

М. Сетарел1, Л.П. Титов2, Л.К. Суркова3

Распространенность мутаций в кодоне 463 KATG-гена в клинических изолятах лекарственно-устойчивых *Mycobacterium Tuberculosis* в Республике Беларусь и возможности применения метода ПЦР-ПДФР в экспресс-диагностике туберкулеза

1 Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

и Arak Medical University, Иран

2 Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь

3 ГУ "Научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии"

Министерства здравоохранения, Республика Беларусь

ПЦР амплификация фрагмента katG размером 620 п.о. была успешной для всех чистых культур МБТ. Таким образом, использование метода достигло 100% специфичности. Последующая обработка ампликонов katG HpaII в методе ПДФР выявила мутации в KatG463 у 33,3% чувствительных культур, 57,8% культур, обладающих множественной устойчивостью (MDR), и 59,2% культур с широкой устойчивостью (XDR). В качестве положительного контроля были использованы *Mycobacterium bovis* с мутациями в KatG463. У стандартных штаммов МБТ - H37Rv и академического - мутаций в этом кодоне не обнаружено. Автоматическое ДНК-секвенирование ампликона katG случайно отобранных культур, как чувствительных, так и резистентных к изониазиду, выявило 100% соответствие последовательности точечных мутаций таковым, обнаруженным методом ПЦР-ПДФР.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, KatG463, множественная лекарственная устойчивость (MDR), широкая лекарственная устойчивость (XDR).

Туберкулез оказывает огромное влияние на жизнь общества. На планете возникает более 8 миллионов новых случаев заболевания и 1,7 миллионов летальных исходов ежегодно. *Mycobacterium tuberculosis* вызывает большее количество смертей, чем какой-либо другой инфекционный агент [14]. В структуре общей заболеваемости туберкулез занимает 2,5% [6, 19]. Во всем мире каждый третий человек, т. е. в общей сложности два миллиарда, инфицированы *M. tuberculosis*. Нелеченный больной активным туберкулезом способен инфицировать в среднем от 10 до 15 человек в год, поэтому ежесекундно *M. Tuberculosis* поражает все большее и большее количество людей [7]. Установлено, что 95% всех случаев туберкулеза, а также 99% летальных исходов по причине данного заболевания приходится на развивающиеся страны [5, 14].

Эффективные лекарства для лечения туберкулеза существуют более чем 50 лет, однако, несмотря на это, до сих пор каждые 15 секунд данное заболевание уносит новую жизнь.

Серьезной проблемой для осуществляемых в настоящее время программ по контролю над заболеванием является существование штаммов *M. tuberculosis*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (MDR), что не позволяет добиваться эффективной терапии [14].

Множественно резистентные *M. tuberculosis* определяются как варианты, устойчивые, по меньшей мере, к рифампицину и изониазиду. Существуют также формы туберкулеза, обладающие широкой лекарственной устойчивостью (XDR), возбудители которого характеризуются невосприимчивостью к рифампицину, изониазиду (то есть MDR) в сочетании с устойчивостью к любому фторхинолону и хотя бы к одному из трех инъекционных антибиотиков, таких как капреомицин, канамицин и амикацин [8, 14].

Подтверждено, что появление в стране штаммов *M. Tuberculosis* с XDR представляет собой серьезную угрозу для здоровья людей. Из 19,9% выявленных случаев туберкулеза с MDR 9,9% штаммов соответствовали критериям XDR [17].

В странах бывшего Советского Союза распространенность туберкулеза с лекарственной устойчивостью к четырем препаратам I ряда составляет в среднем 30%, тогда как имеются регионы, где лекарственная устойчивость составляет 1,3% [14].

В Республике Беларусь количество больных туберкулезом в 1990 году составило 3948 (38 на 100000 населения), а к 2006 году увеличилось до 5989 (61 на 100000 населения) [24]. В 2007 году, по данным ВОЗ, у 65 пациентов в Беларуси был диагностирован туберкулез, характеризующийся XDR [25].

