

Изучение мутации и разработка метода экспресс-идентификация микроорганизмов группы *Mycobacterium tuberculosis* путем регуляторного гена *whiB7*

1Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь
2Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь и Arak Medical University, Иран

3 ГУ научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии
министерства здравоохранения, Республика Беларусь

Было проведено секвенирование регуляторного гена *whiB7* в 33 изолятах *Mycobacterium tuberculosis*. Мутаций в промоторе (429 п.о.) и в структурном гене (279 п.о.) *whiB7* как у резистентных форм изолятов *M. tuberculosis* (MDR и XDR), так и у чувствительных клинических изолятов обнаружено не было. Полученный результат является обоснованием возможности последующей разработки ингибиторов протеина *WhiB7*, эффективных против всех форм данного патогена, либо использования в целях выявления микроорганизмов группы *M. tuberculosis*. Мы применили ПЦР-набор для определения гена *whiB7* в целях обнаружения микроорганизмов группы *M. tuberculosis* в чистых культурах и в мокроте, сравнивая с 6 нетуберкулезными и 7 непатогенными штаммами микобактерий, а также с 2 контрольными штаммами.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, ПЦР, *whiB7* ген.

Республика Беларусь является одной из 18 стран, за которыми Европейское отделение ВОЗ осуществляет приоритетный контроль по туберкулезу (ТБ) в целом и одной из 25 стран приоритетного контроля по лекарственно-устойчивому (MDR и XDR) туберкулезу(1).

В 1990 году в Беларуси было зарегистрировано 3948 случаев ТБ (заболеваемость – 38 на 100000 населения), а к 2006 году этот показатель вырос до 5989 (заболеваемость 61 на 100000 населения). Смертность от ТБ в 2006 году составила 8,2 на 100000 населения в год (2,3).

Предположительная численность пациентов с MDR-ТБ в Беларуси в 2007 году составила 707 человек, при этом лечение проходили 579 больных с MDR-ТБ, 68 из них страдали XDR-ТБ (3).

Известно, что некоторые гены *M. tuberculosis* ассоциированы с лекарственной резистентностью, например: *groB* – к рифампицину, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC*, *kasA* – к изониазиду, *gprL* – к стрептомицину, *gyrA* – к фторхинолонам, *rncA* – к пиперазину, *embB* – к этамбутолу (6). Так, причиной резистентности к противотуберкулезным препаратам, включая рифампицин и изоназид, являются мутации в генах *groB* и *katG* (4).

Изониазид (гидрозид изоникотиновой кислоты) является одним из наиболее эффективных антимикробных препаратов, доступных для лечения ТБ. Чувствительность к изониазиду обусловлена образованием *M. tuberculosis* H37Rv каталазы-пероксидазы, кодируемым геном *katG*. Мутации в соответствующем локусе гена *katG* *M. tuberculosis* обуславливают большинство случаев резистентности к изониазиду. Наибольшая частота мутаций в гене *katG* *M. tuberculosis* отмечается в кодоне 315(5).

Риск развития мутаций, приводящих к лекарственной резистентности, составляет $3,32 \cdot 10^{-9}$ на одно деление клетки для рифампицина, $2,56 \cdot 10^{-8}$ для изониазида; $2,29 \cdot 10^{-8}$ для стрептомицина; $1,0 \cdot 10^{-7}$ для этамбутола. Риск одновременного развития резистентности к двум препаратам составляет менее 10^{-15} (6).

Ген *whiB7* *M. tuberculosis* рассматривает в качестве основного регулятора координирующего экспрессию семейства генов резистентности, способных инактивировать антибиотики, проникающие в цитоплазму, и таким образом определять резистентность

бактерий к лекарствам. Интересным является тот факт, что транскрипция *whiB7* саморегулируется и его экспрессия может быть индуцирована воздействием подпороговых концентраций антибиотиков в дозо- и время-зависимой манере. Делеция *whiB7* у *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* или *M. bovis-BCG* приводит к развитию чувствительности к широкому спектру гидрофильных и гидрофобных антибиотиков, которые не связаны друг с другом ни по функции, ни по химической структуре (многим макролидам, линкозамидам, хлорамфениколу, имипинему, пристинамицину, рифампицину, стрептомицину, спектиномицину и терациклину) (7-8).

