

ТУБЕРКУЛЁЗ И БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ

*TUBERCULOSIS
AND LUNG DISEASES*

12

2014

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ
ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА
К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ РЕЗЕРВНОГО РЯДА:
ФТОРХИНОЛОНАМ, АМИКАЦИНУ И КАПРЕОМИЦИНУ**

Ю. С. АЛЯПКИНА^{1,2}, Я. И. АЛЕКСЕЕВ¹, Д. А. ВАРЛАМОВ¹, Л. В. ДОМОТЕНКО³, Л. К. ШИПИНА²,
М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ²

**DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR TECHNOLOGY
FOR THE RAPID DETECTION
OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTANCE
TO RESERVE ANTITUBERCULOSIS DRUGS:
FLUOROQUINOLONES, AMIKACIN, AND CAPREOMYCIN**

YU. S. ALYAPKINA^{1,2}, YA. I. ALEKSEEV¹, D. A. VARLAMOV¹, L. V. DOMOTENKO³, L. K. SHIPINA²,
M. A. VLADIMIRSKY²

¹НПФ «Синтол»,

²НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова»,

³НИИ прикладной микробиологии Роспотребнадзора РФ, г. Москва

На основе технологии ПЦР в реальном времени с использованием системы оригинальной конструкции аллель-специфичных, меченных флуорофорами праймеров, комплементарных к последовательности гасителя флюоресценции, разработаны метод и опытные образцы тест-системы для быстрого определения ДНК мутаций микобактерий туберкулеза (МБТ), ответственных за лекарственную устойчивость к препаратам резервного ряда: группы фторхинолонов, амикацину и капреомицину. При использовании молекулярно-генетической тест-системы «Амплитуб-МЛУ-РВ» с целью исследования лекарственной чувствительности исследованы образцы мокроты 68 больных с деструктивным туберкулезом легких, длительно лечившихся препаратами 1-го и 2-го рядов (53 пациента). В 51 (75%) случае эти пациенты выделяли МБТ с МЛУ. Все полученные образцы ДНК МБТ были также исследованы на обнаружение лекарственной устойчивости к фторхинолонам, амикацину и капреомицину как с использованием разработанного метода и опытного набора реагентов, так и с помощью традиционного культурального исследования. При использовании молекулярно-генетического анализа был установлен 90%-ный уровень чувствительности исследования при 96%-ной специфичности.

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, туберкулез, препараты резервного ряда.

Based on a real-time PCR technology using an original-design system of allele-specific, fluorophore-labelled primers complementary to the sequence of a fluorescence quencher, the authors developed a method and test system prototypes for the rapid determination of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) DNA mutations responsible for resistance to reserve anti-TB drugs, such as fluoroquinolones, amikacin, and capreomycin.

To study drug susceptibility, an Amplitube-MDR-RV molecular genetic test system was used to investigate sputum smears from 68 patients with destructive pulmonary tuberculosis who had been long treated with first- and second-line drugs (53 patients). These patients excreted multidrug-resistant MBT in 51 (75%) cases. All obtained MBT DNA samples were also examined for resistance to fluoroquinolones, amikacin, and capreomycin, by employing both the developed method and prototype reagent kits and by conventional culture methods. Molecular genetic analysis established that the study had a sensitivity of 90% and a specificity of 96%.

Key words: drug resistance, tuberculosis, reserve antituberculosis drugs.

Распространение лекарственной устойчивости микроорганизмов является одним из самых больших вызовов системе здравоохранения в новом тысячелетии. Эффективным ответом может быть быстрое развитие и применение новых лабораторных технологий, основанных на достижениях современной молекулярной биологии [6]. Несмотря на снижение заболеваемости туберкулезом, в России отмечается неуклонный рост числа штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), т. е. с устойчивостью к наи-

более эффективным препаратам – рифампицину и изониазиду, выделяемых даже у впервые выявленных, ранее не леченных больных туберкулезом. Общие принципы управления для противодействия распространению лекарственной устойчивости при туберкулезе, изложенные в инструктивных материалах Международного противотуберкулезного союза 2013 г., рекомендуют широкое применение ускоренных культуральных методов определения лекарственной чувствительности МБТ, а также новых быстрых методов, основанных на молекуляр-

но-генетических тестах, позволяющих определять мутации ДНК, связанные с возникновением лекарственной устойчивости [3]. Список этих мутаций, ассоциированных с устойчивостью к конкретным противотуберкулезным препаратам, в основном установлен.

