

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

В.В. Слипень, Н.Шакирина

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г.Минск, Республика Беларусь

Резюме: Разработана тест-система для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения лекарственной устойчивости к фторхинолонам. Показано, что тест-система, основанная на использовании двойных гидролизных линейных зондов, позволяет выявлять мутации в *gyrA* гене - Ala90Val, Ser91Pro, Asp94Gly/His/Asn/Tyr/Ala, и получаемые результаты с высокой частотой совпадают с результатами использования метода GenoType MTBDRsl, секвенирования и фенотипического определения устойчивости к офлоксацину. Чувствительность, специфичность, положительная предсказательная ценность, эффективность тест-системы составили 90,5, 87,5, 97,1, 90,0% соответственно.

Ключевые слова: микобактерии, устойчивость, фторхинолоны, мутации, *gyrA* ген

Summary: The test system for genetic detection of *M. tuberculosis* and resistance to fluoroquinolones has been developed. The test system basing on application of dual linear hydrolysis probes was shown to be able to detect mutations in the *gyrA* gene - Ala90Val, Ser91Pro, Asp94Gly / His / Asn / Tyr / Ala, and the results obtained with a high frequency coincided with the results of standard methods: GenoType MTBDRsl, sequencing and phenotypical detection of resistance to ofloxacin. Sensitivity, specificity, positive predictive value, efficiency of test system constituted 90.5, 87.5, 97.1, 90.0%, respectively.

Key words: mycobacteria, resistance, the fluoroquinolones, mutations, *gyrA* gene.

Введение. В последние годы антибиотики группы фторхинолонов приобретают особое значение в лечении туберкулёза, что связано с распространением штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Резистентность к фторхинолонам среди множественно лекарственно устойчивых МБТ резко ограничивает возможность лечения и уменьшает шанс на успех терапии. Ранняя диагностика широко лекарственно устойчивого туберкулёза позволяет своевременно скорректировать терапию и увеличить вероятность благоприятного исхода заболевания. Определение спектра резистентности к противотуберкулёзным лекарственным средствам с использованием классических методов занимает до 3 месяцев, что диктует необходимость

разработки методов экспресс диагностики лекарственно устойчивых МБТ [1].

Устойчивость к фторхинолонам у МБТ связана с мутациями в 21 п.о. фрагменте *gyrA* гена, кодирующем ДНК-гиразу. У 60 – 90% изолятов МБТ мутации, приводящие к резистентности к фторхинолонам, обнаруживают в гене *gyrA* в кодонах 88 (глицин-88-цистеин), 89 (аспарагиновая кислота-89-глицин), 90 (аланин-90-валин), 91 (серин-91-пролин), 94 (аспарагиновая кислота -94-(гистидин, глицин, тирозин, аланин, что позволяет рассматривать эти кодоны как маркеры резистентности к фторхинолонам и как индикаторы широкой (либо пре-широкой) лекарственной устойчивости МБТ [2, 3, 4].

Несмотря на то, что метод секвенирования ДНК является наиболее точным методом выявления точечных мутаций в геномах, в клинической практике его использование затруднено, что обусловлено как его дороговизной, так длительностью и большой трудоемкостью, что диктует необходимость разработки относительно недорогих экспресс-методов, которые могут быть использованы в клинической практике.

Цель работы - разработать метод детекции *M. tuberculosis* и точечных мутаций в 90, 91, 94 кодонах *gyrA* гена, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, с использованием ПЦР в реальном времени и на этой основе создать тест-систему для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к фторхинолонам.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили клинические изоляты МБТ (n=90), выделенные из образцов мокроты больных туберкулезом органов дыхания, находившихся на лечении в ГУ "Республиканский научно-практический центр фтизиатрии и пульмонологии". Лекарственная чувствительность штаммов МБТ была определена с использованием унифицированного метода абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена, регламентированного инструкцией по применению «Организация определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза» от 30.12.2002 г. (регистрационный номер 107-1102).