Таким образом, поскольку всего один регуляторный белок (*WhiB7*) обуславливает резистентность микобактериальных патогенов ко множеству препаратов, компоненты системы *whiB7* могли бы служить оригинальной мишенью для воздействия лекарств (т.е. новых противотуберкулезных препаратов), что позволило бы повысить чувствительность *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к ним и обеспечить клинически эффект(7,9).

Целью настоящего исследования являлось определение вероятного возникновения мутаций в промоторе и структурном гене *whiB7* чувствительных, MDR и XDR клинических изолятов *M. tuberculosis*, а также изучение возможности применения ПЦР-анализа гена *whiB7* в качестве нового метода экспресс-идентификации микроорганизмов группы *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

Сбор клинического материала. Было получено 33 образца мокроты пациентов с симптомами поражения органов дыхания и/или рентгенологически выявленными специфическими инфильтратами в легких, проходивших лечение в ГУ Нпп пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ.

Очистка и обработка мокроты при помощи N-ацетил- L-цистеина/NaOH. Для обработки образцов мокроты с целью выделения и последующего посева микобактерий использовался N-ацетил-L-цистеин. Свежий реагент готовили путем смешивания равных количеств 4% NaOH и 2,9% цитрата натрия. На каждые 100 мл получившегося раствора добавляли 0,5 г порошка N-ацетил-L-цистеина. После добавления N-ацетил-L-цистеина, реагент использовали в течение 24 часов.

Собранные образцы помещали в пластиковые пробирки для центрифугирования объемом 50 мл. Объем образца не должен был превышать 10 мл. Раствор N-ацетил-L-цистеина добавляли в каждую пробирку в количестве, равном образцу. После плотного закрытия пробки, пробирку встряхивали в течение 5-20 сек. и переворачивали, чтобы обеспечить контакт раствора со всеми поверхностями пробирки и пробки. Образец отстаивался в течение 15-20 мин, после чего пробирка заполнялась до объема 50 мл стерильным фосфатным буфером с pH 6,8 и содержимое перемешивалось вручную.

Образец концентрировался в центрифуге при скорости 3000g в течение 15 минут. Жидкий супернатант тщательно отделялся от осадка. Осадок ресуспендировался в фосфатном буфере (pH 6,8) с использованием стерильной пастеровской пипетки для достижения окончательного объема от 1 до 3 мл.

Затем производился посев на среду Левенштейна-пенсена; видовая принадлежность выросших колоний идентифицировалась путем использования селективных сред с TCH (2-тиофенкарбоновая кислота) и PN99B (паранитробензойная кислота), либо путем проведения стандартных биохимических процедур.

Определение устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам(ПТП). Для определения спектра лекарственной устойчивости микобактерий ис-

пользовался метод абсолютных концентраций на опытной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена с использованием автоматизированной системы Bactec. В качестве критериев для отнесения штаммов *M. tuberculosis* к категории чувствительных или устойчивых использовали пороговые значения минимальной ингибирующей концентрации (МпК) ПТП, которые ингибируют рост МБТ при культивировании его на питательных средах с различными концентрациями препаратов. Данные о величине МпК ПТП в отношении штаммов МБТ, выделенных от больных, служат микробиологическим критерием определения величины пороговых концентраций.

Питательные среды с ПТП для определения устойчивости *M. tuberculosis* к ПТП готовили в пробирках со средой Левенштейна-Йенсена, с добавлением рабочих разведений противотуберкулезных препаратов:

1. Стрептомицина сульфат. 10 мг стрептомицина сульфата растворяли в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация стрептомицина в полученном растворе составила 1000 мкг/мл. Рабочее разведение препарата добавляли в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды (конечная концентрация – 10 мкг/мл).

2. Изониазид. 10 мг изониазида растворяли в 1 мл этилового спирта, затем добавляли 9 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация изониазида в полученном растворе составила 1000 мкг/мл. Рабочее разведение изониазида добавляли в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора изониазида к 99 мл среды (конечная концентрация – 1 мкг/мл).

3. Рифампицин. 21 мг рифампицина растворяли в 5 мл этилового спирта 96°С. Концентрация рифампицина в полученном растворе составила 4000 мкг/мл. Рабочее разведение рифампицина добавляли в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды (конечная концентрация – 40, 50, 75 и 100 мкг/мл).

4. Этамбутол. 5 мг этамбутола дигидрохлорида растворяли в 10 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этамбутола в полученном растворе составила 500 мкг/мл. Рабочее разведение этамбутола добавляли в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды (конечная концентрация – 2 мкг/мл).