В 2006-2009 гг. представителями НПФ «Синтол» совместно с коллегами из НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» разработаны и внедрены тест-система «Амплитуб-МЛУ-РВ» (№ ФСР 2010/07636), лабораторная технология экспресс-определения лекарственной устойчивости клинических штаммов МБТ к изониазиду и рифампицину, основанная использовании мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР в реальном времени (АС-ПЦР-РВ) для определения основных мутаций ДНК возбудителя, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к этим препаратам. Показано высокое совпадение (94-99%) результатов молекулярно-генетической диагностики с данными общепринятых культуральных исследований [1].

В связи с широким применением противотуберкулезных препаратов резервного ряда или препаратов так называемой 2-й линии возникла угроза распространения штаммов МБТ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), т. е. устойчивых, помимо рифампицина и изониазида, также и к препаратам резервного ряда – фторхинолонам и по крайней мере к одному из инъекционных антибиотиков аминогликозидного или полипептидного ряда. Решению задачи экспресс-определения лекарственной устойчивости к этим препаратам 2-й линии посвящена настоящая работа.

Материалы и методы

Штаммы и образцы

Сотрудниками Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии предоставлен 31 клинический изолят *Mycobacterium tuberculosis*, полученный от ранее леченных больных и охарактеризованный в отношении устойчивости к фторхинолонам. 19 клинических изолятов, устойчивых к амикацину и/или капреомицину, получены из лаборатории микробиологии Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии и бактериологической лаборатории Нижегородского областного противотуберкулезного диспансера. Также исследованы образцы мокроты 122 больных, проходивших стационарное лечение в клинике НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова». Из них 53 больных получали лечение фторхинолонами, в основном левофлоксацином, в течение 2-3 мес.

Микробиологические методы исследования

Для образцов мокроты проводили первичное культивирование с помощью стандартной системы Bactec в лаборатории НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова. После получения роста

и идентификации МБТ культуры передавали в лабораторию Института прикладной микробиологии (г. Оболенск Московской обл.), где проводили дальнейшее исследование лекарственной чувствительности к препаратам офлоксацину, капреомицину и амикацину на плотных питательных средах методами пропорций и абсолютных концентраций.

Пробоподготовка и выделение ДНК

Пробоподготовку образцов и выделение ДНК осуществляли с помощью набора реагентов для выделения ДНК «МСорб-Туб» (ЗАО «Синтол») в зависимости от вида образца в соответствии с инструкцией к набору.

Выявление МБТ и определение лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду методом ПЦР-РВ

Все выделенные образцы ДНК анализировали с помощью набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол») с целью идентификации и дифференциации по количественному содержанию клеток МБТ. Отобранные по количественному критерию образцы использовали для анализа на лекарственную устойчивость. Лекарственную устойчивость к рифампицину и изониазиду определяли методом ПЦР-РВ с помощью тест-системы «АмплиТуб-МЛУ-РВ» (ЗАО «Синтол»).

Проведение аллель-специфичной ПЦР-РВ (АС-ПЦР-РВ) для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, капреомицину и амикацину

