

Метод определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium abscessus* к макролидам и аминогликозидам

Богуш Л.С., Слизень В.В., Давидовская Е.И.

ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии»

Актуальность: Низкая эффективность лечения микобактериозов, вызванных *M. abscessus* тесно связана с индукцией полезных мутаций в гене *rrs*, сопряженных с резистентностью к аминогликозидам и в генах *rrl*, *erm*, сопряженных с резистентностью к макролидам [Нuh Y.J., 2019]. Закономерно, что обязательным условием для подбора эффективной схемы лечения пациентов с микобактериозами является выполнения теста на ЛЧ к лекарственным препаратам [Minh Vu-H Nguen, 2024; Daley C. L., 2020].

Цель исследования: разработать метод определения ЛЧ *M. abscessus* к макролидам и аминогликозидам и оценить его эффективность и чувствительность

Материал и метод исследования: культуры *M. abscessus*, расходные материалы для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Результаты: разработаны зонды и праймеры для определения мутаций в генах *rrl*, *rrs*, *erm* *M. abscessus* (таблица 1);

установлена последовательность выполнения следующих этапов:

- 1) подготовка биологического материала для исследования;
- 2) экстракция ДНК микобактерий из образцов материала для исследований;
- 3) определение мутаций устойчивости к макролидам в генах *erm*, *rrl* и к аминогликозидам — в гене *rrs* с помощью ПЦР-РВ;
- 4) учет и оценка результатов.

Таблица 1 - Зонды и праймеры для определения мутаций в генах *rrl*, *rrs*, *erm*

Сокращенное название	Назначение	Кол-во, пкмоль	Метка 5'	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка 3'
rrl ген A2058G, 2068/70-T/G	Прямой праймер RRL-2058F	20		TCGGGTAAGTTCGACCTGCACGA	
	Обратный праймер RRL-2058R	20		AGTCTCCCACCTATCCTACACAAAC	
	Зонд RRL-2058W	10	FAM	ACCGCGGCAGGAC[G]AAAAGA	BHQ1
	Зонд RRL-2058M (резистентности)	10	JOE	ACCGCGGCAGGACGAGAAGA	BHQ1
	Зонд RRL-T2068/70G (резистентности)	10	ROX	ATACCAAGCTATAGTGAAGGT	BHQ2
erm ген T28C	Прямой праймер F-erm	20		TGGAGCATGGGCATATTCATGATG	
	Обратный праймер R-erm	20		GGCAACCAGATGTGCCGTCAGCG	
	Зонд erm28-wildC	10	FAM	AGCGGATCCAGCCCCGCT	BHQ1
	Зонд erm28-mutT (резистентности)	10	JOE	AGCGGATCCAGCCCCACTG	BHQ1
rrs ген A1383G	Прямой праймер rrs1383-F	20		TCGACCCCATGAAGTCGGAGTCG	
	Обратный праймер rrs1383-R	20		GGTTAGGCCACTGGCTTCGGGA	
	Зонд 1383-A-rrs-w	10	FAM	ACACCGCCCGT[C]ACGTCA	BHQ1
	Зонд 1383-G-rrs-m (резистентности)	10	JOE	ACACCGCCCGTCGCGTCA	BHQ1
F-pTZ57R-CTRL ³	Прямой праймер BK ²	15		ACAATTCCATTCGCCATTCAGG	
R-pTZ57R F1-CTRL ³	Обратный праймер BK ²	15		CTCGAATTCAGTGGCCGTCGT	
ЗОНД-CTRL ³	Зонд BK	10	Cy5 (ROX)	AGTCGGCCCGGTCGGTTGC	BHQ2

Детекция мутации резистентности в генах проводится путем оценки уровней флюоресценции на каналах FAM, R6G, ROX и характера кривых флюоресценции в ходе проведения ПЦР и осуществляется прибором ПЦР-РВ (рисунок 1).

