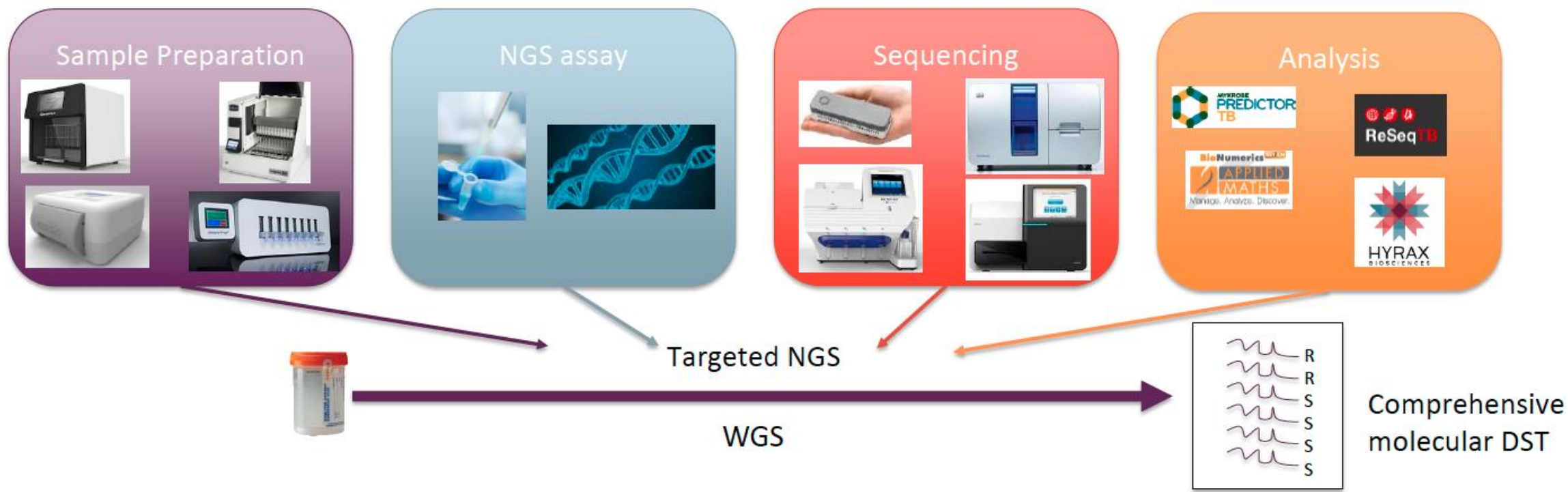
Цена за *Giga base* (млн пар оснований):

US\$ 41–2000

Секвенирование: NGS

- Bio-Rad Laboratories (GnuBio);
- Illumina (MiSeq, HiSeq and NextSeq);
- Oxford Nanopore (minION, PromethION, GridION);
- PacBio (Sequel and RS2);
- ThermoFisher (SOLiD, S5, personal genome machine [PGM], Proton);
- Qiagen (GeneReader);
- Vela Diagnostics NGS platform (Singapore)
- Genalysis[®] (DNAe)
- Gene Electronic Nano-Integrated Ultra-Sensitive (GENIUS)
- Genia sequencer (Genia Corporation)

Секвенирование: NGS



Секвенирование: NGS

Достоинства :

1. Диагностика ТБ
2. Генотипирование лекарственной устойчивости (мутации)
3. Эпидемиология (вспышки, межрегиональные кластеры резистентности)
4. Выявление гетерорезистентности
5. Количественный анализ
6. Анализ всего генома или отдельных участков
7. Высокое совпадение с существующими методами (выявление/ТЛЧ ~ 93%)
8. Время/затраты (около 5 дней)

Секвенирование: NGS

Проблемные вопросы:

- Ограниченное использование
- Стоимость
- Выявление и анализ новых генотипов резистентности к ПТП
- Унификация результатов тестов разных производителей
- Обеспечение качества исследований

Направления разработок

- Полная автоматизация
- Максимальное качество
- Минимальное время
- Минимальная инфраструктура

Вопросы для размышления

- Персонал?
- Лаборатории?

Спасибо за внимание!



Алматы, Казахстан
26-27 апреля, 2018