Для проведения исследования на участке гена *gyrA* (GeneBank L27512) были выбраны флюоресцентный линейный зонд FAM-*gyrA*_up (FAM - TC GGC TCG CCA GGC AAT GAC CCA - RTQ2) типа TaqMan, не содержащий мутаций, прямой и обратный праймеры *gyrA*-F (CGC AGC TAC ATC GAC TAT GCG A) и *gyrA*-R (CGG GCT TCG GTG TAC CTC AT) и соответствующие аллель-специфичные праймеры к кодонам 88, 90, 91 и 94 AL и ALm. Из последовательности гена *rrs* (GeneBank NC_000962) были выбраны: флюоресцентные линейные зонды типа TaqMan R6G-*rrs*527_up (R6G – TT CCG GAC AAC GCT CGC ACC CTA CG - BHQ2), R6G-*rrs*1452_up (R6G – TCG CCG ATC CCA CCT TCG ACA GCT C – BHQ2), не содержащие мутаций, прямые *rrs*-F1 (CGG GTT CTC TCG GAT TGA CGG), *rrs*-F2 (CCC TTG TGG CCT GTG TGC) и обратные праймеры *rrs*-R1 (GCC CGC ACG CTC ACA GTT A), *rrs*-R2 (TGA TCC AGC CGC ACC TTC C) и соответствующие аллель-специфичные праймеры к заменам 514, 517, 1105, 1239, 1401, 1402, 1484 AL и ALm.

Праймеры и зонд были синтезированы фосфитамидным методом на олигонуклеотидном синтезаторе ASM102U (Россия, г. Новосибирск) с использованием реактивов ЗАО «Синтол» (Россия,

г. Москва) и очищены в ПААГ и с помощью ВЭЖХ. Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл включала: 2,5-кратную реакционную смесь, содержащую $MgCl_2$ и dNTP, (ЗАО «Синтол», Россия), 5 пмоль соответствующего зонда, 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. Hot-Rescue Taq-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК.

Постановку АС-ПЦР-РВ осуществляли согласно инструкции на приборе АНК-32 (ИАП, г. Санкт-Петербург, Россия). Температурный протокол АС-ПЦР-РВ: 95°C – 5 мин, 50 циклов: 62°C – 50 с, 95°C – 20 с. Результаты ПЦР-РВ регистрировались автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором АНК-32. Интерпретацию результатов осуществляли согласно принципу АС ПЦР.

Проведение мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ

Отобранные в ходе анализа частоты мутаций аллель-специфичные праймеры к кодонам 90 и 94 гена *gyrA M. tuberculosis* и заменам 514, 517, 1401, 1402 гена *rrs M. tuberculosis* синтезировали с различными флюорофорами на 5'-конце. 3'-меченные праймеры-гасители были выбраны согласно комплементарности аллель-специфичным праймерам для кодонов 90 и 94 гена *gyrA* [RTQ-*gyrA*90 (CGTCGCCGTGCGG–BHQ2), RTQ-*gyrA*94 (GTAGATCGACGCGTCC–BHQ2)] и заменам 514, 517, 1401, 1402 гена *rrs* соответственно [RTQ-*rrs*514 (GCTGGCACGTTAGTTGG–RTQ2), RTQ-*rrs*517 (GCTGCTGGCACGTTAGTT – RTQ2), RTQ-*rrs*1401 (GACGGGCGGTGTGTAC–BHQ2)].

Мультиконкурентную аллель-специфичную ПЦР в формате реального времени проводили на приборе АНК-32 (ИАП, Россия) в два этапа. На первом этапе проводили предварительную амплификацию с целью накопления специфических фрагментов генов *gyrA* и *rrs* соответственно. Температурно-временной режим амплификации: 95°C –

5 мин, 20 циклов: 66°C – 50 с, 95°C – 20 с. На втором этапе определяли лекарственную устойчивость к фторхинолонам и капреомицину/амикацину с помощью разработанных комплектов реагентов для определения мутаций в кодонах 90 и 94 гена *gyrA* и замен 514, 517, 1401, 1402 гена *rrs* соответственно. Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 2,5х-кратную реакционную смесь, содержащую $MgCl_2$ и dNTP, (ЗАО «Синтол», Россия), 5 пмоль зонда, 10 пмоль общего праймера, 5 пмоль праймера дикого типа, 10 пмоль каждого из 1-2 участвующих в данном анализе 5'-флюоресцентно-меченных аллель-специфичных праймеров, 20-30 пмоль комплементарного праймера-гасителя (из расчета 10 пмоль на каждые 10 пмоль флюоресцентных праймеров), 2,5 ед. Hot-Rescue Taq-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК. Температурный протокол ПЦР-РВ: 95°C – 3 мин, 50 циклов: 62°C – 40 с; 58°C – 40 с, 95°C – 20 с. Результаты ПЦР-РВ регистрировались автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с приборами для ПЦР-РВ.