Ранее проведенные исследования гена *katG*, кодирующего ферменты каталазу и пероксидазу, выявили ассоциацию мутаций в нем с резистентностью к изониазиду. Установлено, что селективное воздействие изониазида, широко используемого для лечения туберкулеза, обусловлено высокой частотой мутаций в 315 кодоне гена *katG* у *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

Целью настоящего исследования являлась оценка роли мутаций в нуклеотиде 944 гена *katG* (*KatG315*) как фактора резистентности к изониазиду путем использования метода полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов геномной ДНК микобактерий (метод ПЦР-ПДФР) и сравнение полученных данных с результатами ДНК-секвенирования и теста на лекарственную чувствительность МБТ культуральным методом.

Материалы и методы

Сбор клинического материала. За период с мая 2007 по декабрь 2008 года нами было получено 145 образцов мокроты пациентов с симптомами поражения органов дыхания и/или рентгенологически выявленными специфическими инфильтратами в легких, проходивших лечение в ГУ НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ.

Образцы мокроты исследовались бактериоскопически и культуральным методом для выявления кислотоустойчивых микобактерий [12]. Для обработки образцов мокроты с целью выделения и последующего посева микобактерий использовался N-ацетил-L-цистеин.

Активность каталазы оценивалась согласно методу Nolte F.S. и Metchock B. [12] с использованием 15% перекиси водорода и 10 % Tween-80. В качестве референтного штамма в тестах на чувствительность к препаратам, а также при определении активности каталазы использовался штамм *M. tuberculosis* H37Rv.

Проводились стандартные биохимические тесты, для определения лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам применялся метод пропорциональных разведений в питательной среде с использованием автоматического анализатора ВАСТЕС.

Выделение ДНК для ПЦР. Выделение чистой ДНК из изолятов проводилось модифицированным методом Chelex-100 [22]. Проводилось суспензирование 3-4 колоний из полученной культуры в 270 мл ТАЕ-буфера (1x), нагревание на водяной бане при 95°C в течение 45 мин и последующее трехкратное центрифугирование при 14000 об/мин в течение 10 мин для полного удаления Chelex-100, препятствующего проведению ПЦР.

ПЦР-ПДФР. В ходе работы идентификация микробных изолятов дополнительно подтверждалась выявлением *katG*-гена при помощи метода ПЦР. Для обнаружения мутаций в *katG315*, обуславливающих резистентность к изониазиду, использовался метод ПДФР с применением HpaII-расщепления (сайт рестрикции CCGG) по методу Leung E.T.Y. [10].

Для амплификации фрагмента гена *katG* длиной 620 п.о. использовались прямой праймер *katG904* (5'-AGCTCGTATGG CACCGGAAC-3', 904-923) и обратный праймер *katG1523* (5'-TTGACCTCCACCCGACTTG- 3', 1523-1502) [10]. В 50 мкл реакционной среды реакции содержалось 10 мкл очищенной ДНК, 5 мкл 10x Taq-буфера (содержащего (NH₄)₂SO₄ и 20 mM MgCl₂, Fermentas B34), 1 мкл смеси динуклеозид-трифосфатов (dNTPs)

с 10 мМ концентрацией каждого (Fermentas R0192), 1 Е Таq-полимеразы и 25 пМоль каждого праймера. ПЦР амплификация проводилась в следующем режиме (94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин) — 45 циклов и 72°C 10 мин — 1 цикл.

Для обнаружения специфического ПЦР-продукта использовался электрофорез 10 мкл аликвоты в 1,5% агарозном геле на 1x ТАЕ-буфере в течение 1 часа. Образцы, содержащие фрагмент katG гена длиной 620 п.о., идентифицировались как МБТ.

Далее 12 мкл продуктов амплификации из каждого образца подвергались рестрикции при помощи 5 Е эндонуклеазы HpaII (Fermentas Restriction Enzymes). 20 мкл реакционной среды содержало также 2 мкл 10-кратного буфера Tango и 2,2 мкл D.W. (с 18,2 МΩ.см). Реакция проводилась при 37°C в течение 3 ч, после чего ферментативная активность останавливалась при 65°C в течение 20 мин. Электрофорез проводился в 2,5% агарозном геле после окрашивания этидий-бромидом.