5. Канамицина сульфат. 40 мг канамицина сульфата растворяли в 10 мл стерильной дистиллированной воды. 40 мг канамицина сульфата соответствует 30 мг чистой субстанции канамицина. Концентрация канамицина в полученном растворе составила 3000 мкг/мл. Рабочее разведение канамицина добавляли в среду Левенштейна-Йенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора канамицина к 99 мл среды (конечная концентрация – 30 мкг/мл).

6. Этионамид (протионамид). 30 мг этионамида растворяли в 3 мл 96 ° ректифицированного этилового спирта, затем добавляли 7 мл стерильной дистиллированной воды. Концентрация этионамида в полученном растворе составила 3000 мкг/мл. Рабочее разведение этионамида добавляли в среду Левенштейна-пенсена перед свертыванием в соотношении 1 мл раствора к 99 мл среды (конечная концентрация – 30 мкг/мл).

Определение гена *whiB7*. ПЦРс шестью наборами праймеров проводилась в конечном объеме 50 мкл, содержащем 1 мкл dNTP, 5 мкл буфера (с MgCl₂), 1 ед. Taq- полимеразы, 20 пмоль каждого праймера и 1-5 мкл образца ДНК (ДНК-матрицы). Температура отжига для

каждой пары праймеров рассчитывалась посредством линейных программ. Условия проведения ПЦР представлены в таблице 1.

Продукты ПЦР, содержащие упомянутые гены, выявлялись с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с этидий бромидом с последующей детекцией ультрафиолетом.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР-амплификации гена *whiB7*

набор	ДНК-мишени	направление	праймеры (5'-3')	Размер продукта (п.о.)	параметры для ПЦР	параметры для последовательности
1	<i>whiB7</i>	F R	CAGACAAAGATTGCCGGTTT TCGAGCCTTGGTCGAATATC	279	95°C, 15 с, 55°C, 15 с, 72°C, 40 с, 40 циклов	95°C, 15 с, 55°C, 15 с, 72°C, 30 с, 35 циклов
2	w686	F R	AAGCTTATCGATGGTGTGAGACGTGTGCAGC TCCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAGTCTAGATC	686	94°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 30 с, 40 циклов	95°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 80 с, 30 циклов
3	w973	F R	AAGCTTATCGATGGTGTGAGACGTGTGCAGC CCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAGTCTAGATC	973	94°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 30 с, 35 циклов	95°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 80 с, 30 циклов
4	w667	F R	AGCTGCTGCCAOCGGTTAAC TCCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAGTCTAGATC	667	94°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 30 с, 35 циклов	95°C, 30 с, 57°C, 30 с, 72°C, 80 с, 30 циклов
5	wt1	F R	TTAACCTCCAGGTCCGATTCGCT GAAAGTTTGGCCAGGATCCTGT	236	94°C, 30 с, 56°C, 30 с, 72°C, 30 с, 35 циклов	95°C, 30 с, 56°C, 30 с, 72°C, 80 с, 30 циклов
6	wt2	F R	AGGTCAGAAAATCGGTTGTGGTCAGC TGTTGGCGGTTCTTGGAAAGTGAT	329	94°C, 30 с, 56°C, 30 с, 72°C, 30 с, 35 циклов	95°C, 30 с, 56°C, 30 с, 72°C, 80 с, 30 циклов

1/4/p>

Фрагменты, использованные для скрининга гена *whiB7* в клинических изолятах: 1) структурный ген *whiB7*; 2) завершающая часть *uvrD2*, включающая промотор *whiB7* (w686); 3) w686 плюс структурный ген (w973); 4) часть промотора плюс структурный ген (w667); 5) wt1 часть промотора; 6) wt2 часть промотора (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2. Фрагменты гена *whiB7*, использованные для скрининга изолятов

набор	НК-мишени	Размер фрагмента в <i>whiB7</i> (708 п.о.) и <i>uvrD2</i>	Типы фрагментов	длина (п.о.)
	<i>whiB7</i>	429 - 708	структурный ген	279
	w686	-257 до 429	<i>uvrD2</i> с промотором	686
	w973	-257 до 708 (+8)	w686 плюс структурный ген	973
	w667	49 до 708 (+8)	Часть промотора плюс структурный ген	667
	wt1	344 - 580	Часть промотора	236
	wt2	309 - 638	Часть промотора	329