Результаты и обсуждение

Определение частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам

Ранее установлено, что мутации, вызывающие высокую степень устойчивости к фторхинолонам, возникают на небольшом участке гена *gyrA*, кодирующего субъединицу гиразы А [2].

Для оценки частоты встречаемости мутаций в гене *gyrA M. tuberculosis*, ассоциирующихся с устойчивостью к фторхинолонам, был использован метод аллель-специфичной ПЦР-РВ, суть метода которого заключается в том, что при параллельной постановке ПЦР-РВ с праймерами, несущими замены на 3'-конце, начало роста флюорес-

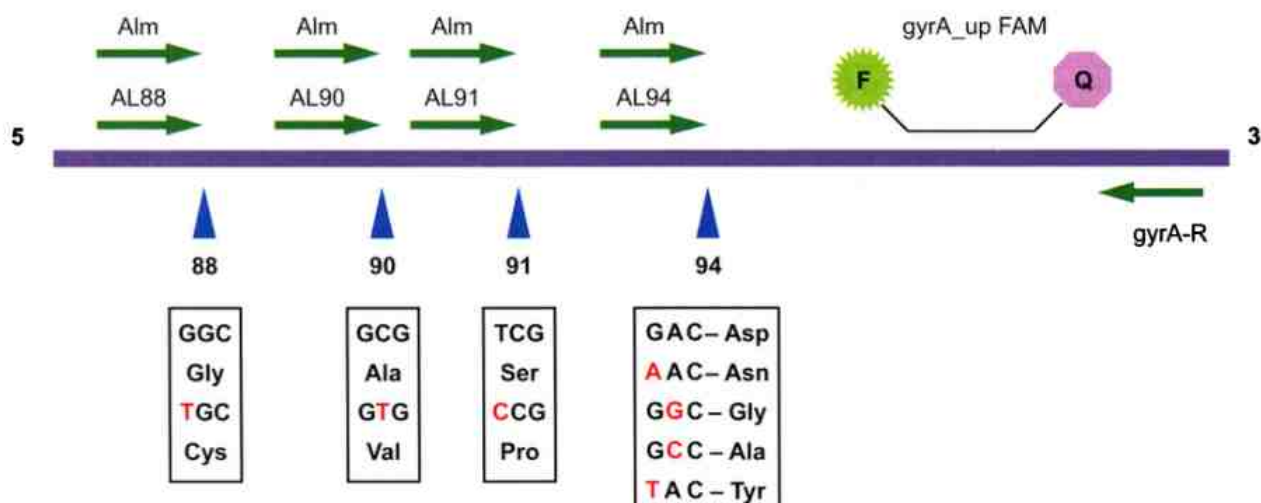


Рис. 1. Схема анализа мутаций на участке гена *gyrA M. tuberculosis* методом АС ПЦР-РВ

Таблица 1

Результаты определения мутаций на участке гена *gyrA* *M. tuberculosis* в офлаксации-устойчивых клинических изолятах

№	Образец	Мутации
1.	4146	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
2.	4379	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
3.	4966	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
4.	5157	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
5.	5563	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
6.	5573	R <i>gyrA</i> 94 Alm1 GAC-AAC (Asp-Asn)
7.	5579	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
8.	5675	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
9.	5688	R <i>gyrA</i> 94 Alm3 GAC-GCC (Asp-Ala)
10.	5693	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
11.	5829	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
12.	6049	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
13.	6170	R <i>gyrA</i> 94 Alm3 GAC-GCC (Asp-Ala)
14.	6224	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
15.	6392	R <i>gyrA</i> 94 Alm4 GAC-TAC (Asp-Tyr)
16.	6802	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
17.	1649	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
18.	1651	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
19.	1657	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
20.	1659	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
21.	1765	R <i>gyrA</i> 94 Alm3 GAC-GCC (Asp-Ala)
22.	1804	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val) R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
23.	1831	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
24.	1856	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)
25.	1913	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
26.	1915	R <i>gyrA</i> 94 Alm1 GAC-AAC (Asp-Asn)
27.	1917	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
28.	1921	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val) R <i>gyrA</i> 94 Alm3 GAC-GCC (Asp-Ala)
29.	1926	R <i>gyrA</i> 94 Alm3 GAC-GCC (Asp-Ala)
30.	1927	R <i>gyrA</i> 94 Alm2 GAC-GGC (Asp-Gly)
31.	1967	R <i>gyrA</i> 90 Alm10 GCG-GTG (Ala-Val)