Разработку праймеров и зондов для ПЦР проводили с использованием *in silico* анализа. Информацию о первичной структуре генов микобактерий получали с использованием данных международных баз геномов <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, http://www.genome.tdb.org/annotation/genome/tdb/Gene_Index.html. Оценку конформации образуемых олигонуклеотидов и силу связи, температуру плавления вторичных структур осуществляли с использованием онлайн-программы <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold> и <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Детекцию мутаций в *gyrA* гене проводили с помощью разработанной тест-системы, согласно инструкции по применению, методом секвенирования и диагностическим набором GenoType MTBDRsl, HAIN, Germany (согласно инструкции по применению).

Секвенирование *GyrA*. У 34 культуры МБТ секвенировали фрагмент гена *gyrA* размером 320 п.о, очистку ПЦР-продуктов проводил с помощью “QIAquick-spin PCR clean up columns” (Quiagen) или GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, NA1020), секвенирование – с помощью набора ABI PRISM BigDye® Terminator 3.1 и секвенатора ABI PRISM® 310. Анализ секвенированного олигонуклеотида осуществляли с использованием программы BLAST или Mega 5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> и <http://www.megasoftware.net/>).

Разработка программы оценки мутаций в *GyrA* гене. Проведена разработка компьютерной программы GUIBelMedLab для оценки результатов уровней флюоресценции (в RFU), получаемых с помощью тест-системы.

Результаты и обсуждения. На основании *in silico* анализа *gyrA* гена разработаны праймеры для амплификации фрагмента гена *gyrA* и зонды для выявления мутаций в 90 и 91 кодонах — ALA90VAL и SER91PRO, в 94 кодоне — ASP94ALA, ASP94TYR/HIS, ASP94GLY и ASP94ASN. Проведена разработка зонда, контролирующего амплификацию *gyrA* гена, а также зонда и праймеров для детекции специфичных для микобактерий фрагментов гена *rrs*, кодирующего 16S рРНК. Проведена оценка дискриминативных свойств зондов, оптимизирована кинетика ПЦР за счет изменения концентраций компонентов реакционной смеси и введения присадок. Изучена возможность использования сухих амплификационных смесей для постановки ПЦР в реальном времени.

Были проведены лабораторные испытания разработанной тест-системы на 90 культурах микобактерий. В ходе проводимых исследований был создан лабораторный образец тест-системы для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения устойчивости к фторхинолонам. В основу работы тест-системы положено выявление наиболее часто встречающихся мутаций в гене *gyrA* (в кодонах 90, 91, 94) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с парными гидролизными линейными зондами. Тест-система предназначена для получения на первом этапе препарата нуклеиновых кислот из чистых культур, на втором этапе – детекции микобактерий туберкулеза и определения устойчивости к фторхинолонам на основании присутствия/отсутствия мутаций в кодонах 90, 91, 94 в *gyrA* гене. Исследования одной пробы ДНК проводятся в четырех реакционных смесях: 1) 1-ая реакционная смесь - выявление микобактерий туберкулеза по

родоспецифическому маркеру, располагающемуся в гене *ITS* и видоспецифическому маркеру IS 6110; 2) 2-я реакционная смесь - выявление мутаций ALA90VAL и SER91PRO; 3) 3-я реакционная смесь – ASP94ALA и ASP94 TYR/HIS; 4) 4-я реакционная смесь - ASP94GLY, ASP 94ASN. Внешний вид тест-системы приведен на рисунке 1.

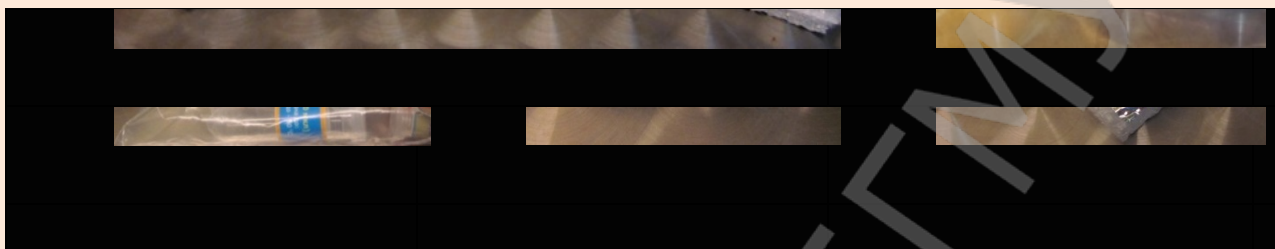


Рисунок 1 – Тест-система для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к фторхинолонам (ПЦР в реальном времени) (ТУБГЕН-ПЦРРВ)