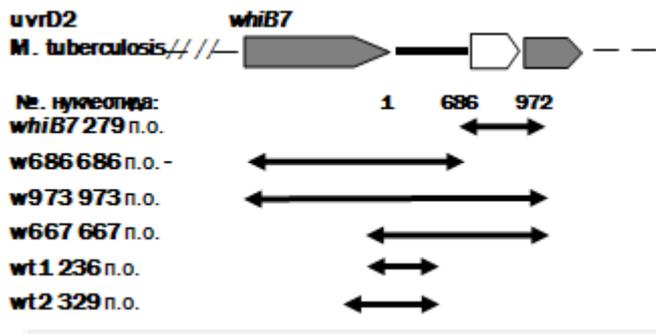


Рис. 1. Секвенирование расположения изучаемых фрагментов в гена *whiB7* с помощью программы Mega и BioEdit

Результаты и обсуждение

Исследование нуклеотидной и аминокислотной последовательности структурной части гена *whiB7*. Чтобы избежать возможного искажения результатов, секвенирование 4 чувствительных, 6 MDR и 15 XDR клинических изолятов *M. tuberculosis* проводилось многократно с использованием как идентичных, так и различных праймеров. На первом этапе анализа были обнаружены различия в последовательности конечной части структурного гена чувствительных и MDR- с XDR-изолятов. Различия стали более очевидными после перевода нуклеотидной последовательности в аминокислотную. Однако после устранения ошибок, повторения эксперимента с использованием как прямых, так и обратных праймеров и тщательного анализа пиков в программе ALFwin было установлено, что значимых различий между изолятами на самом деле нет.

Все последовательности обрывались стоп-кодоном «ТГА», мутаций в структурном гене *whiB7* клинических изолятов выявлено не было. Это подтверждает факт, что активность *whiB7* вызывает множественную лекарственную устойчивость резистентных XDR и MDR изолятов.

Аминокислотная последовательность белка *WhiB7* клинических изолятов. Сравнительное исследование протеина *WhiB7* в клинических изолятах во всех случаях выявило типичную структуру данного гена. Упомянутый протеин состоит из 93 аминокислот (279 нуклеотидов). Ясно видно четыре консервативных цистеина — Cys-X22-Cys-X2-Cys-X5-Cys — и отсутствие каких-либо мутаций, в особенности в упомянутых положениях (рис. 3,4).

Последовательность, богатая глицином, как и у всех членов семейства белков *WhiB* актиномицетов, состояла из НТН-подобных фрагментов, характеризующихся 7-компонентной сигнатурой G-(VI)-W-G-G. У клинических изолятов, включенных в данное исследование, а также у стандартного штамма *M. tuberculosis* H37RV, обнаружен НТН-подобный фрагмент GVWGG.

Типичная AT-Hook ДНК-связующая консенсусная последовательность, обнаруживаемая только у *WhiB7* паралофов, состояла из GRP, окруженных богатой аргинином областью (рис. 3,4).

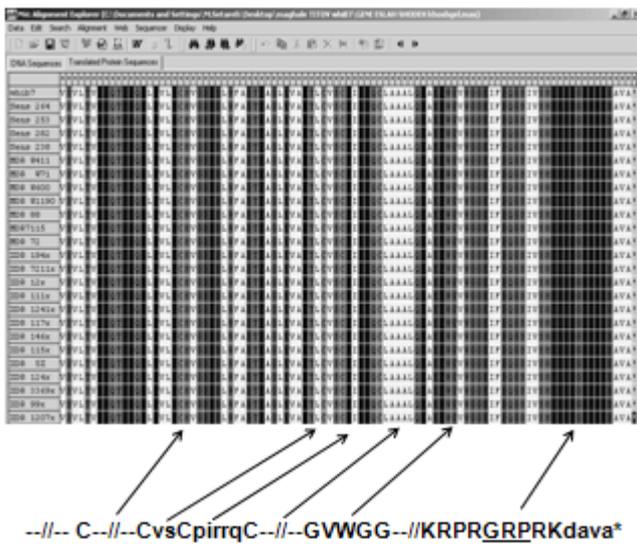


Рис. 3. Сравнительная характеристика аминокислотных последовательностей белка WhiB7 изолятов *M. tuberculosis*

Примечание: ясно видны четыре цистеина Cys-X22-Cys-X2-Cys-X5-Cys, консервативный НТН- фрагмент, характеризующийся остаточной сигнатурой G-(V)-W-G-G и С-терминальный ‘‘АТ-Hook’’.