ценции будет различным для разных праймеров, т. е. каждому праймеру соответствует свое значение порогового цикла, и чем меньше это значение, тем более специфичен праймер. По разнице в значениях пороговых циклов между праймером дикого типа (AL) и аллель-специфичными праймерами с соответствующими мутациями на 3'-конце (Alm) можно судить о наличии мутации в определенном образце. В качестве контрольного выступает образец без мутаций с определенными значениями порогового цикла и разницей для каждого аллель-специфичного праймера.

Для проведения исследования на участке гена *gyrA* нами были выбраны флюоресцентный зонд, не содержащий мутаций, прямой и обратный праймеры и соответствующие аллель-специфичные праймеры к кодонам 88, 90, 91 и 94 AL и Alm. Схема анализа приведена на рис. 1.

Результаты скрининга 31 офлаксации-устойчивого образца представлены в табл. 1.

Среди 31 устойчивого к фторхинолонам клинического изолята распределение мутаций было следующим:

- 8 образцов – 90 кодон Ala-Val (GCG-GTG);
- 21 образец – 94 кодоны (2 – Asp-Asn (GAC-AAC); 9 – Asp-Gly (GAC-GGC); 4 – Asp-Ala (GAC-GCC); 6 – Asp-Tyr (GAC-TAC);
- 2 образца – 90 и 94 кодоны [Asp-Gly (GAC-GGC); Asp-Ala (GAC-GCC)].

Мутаций в 88-м и 91-м кодонах гена *gyrA* не найдено. Таким образом, для обеспечения высокой диагностической чувствительности анализа были выбраны 5 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *gyrA* *M. tuberculosis*, ассоциирующиеся с устойчивостью к фторхинолонам (табл. 2). Эти мутации составили 3 комплекта реагентов для их определения с помощью метода мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Анализ мутаций с помощью мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ включает два этапа. На первом этапе проводится ПЦР-РВ с целью накопления специфического фрагмента гена *gyrA*, в котором могут содержаться мутации, ассоциирующиеся с лекарственной устойчивостью. Стадия предварительной ПЦР-РВ специально введена для повышения чувствительности и специфичности анализа. Особенно это важно при анализе клинических образцов, так как они содержат большое количество неспецифической ДНК (ДНК человека и др.). С целью предотвращения контаминации режим амплификации предварительной ПЦР-РВ специально включает только 20 циклов, при этом рост флюоресценции обычно еще не регистрируется прибором. Исследуемые образцы после постановки предварительной ПЦР-РВ разводят в тех же пробирках, и полученная смесь является исходной для дальнейшей постановки всех реакций мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Второй этап анализа включает обнаружение конкретных мутаций в определенных кодонах (90 и 94) гена

Таблица 2

Мутации в гене *gyrA* *M. tuberculosis*, выявляемые с помощью мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ

Кодоны	Замены	Число пробирок в ПЦР-РВ
90	Ala – Val GCG – GTG	1
94	Asp – Asn GAC – AAC Asp – Gly GAC – GGC Asp – Ala GAC – GCC Asp – Tyr GAC – TAC	2

gyrA, ассоциирующихся с устойчивостью к фторхинолонам.

Интерпретация результатов в методе мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ заключается в следующем [1]. Образец считается чувствительным (не имеет мутаций в данном кодоне), если рост флюоресценции наблюдается только по флюорофору гибридного зонда, который не содержит мутаций и является маркером, контролируя ингибирование реакции и наличие в образце специфического фрагмента гена *gyrA M. tuberculosis*. Образец считается устойчивым к фторхинолонам (имеет мутацию в каком-либо кодоне), если рост флюоресценции наблюдается по каналу флюоресцентного зонда и по одному или нескольким каналам на мутации.