Оценку результатов осуществляют на основании анализа конечных уровней флюоресценции (RFU) на четырех каналах – FAM, R6G, Cy5, ROX, или по кривым флюоресценции. В случае наличия мутаций в одном из кодонов 90, 91, 94 отмечается исчезновение флюоресценции на канале FAM и появление флюоресценции на одном из каналов R6G, Cy5 (рис. 2).

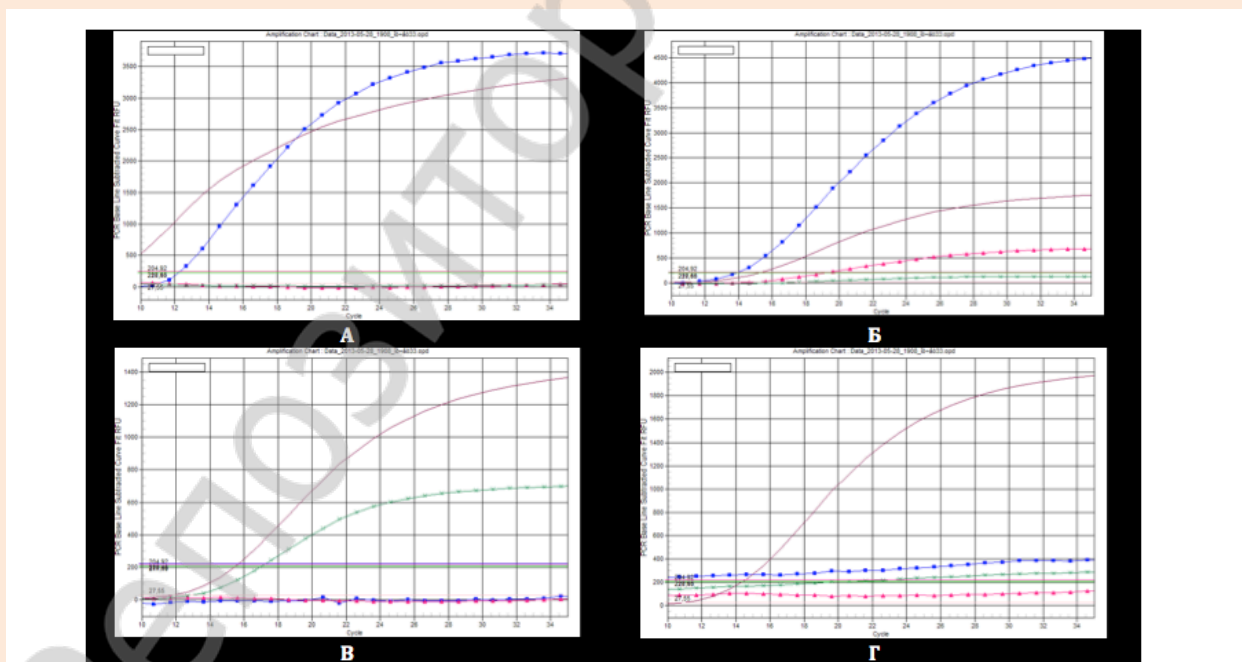


Рисунок 2 – Пример определения мутации ASP94TYR\HIS с помощью разработанной системы; культура 18556. Флюоресценция на канале Cy5 отмечается в реакционной смеси В, что свидетельствует о мутации ASP94TYR\HIS; А – детекция микобактерий и среди них МБТ, Б – детекция мутаций ALA90VAL, SER91PRO; В – детекция мутации ASP94ALA и ASP94TYR\HIS; Г - детекция мутации ASP94GLY, ASP94ASN