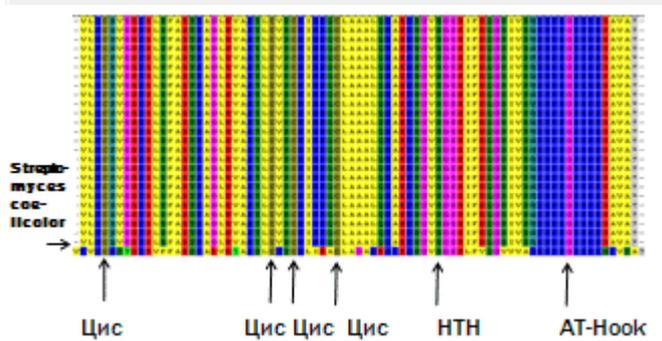


Рис. 4. Сравнительно характеристика аминокислотных последовательности структурного белка WhiB7 стрептомицетов (123 аминокислоты) и резистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* (93 аминокислоты).

Примечание: четыре цистеина, НТН- фрагмент и АТ-Hook идентичны и определяются на одних и тех же местах.

интересно, что только эти три признака выявлялись неизменными (консервативными) у чувствительных, у MDR и XDR клинических изолятов, а также у стандартного штамма *M. tuberculosis* H37RV и *Streptomyces coelicolor*.

Создание праймера и определение температуры отжига. В случае обычных тестов реакция ПЦР запускается без проблемно, особенно с использованием феномена мультипраймера или слабых связей. В этой связи были использованы некоторые программы для разработки нескольких идеальных праймеров. Лучшие их пары отбирались для амплификации фрагмента ДНК размером 667 п.о., состоящего из части промотора и структурного гена whiB7 (табл. 3). Далее, после расчета тепловой денатурации для каждого из них была определена температура отжига в 59°C. Условия ПЦР были протестированы на небольшом количестве образцов и затем использованы в отношении всех изолятов.

Таблица 3. Фрагмент, который был использован для скрининга гена whiB7

НК-ми-	а-прав-	Праймеры (5'-3')	Р	И	П
			азмер-продук-	азме-щение	ара-метр

шени	ление		та (п.о.)		для ПЦР
hiB7		AGCTGCTGCCACCGGTTAAC	67	6	9 до 4°С, 716 30 с
НК-ми-шени	а-прав-ление	Праймеры (5'-3')		Р азмер продук- та (п.о.)	П ара- метр для ПЦР
		CCGCGCAAGGATGCTGTTGCATAGTCTA GATC		1/4	5 9°С, 30 с 7 2°С, 30 с 3 5 ЦИКЛОВ

Результаты ПЦР-анализа гена *whiB7*.

ПЦР-амплификация гена, кодирующего белок *WhiB7*, была использована в качестве инструмента для быстрой идентификации клинических изолятов бактерий группы *M. tuberculosis* (рис. 5). 33 клинических изолята, идентифицированные как *M. tuberculosis* коммерческим методом идентификации микобактерий (основанном на ПЦР в реальном времени) и определенные методом ВАСТЕС как чувствительные, MDR или XDR, сравнивались с 6 стандартными нетуберкулезными штаммами (*M. avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. Phalei*, *M. bovis-BCG*), 8 лабораторным изолятами непатогенных микобактерий от животных и птиц и 10 образцами мокроты от пациентов с клинически доказанным туберкулезом по сравнению с 5 негативными образцами мокроты.

1/4br>



Рис. 5. ПЦР в диагностике туберкулеза. Структурный ген *whiB7* размером 270 п.о. (без промотора). Маркер и изолятов (1-7).

Результаты ПЦР-анализа клинических изолятов. ПЦР-идентификация чистых культур клинических изолятов *M. tuberculosis* была проведена в отношении 6 чувствительных, 12 MDR- и 15 XDR-изолятов из различных регионов Беларуси (табл. 4) и одного штамма *M. bovis*. ПЦР для ампликона *whiB7* размером 667 п.о. была успешной для всех выделенных изолятов *M. tuberculosis*, включая стандартные, чувствительные, MDR- и XDR-изоляты, а также – *M. bovis*, т.е. специфичность составила 100% (рис. 5). Ни одного ПЦР-негативного образца обнаружено не было.