Определение частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью к капреомицину/амикацину

По данным литературы, мутации, ассоциирующиеся с устойчивостью к амикацину, находятся в гене *rrs*, кодирующем 16S рРНК, а мутации, ассоциирующиеся с устойчивостью к капреомицину, – в гене *rrs*, кодирующем 16S рРНК, и гене *tly* [4, 5]. В соответствии с данными литературы лекарственная устойчивость к этим двум препаратам в большинстве случаев является перекрестной. Мы исследовали именно мутации гена *rrs*, так как они более изучены и чаще описаны. Оценку частоты встречаемости мутаций в гене *rrs M. tuberculosis*, ассоциирующихся с устойчивостью к капреомицину и амикацину, проводили аналогично мутациям, ассоциированным с устойчивостью к фторхинолонам, методом АС-ПЦР-РВ, как описано выше.

Для этого из последовательности гена *rrs* были выбраны: флюоресцентные зонды, не содержащие мутаций, прямые и обратные праймеры и соответствующие аллель-специфичные праймеры к заменам 514, 517, 1105, 1239, 1401, 1402, 1484 AL и Alm.

Результаты скрининга 19 бактериологически охарактеризованных в отношении устойчивости к капреомицину и/или амикацину клинических изолятов представлены в табл. 3.

В 18 образцах были найдены *rrs* мутации (замены в позициях 514, 517 и 1401). В 1 образце, устойчивом к капреомицину, мутаций в *rrs* гене не найдено. По-видимому, устойчивость здесь обусловлена другими мутациями, например *tly* гена. Таким образом, по результатам исследований с помощью АС-ПЦР-РВ и с учетом данных литературы, выбрали следующие мутации для создания комплектов реагентов на основе мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ: А514С, С517Т, А1401G.

Определение мутаций, ассоциирующихся с устойчивостью к капреомицину/амикацину, с помощью метода мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ проводится аналогично определению мутаций гена *gyrA*, как описано выше, и состоит из двух этапов:

накопления специфических фрагментов гена *rrs* и последующего определения мутаций – замен А514С, С517Т, А1401G.

Результаты сравнительных испытаний определения лекарственной устойчивости к фторхинолонам, капреомицину/амикацину в клинических образцах молекулярно-генетическим и бактериологическими методами

Сравнительные исследования осуществляли при анализе одних и тех же образцов мокроты, которые после их лизиса и получения осадков были поделены для проведения культурального исследования и молекулярно-генетического ПЦР-РВ-анализа. Первичное культивирование выполняли в жидкой питательной среде с помощью системы Bactec. После получения роста и идентификации МБТ исследовали лекарственную чувствительность полученных культур к фторхинолонам, капреомицину и амикацину на плотных питательных средах методами пропорций и абсолютных концентраций. Все клинические образцы, передаваемые для анализа молекулярно-генетическим методом, были зашифрованы сотрудниками ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Таблица 3

Результаты определения мутаций на участке гена *rrs M. tuberculosis* в устойчивых клинических изолятах

№	Образец	Мутации	Данные микробиологии
1.	554	R <i>rrs</i> C517T	AM
2.	2072	R <i>rrs</i> C517T	AM
3.	4145	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
4.	5153	R <i>rrs</i> A514C R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
5.	5155	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
6.	5293	R <i>rrs</i> A514C R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
7.	5829	мутации <i>rrs</i> не найдены	CAP
8.	5841	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
9.	6254	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
10.	6624	R <i>rrs</i> A514C R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
11.	7430	R <i>rrs</i> A514C R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
12.	11416	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
13.	11536	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
14.	11787	R <i>rrs</i> A1401G	AM
15.	12192	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
16.	12333	R <i>rrs</i> A514C R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
17.	12345	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
18.	12648	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP
19.	13615	R <i>rrs</i> A1401G	AM + CAP