---▲--- канал R6G; ---■--- канал FAM; ---X--- канал CY5, --- - -
ROX

На основании данных секвенирования *gyrA* гена и метода GenoType MTBDRsl, HAIN, Germany охарактеризован профиль мутаций микобактерий туберкулеза. Дрминирующими мутациями были мутации Asp94Gly и Ala90Val, которые идентифицированы у 19 и 15 изолятов, в структуре мутаций микобактерий на их долю приходилось 50% мутаций. У 11 штаммов, проявлявших фенотипическую устойчивость к фторхинолонам, не были идентифицированы мутации в кодонах 90, 91, 94. Мутацию Asp—Asn не выявляли ни у одного из исследованных изолятов.

Сравнительная оценка результатов определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с помощью тест-системы, секвенирования, метода GenoType MTBDRsl, HAIN, Germany и традиционного культурального метода показала, что тест-система позволяет выявлять мутации в *gyrA* гене - Ala90Val, Ser91Pro, Asp94Gly/His/Asn/Tyr/Ala, и получаемые результаты с высокой частотой совпадают с результатами использования метода GenoType MTBDRsl, секвенирования и фенотипического определения устойчивости к офлоксацину. Чувствительность, специфичность, положительная предсказательная ценность, эффективность тест-системы составили 90,5%, 87,5%, 97,1%, 90,0% соответственно (таблица).

Таблица – Расчет чувствительности и специфичности разработанной тест-системы

Вид исследо-вания	Истинная устойчивость	Ложная устойчивость	Истинная	Ложная	Сумма	Чувстви-тельность, %	Специфи-чность, %	Положительная предсказате-льная	Эффективность, %
Эталонный метод	74	0	16	0	90	100	100	100	100
Тест-система	67	2	14	7	90	90,5	87,5	97,1	90,0

В результате регистрации уровней флюоресценции для каждого образца, тестируемой пробы ДНК МБТ, получается ряд из 14 цифр, которые в процессе анализа необходимо сравнивать друг с другом, определять уровни толерантности и пороги флюоресценции, проводить дискриминацию аллелей. В связи с чем, проведена разработка компьютерной программы на

основе языка JAVA для анализа числовых значений уровней флюоресценции на каналах FAM, R6G, Cy5, ROX. Программа представляет собой последовательно открывающиеся окна "Эксперимент", "Данные о пациенте", "Анализ данных", позволяющие вводить данные о пациенте, о типе эксперимента, а также загружать числовую матрицу данных о флюоресценции. Разработанная программа позволяет быстро идентифицировать тип флюоресценции и интерпретировать результат. Программа выдает ответ о наличии или отсутствии мутаций в пробе и характеризует профиль идентифицированных мутаций (рис.3).