Секвенирование ДНК. Для подтверждения точечных мутаций, выявленных ПЦР-ПДФР, некоторые случайно выбранные образцы были подвергнуты ДНК-секвенированию. ПЦР с прямым – 5'-TTCGGCCGGGTGCGAATGACCT-3' и обратным праймером 5'-CGGAATTCCAGGGTGC GAATGACCT-3' проводилась при температуре отжига 62°C в течение 30 с. Продукты ПЦР, содержащие фрагменты длиной 975 п.о., отделялись методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с этидий-бромидом и выделялись из геля с помощью набора для экстракции ДНК (Fermentas, K0513) согласно инструкции производителя.

Выделение ДНК из агарозного геля с использованием наборов фирм «Fermentas» или «Sigma» осуществляли с помощью стеклянных микросфер по методу Vogelstain и Gillepsy. В присутствии солей, вызывающих диссоциацию, ДНК соединялась с особыми стеклянными частицами. Соли и примеси удалялись со стеклянных частиц, содержащих осажденную ДНК. ДНК-содержащий раствор помещался на гель. Удалялся кусочек геля, включающий ленту ДНК. Определялся примерный объем удаленного геля (1 г примерно соответствует 1 мл), который затем помещался в пластиковую пробирку. Далее 3 объема раствора для взаимодействия добавлялись к 1 объему геля. Смесь инкубировалась 5 минут при 35°C, для растворения агарозы. Добавлялась суспензия кремниевого порошка – 5 мл на 2,5 мг ДНК – после чего проводилось инкубирование при 55°C в течение 5 мин. Затем раствор перемешивался путем ежеминутного встряхивания пробы. Далее смесь кремниевого порошка и ДНК в течение 5 сек центрифугировали для получения микросфер; супернатант удаляли, после чего добавляли 500 мл ледяного моющего буфера, встряхивали и снова центрифугировали 5 сек с последующим удалением супернатанта. Данная процедура была повторена трижды. После этого ДНК элюировалась в воду или ТЕ-буфер, микросферы растворялись в пропорциональном объеме воды и пробирки инкубировались при 55°C в течение 5 мин. Проводили центрифугирование, супернатант, не затрагивая микросфер, переносили в новую пробирку и повторяли элюцию с другим количеством воды или ТЕ-буфера для удаления частиц кремниевого порошка. Пробирки еще раз центрифугировали в течение 30 сек и переносили супернатант в другую пробирку. Далее определялось количество ДНК, которое сравнивалось с контрольным. В завершение еще раз проводилось центрифугирование в течение 1 минуты при 14000 об/мин. Концентрация выделенной ДНК измерялась с помощью анализатора нуклеиновых кислот (DU 730, Life Science UV/Vis спектрофотометр).

Выделенный фрагмент katG-гена 571-1408 амплифицировался с использованием термоциклера «Rotor-Gene» (RG-3000, Corbett Research Inc.) и набора красящих разделителей термосеквеназы Cy5 (GE Healthcare 27-2682-01). При этом использовался олигонуклеотидный праймер, соответствующий фрагменту 5'-TGCGGTGCGAACTAGCTGTGA -3' из геномной последовательности H37Rv M. tuberculosis. Исследование выполнялось с помощью некоторых прикладных программ

(Integrated DNA Technologies , DNA Services Facility , Primer Design, и др.), а также DNAMAN (Quebec, Canada). Последовательная температура отжига для амплификации составляла 56°C в течение 60 сек, процедура проводилась с использованием автоматического ДНК-секвенатора (Amersham auto sequencer). Для окончательного анализа результатов были использованы такие программы, как ALFwin Sequence Analyser module V2, Mega4 (2008, <http://www.megasoftware.net/>), NCBI-BLAST и BLASTP (Search nucleotide databases, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), DNAMAN (Quebec, Canada), а также BioEdit