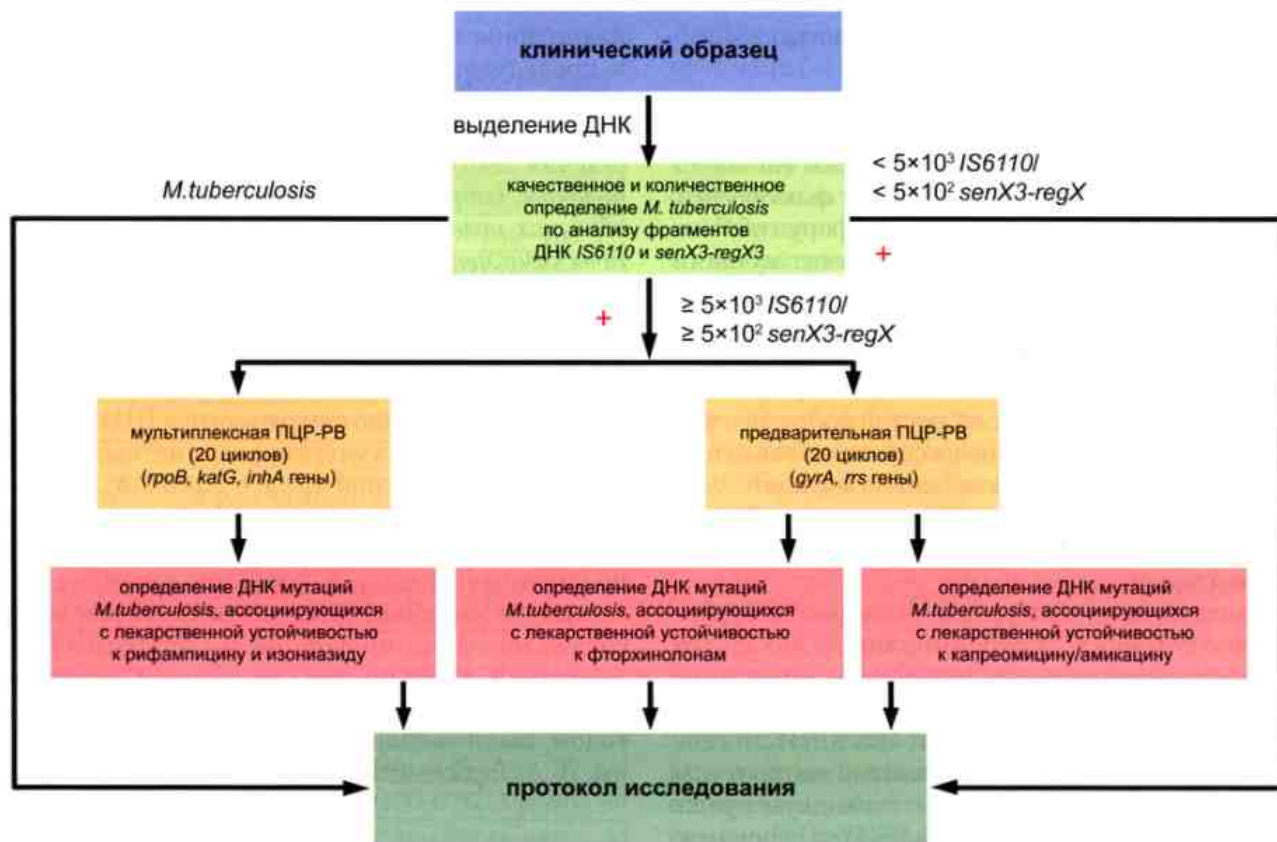


Рис. 2. Схема анализа клинического образца на наличие МБТ и определение антибиотикоустойчивости к рифампицину и изониазиду, фторхинолонам, капреомицину/амикацину с помощью метода ПЦР-РВ

Алгоритм анализа клинических образцов молекулярно-генетическим методом показан на рис. 2.

Все выделенные образцы ДНК анализировали с помощью набора реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ «АмплиТуб-РВ» (ЗАО «Синтол») с целью идентификации и дифференциации по количественному содержанию клеток МБТ. Тест-система «АмплиТуб-РВ» позволяет выявлять в образце наличие ДНК *M. tuberculosis* complex одновременно по фрагментам генов IS6110 и *regX3*.