ПЦР дает возможность определять лекарственную резистентность *M. tuberculosis* посредством обнаружения соответствующих генов одновременно с традиционным бактериологическим методом (6). Этот метод превосходит все другие диагностические подходы благодаря своей чувствительности (может быть определена одна молекула ДНК), высокой специфичности и продуктивности (6).

Таблица 4. Результаты выявления генов *whiB7* и *poB* в культурах микобактерий

Клинические изоляты (n=33)	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>	Стандартные	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>	Непатогенные	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>
			нетуберкулезные штаммы (n=6)			микобактерий (n=7)		
Чувствительные (6)			<i>M. avium</i> ATCC 1603			К Ch-IV группа		
MDR (12)			<i>M. intracellular</i>			BZ/NC-IV группа		
XDR (15)			<i>M. fortuitum</i> ATCC 342			4 med - III группа		
<i>M. bovis</i> (положительная контроля)			<i>M. terrae</i> ATCC 15755			SIV III группа		
ZoP- <i>Candida rubrum</i> (Отрицательная контроля)			<i>M. phlei</i>			1/4/p> B-III группа 1/4/td >		
Клинические изоляты (n=33)	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>	Стандартные	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>	Непатогенные	<i>whiB7</i>	<i>poB</i>
нетуберкулезные штаммы (n=6)			микобактерий (n=7)					
1/4/td>			<i>M. kansasii</i>			VZK-IV группа		
1/4/td>						SPK-III группа		

Результаты ПЦР-анализа непатогенных. ПЦРгена *whiB7* проводилась в целях дифференцировки 13 видов микобактерий, 6 из которых являлись стандартными нетуберкулезными штаммами, такими как *M. avium* ATCC 1603, *M. intracellular*, *M. fortuitum* ATCC 342, *M. terrae* ATCC 15755, *M. Phlei*, *M. kansasii*, а 7 были непатогенными изолятами III и IV групп от животных и птиц, выделенными в лаборатории обычным путем. (табл. 4). В качестве контроля использовались два изолята *Candida rubrum*. Результаты позволили

выявить наличие соединений размером 667 п.о. только среди изолятов группы *M. tuberculosis* (состоящих из клинических изолятов *M. tuberculosis* и *M. bovis*). При исследовании всех других штаммов (непатогенных и нетуберкулезных) положительных результатов получено не было.

Выявление *M. tuberculosis* в мокроте. Проведена оценка быстроты и простоты постановки ПЦРгена *whiB7* для идентификации изолятов микобактерий у пациентов с клиническими симптомами туберкулеза и некоторых непатогенных микобактерий, результаты сравнивались с таковыми, полученными при использовании коммерческого метода ПЦРв реальном времени (11).

От пациентов с клиническими симптомами туберкулеза были взяты 15 образцов мокроты, причем у 10 пациентов наличие *M. tuberculosis* было подтверждено, а у 5 – опровергнуто стандартным и коммерческим методами (BioRad). Установлено, что продукты ПЦРразмером 667 п.о. обнаружены во всех 10 заведомо положительных образцах мокроты, но не в остальных 5 негативных образцах.

Таким образом, этот метод идентификации бактерий группы *M. tuberculosis* оказался простым в проведении и с хорошим соотношением цена-качество.

Для назначения адекватной лекарственной терапии и для ответа на эпидемиологические вопросы необходима идентификация микобактерий с точностью до вида. Большинство лабораторий идентифицируют видовую принадлежность изолятов рода *Mycobacterium* на основании анализа фенотипических и биохимических характеристик микроорганизмов используя культуру на плотной среде, что отнимает много времени. Использование современных бактериологических процедур, таких как ВАСТЕС и двухфазные системы MB-Check, ускоряет процесс идентификации, однако все равно требует значительного прироста числа микроорганизмов (10).