Результаты и обсуждение

В работе было исследовано 145 клинических изолятов, идентифицированных как *M. tuberculosis*. 98 исследуемых изолятов (67,6%) были выделены от пациентов-мужчин, а 47 (32,4%) – от женщин. Таким образом, соотношение мужчин и женщин составляло 2,08. Возраст пациентов колебался в диапазоне 25 - 65 лет. Тест на лекарственную чувствительность МБТ выявил, что 109 изолятов обладали MDR, 27 – XDR и 9 – являлись чувствительными к противотуберкулезным препаратам. Два стандартных штамма - H37Rv и академический, а также изолят *M. bovis* были использованы в качестве контроля.

Ранее было доказано, что ДНК, полученная с помощью Cheex-100, являлась лучшим материалом для последующей очистки и длительного сохранения (около 1,5 лет при -20°C) [22].

ПЦР амплификация фрагмента *katG* длиной 620 п.о. была успешно проведена для всех чистых культур МБТ, включая стандартные, чувствительные, а также культуры с MDR и XDR (рис.1).

Ампликоны *katG* были исследованы методом рестриктивно-эндонуклеазного анализа ПДФР с использованием HpaII-расщепления. На основе полученных результатов были выделены 4 отдельных варианта ПДФР. Вариант А соответствовал отсутствию мутаций в обоих кодонах (KatG315 и KatG463). Вариант В указывал на мутантный кодон KatG463, но не KatG315, в отличие от варианта С, показывавшего обратное соотношение. Вариант D обозначал наличие мутаций в исследуемых кодонах (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Варианты, выявляемые в рестриктивно-эндонуклеазном анализе образцов

Варианты	А		В		С		D	
Количество кодонов	315	463	315	463	315	463	315	463
Количество нуклеотидов	944	1388	944	1388	944	1388	944	1388
Наличие мутаций	-	-	-	+	+	-	+	+

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, нами были обнаружены мутации в кодоне KatG463 в 33,3%, 57,8% и 59,2% включенных в исследование клинически восприимчивых, MDR и XDR изолятов, соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Результаты ПДФР KatG-гена

Состояние KatG463	Вид изолятов, абсолютное значение (%)			
	Чувствительные	MDR	XDR	Всего
Отсутствие мутаций	6 (66,7%)	46 (42,2%)	11 (40,7 %)	63 (43,5%)
Наличие мутаций	3 (33,3%)	63 (57,8%)	16 (59,2%)	82 (56,5%)
Итого	9 (100%)	109 (100%)	27 (100%)	145 (100%)

Стандартные штаммы H37Rv и академический не имели мутаций в кодоне KatG463, в то время как изоляты *M. bovis* соответствовали варианту реакции В, то есть имели мутации

в этом кодоне. В целом из 145 изолятов (помимо стандартных штаммов и *M. bovis*) в 82 случаях (56,5%) отмечались мутации в KatG463. С другой стороны, 6 (66,7%) из чувствительных изолятов не имели мутаций в данном кодоне, а 3 (33,3%) – содержали мутантный кодон.

Автоматическое ДНК-секвенирование ампликона KatG в отобранных случайным образом изолятах, как резистентных, так и чувствительных к изониазиду, выявило 100% соответствие точечных мутаций таковым, обнаруженным методом ПЦР-ПДФР (рис. 2).

Секвенирование ДНК также показало, что в пределах ампликона KatG размером 837 п.о. никаких мутаций кроме Arg/Leu463 не выявлялось. Таким образом, 100% всех секвенированных мутантных кодонов представляли собой Leu463.



Рисунок 1. Результаты ПЦР-ПДФР KatG-гена в клинических изолятах

Примечание: Варианты А, С — немутантный KatG463 и В, D — мутантный KatG463. а — изоляты с MDR трех различных типов и контрольное ПЦР фрагмента *katG* размером 620 п.о. (перед обработкой эндонуклеазой HpaII); б — стандартный штамм H37Rv, чувствительные изоляты (H232, H238) и четыре изолята с MDR с наличием как мутантных, так и немутантных форм KatG463