Из 122 образцов для анализа на лекарственную устойчивость были отобраны 68 образцов с содержанием геномных копий не менее 5×10^2 в 5 мкл образца ДНК по *regX3*, что составляет не менее 100 КОЕ в 1 мл образца мокроты. Вначале с помощью молекулярно-генетической тест-системы определяли лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину с помощью ранее разработанной тест-системы «АмплиТуб-МЛУ-РВ».

Больных, выделяющих устойчивые МБТ к рифампицину и изониазиду, т. е. с МЛУ, выявлено 51 из 68 (75%). Больных туберкулезом, выделяющих МБТ с моноустойчивостью к изониазиду, – 7 (10,3%), с моноустойчивостью к рифампицину – 2 (2,9%). Число чувствительных образцов – 8 (11,8%).

МБТ, чувствительные к рифампицину и изониазиду, были также чувствительными к препаратам

2-го ряда. Из 51 образца, устойчивого к рифампицину и изониазиду, устойчивость к офлоксацину определена методом ПЦР у 22 (43,1%) пациентов, а к капреомицину/амикацину – у 25 (49%). Из 22 больных, выделяющих МБТ с устойчивостью к фторхинолонам, у 12 отмечена устойчивость и капреомицину/амикацину (54,5%), из 25 больных, выделяющих МБТ с устойчивостью к капреомицину/амикацину, устойчивость к фторхинолонам отмечена у 12 (48%) пациентов.

Таким образом, в исследуемой группе больных туберкулезом, ранее длительно лечившихся различными препаратами, выявлено 12 (23,5%) пациентов с туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) возбудителя.

Сопоставление результатов с данными традиционного культурального анализа было проведено у 49 больных. Уровень совпадений результатов определения лекарственной чувствительности между культуральными исследованиями и методом ПЦР-РВ составил: по двум типам антибиотиков (фторхинолоны и капреомицин/амикацин) – 87%; по фторхинолонам – 84,1%; по капреомицин/амикацину – 89,6%. Чувствительность анализа методом ПЦР-РВ по сравнению с культуральным составила 90% (фторхинолоны – 90%, капреомицин/амикацин – 90%), а специфичность – 98% (фторхинолоны – 96%, капреомицин/амикацин – 100%).

Выводы

На основе технологии мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР в реальном времени разработана молекулярно-генетическая тест-система быстрого определения лекарственной устойчивости к препаратам фторхинолонового ряда, а также к резервным антибиотикам: капреомицину и/или амикацину.

Проведены сравнительные исследования образцов мокроты, полученных от 68 длительно лечившихся больных туберкулезом легких, в том числе 49 больных с установленной МЛУ, в которых были использованы как разработанные на основе ПЦР-РВ методы молекулярно-генетического анализа ДНК мутаций, связанных с возникновением МЛУ и устойчивости к фторхинолонам, капреомицину/амикацину, так и традиционные культуральные исследования для фенотипического определения устойчивости к этим препаратам.

Установлен в среднем 87%-ный уровень совпадений разработанного молекулярно-генетического метода определения лекарственной устойчивости к изученным препаратам 2-й линии (фторхинолоны, амикацин и капреомицин) при высокой 98% специфичности исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирский М. А., Аляпкина Ю. С., Алексеев Я. И. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения

и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. – 2008. – № 4. – С. 38-44.

2. Cheng A. F. B., Yew W. W., Chan E. W. C. et al. 2004. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – Vol. 48, № 2. – P. 596-601.

3. Guidelines for clinical and operational management of drug-resistant tuberculosis, Paris, France, 232 p.

4. Maus C. E., Plikaytis B. B., Shinnick T. M. 2005. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – Vol. 49, № 8. – P. 3192-3197.

5. Suzuki Y., Katsukawa C., Tamaru A. et al. 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene // J. Clin. Microbiol. – Vol. 36, № 5. – P. 1220-1225.

6. van Belkum A., Dunne W. M. Next-generation antimicrobial susceptibility testing // J. Clin. Microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 7. – P. 2018-2023.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Владимирский Михаил Александрович
НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО
«Первый МГМУ им. И. М. Сеченова»
127994, г. Москва, ул. Достоевского, д. 4

Поступила 28.03.2014