Таблица 4. Сравнение результатов ПЦРдвух генетических маркеров (*whiB7*, *groB*), используемых для обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* в позитивных и негативных образцах мокроты (ПЦРпроведена коммерческим методом (BioRad) в реальном времени)

Образец мокроты	<i>whiB</i>	<i>groB</i>	Результат культурального исследования
Результаты ПЦРпозитивных образцов мокроты, проведенной коммерческим методом (BioRad)			
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
Образец мокроты	<i>whiB</i>	<i>groB</i>	Результат культурального исследования
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+

Результаты ПЦР негативных образцов мокроты, проведенной коммерческим методом (BioRad)

1N	--	--	--
2N	--	--	--
3N	--	--	--
4N	--	--	--
5N	--	--	--

Таким образом, ранняя диагностика представляет огромный интерес не только для лабораторий по контролю за распространением туберкулеза, но также для эпидемиологических исследований (8).

Одним из первых вопросов, возникших на пути создания методики ПЦР, направленной на обнаружение *M. tuberculosis*, было отсутствие мишени, применимой для дифференцировки видов в пределах группы *M. tuberculosis*, поскольку, несмотря на большое количество обнаруженных потенциальных маркеров, среди представителей данной группы бактерий схожесть генома оказалась чрезвычайно высокой (близкой к 100%).

Методы, используемые в настоящее время для диагностики туберкулеза, часто являются недостаточно чувствительными и требуют больших затрат времени. Доказано, что ПЦР метод для селективного определения *M. tuberculosis* в образцах, полученных от человека, когда ДНК, содержащая фрагмент *whiB7* размером 667 п.о., амплифицируется до образования ее количества, достаточного для обнаружения, является применимым для рутинного использования в диагностической лаборатории.

ПЦР является быстрым в постановке и достоверным методом с высокой чувствительностью, благодаря которой можно диагностировать необнаруживаемый другими методами туберкулез. Это представляет особый интерес для пациентов с тяжелыми заболеваниями бронхов и злокачественными новообразованиями, составляющими большую часть туберкулез-негативной группы.

Образование фрагмента ДНК *whiB7* указывает на присутствие в образце *M. tuberculosis*. Предпочтительным является определение ДНК в образцах человеческой мокроты. Преимуществом метода является минимальная предварительная обработка образца мокроты для его последующего проведения.

Выводы

1. ПЦР метод, основанный на определении гена *whiB7*, обладает рядом преимуществ, поскольку не было обнаружено мутаций в промоторе и в структурном гене *whiB7* чувствительных и резистентных (MDR и XDR) клинических изолятов.
2. Специфические праймеры (разработанные в рамках данного исследования) могут быть использованы повсеместно, несмотря на мутации, которые могли бы стать помехой при проведении ПЦР-отжига.

Литература

1. World Health Organization. The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007–2008.
2. World Health Organization. TB burden (2006 estimates), TB country profile, Belarus [Electronic resource] / WHO, 2006. - Mode of access: http://www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/blr.pdf.
3. World Health Organization. The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007–2008 // WHO/HTM/TB, 2007. 387 p.
4. Mokrousov, I., Otten, T., Filipenko, M. High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from

Northwestern Russia, 1996 to 2001. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. Vol. 46. P. 1417–1424.

5. Сетаре, М. изучение полиморфизма отдельных нуклеотидов KatG315 и KatG463 в клинических изолятах *Mycobacterium tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом легких в пенитенциарных заведениях / М. Сетаре, Л. П. Титов, Л. К. Суркова // *Медицинский журнал.* 2009. № 1 (27). С. 81–86.

6. Zaker, S.B. Frequency and molecular characterization of isoniazid resistance in katG region of MDR isolates from tuberculosis patients in southern endemic border of Iran / S.B. Zaker, L.P. Titov, A.R. Bahrmanda // *Infect Genet Evol.* 2008. Vol. 8. P. 15–19.

7. Morris, RP, Liem Nguyen, Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, PNAS, August 23, 2005. Vol. 102, № 34. P. 12200–12205.

8. Thompson, CJ, Grzesiek, S. Overcoming intrinsic multidrug resistance to discover and expand the repertoire of antibiotics active against mycobacterial pathogens. 4049-069384, 01.10.2002-31.03.2006. NRP 49 final report. P. 1–2.

9. Nguyen, L., Charles, J. Thompson, Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm, *TRENDS in Microbiology*, 2006. Vol. 14, № 7. P. 304–312.

10. Abe, C. Biological and Molecular Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates with Low-Level Resistance to Isoniazid in Japan // *Journal of clinical microbiology.* 2008. Vol. 46, № 7. P. 2263–2268.

11. Kremer, K., D. van Soolingen, Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility, *J. of Clinical Microbiology*, 1999. Vol. 37, № 8. P. 2607–2618