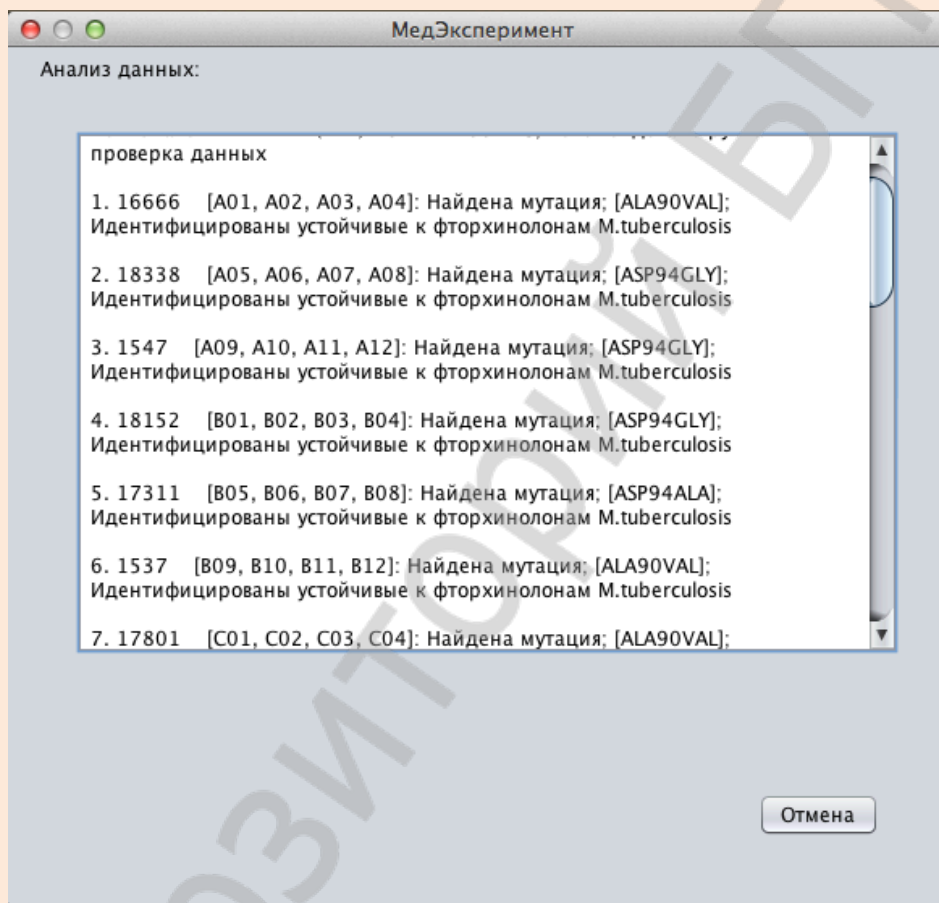


Рисунок 3 – Тест-система для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и определения чувствительности к фторхинолонам (ПЦР в реальном времени) (ТУБГЕН-ПЦРРВ)

Выводы. Разработанные критерии для дизайна гидролизных зондов позволяют получать парные зонды, способные дифференцировать «дикий» и мутантный тип нуклеотидов 269, 271, 280, 281 *gugA* гена, что дает возможность выявлять мутации в 90, 91 и 94 кодонах и делать выводы об устойчивости *M. tuberculosis* к фторхинолонам.

На основании данных секвенирования *gugA* гена (секвенированы фрагменты размером 320 п.о. у 33 культур МВТ) и метода GenoType MTBDRsl, HAIN, Germany, показано, что чувствительность, специфичность,

положительная предсказательная ценность, эффективность тест-системы составили 90,5, 87,5, 97,1, 90,0% соответственно. Разработанная компьютерная программа на основе языка JAVA для анализа числовых значений уровней флюоресценции на каналах FAM, R6G, Cy5, ROX позволяет анализировать уровни флюоресценции проб и выдавать ответ о наличии или отсутствии мутаций, характеризовать профиль идентифицированных мутаций в *gyrA* гене.

Благодарность. Выражаем благодарность А.Шакирину за помощь в разработке компьютерной программы.

Литература

1. Астровко А.П., Гуревич Г.Л., Калечиц О.М., Скрыгина Е.М., Богомазова А.В., Климук Д.А., Белько А.Ф., Бобрукевич Е.Л. Мониторинг заболеваемости и смертности от туберкулеза в Республике Беларусь / Сборник материалов Республиканской научно-практической конференции «Итоги реализации Государственной программы «Туберкулез» на 2005-2009 годы и внедрения научных достижений в практическое здравоохранение– Минск – 24 июня 2010. – С. 21-25.
2. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Fourth global report 2002-2007 / Geneva, World Health Organization. – 2008. - Document WHO/HTM/TB/2008.394.
3. Aubry A. Novel Gyrase Mutations in Quinolone-Resistant and –Hypersusceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis: Functional Analysis of Mutant Enzymes/ Aubry A., Veziris N., Cambau E. e.a.// Antimicrob. Ag. Chemoth. - 2006. - Vol. 50, No. 1. - P. 104–112.
4. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET / G. Sotgiu [et al.] // Eur. Respir. J. – 2009 . – Vol. 33. - № 4. – P. 871–881.