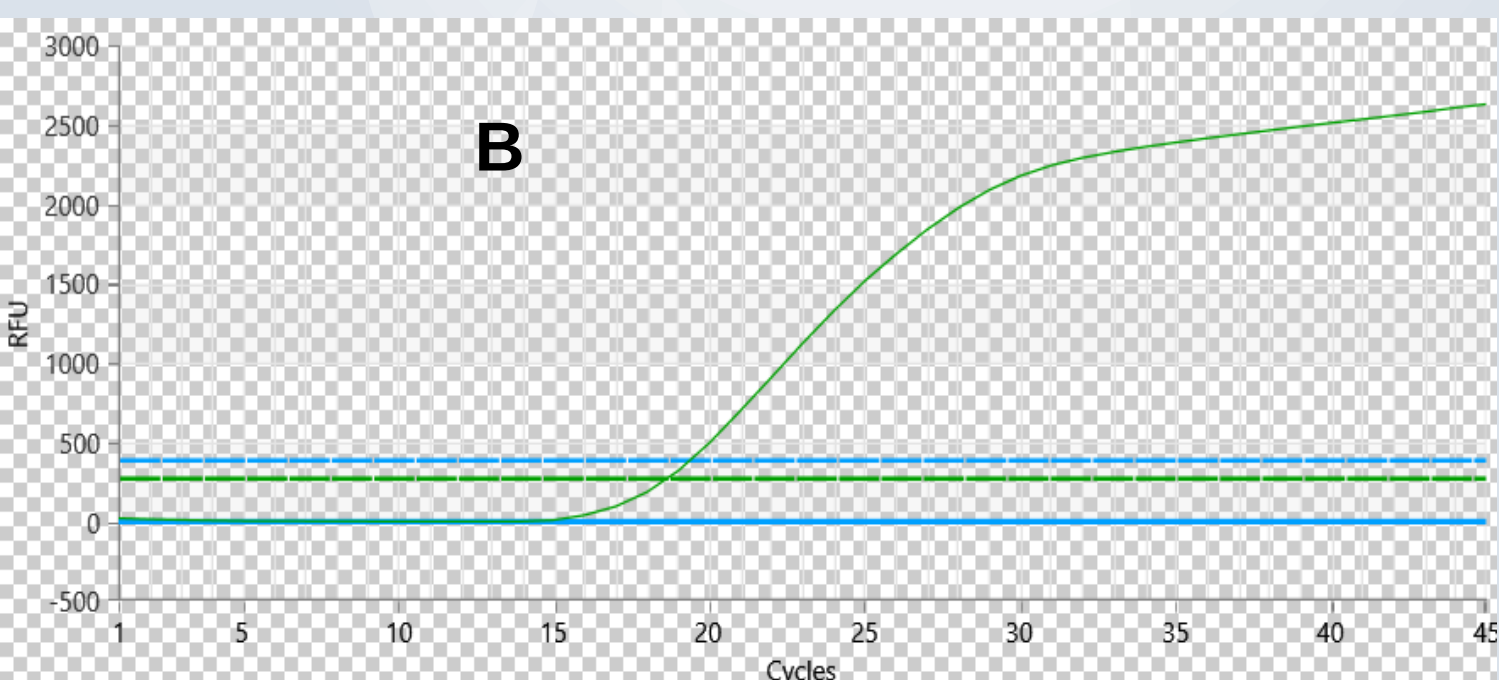
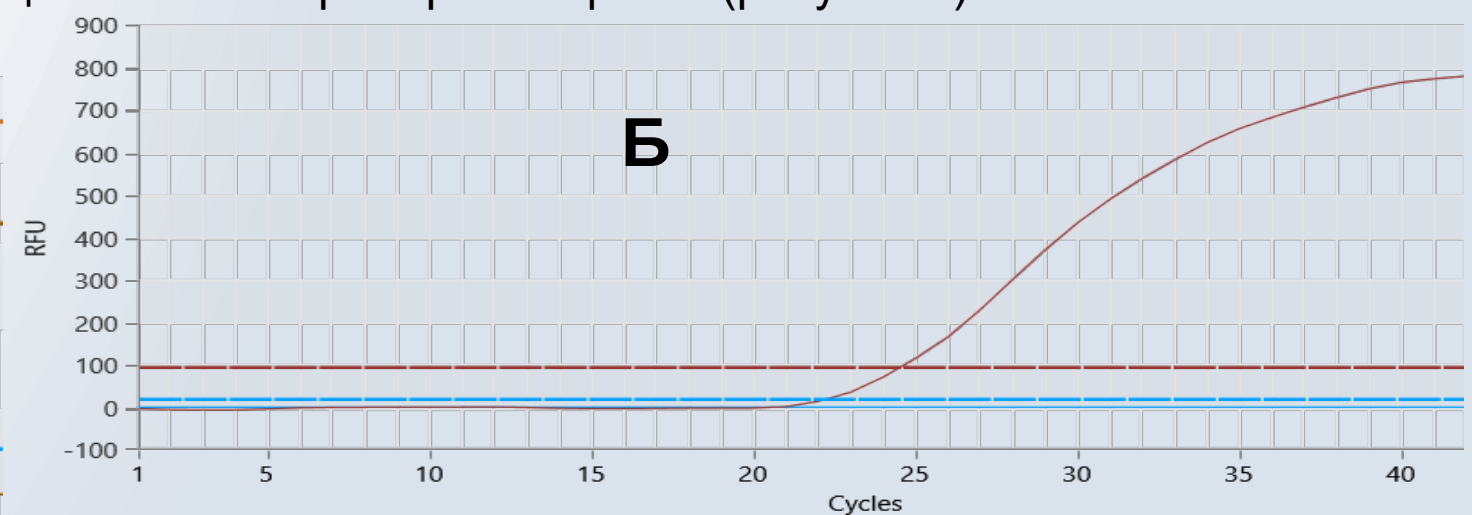
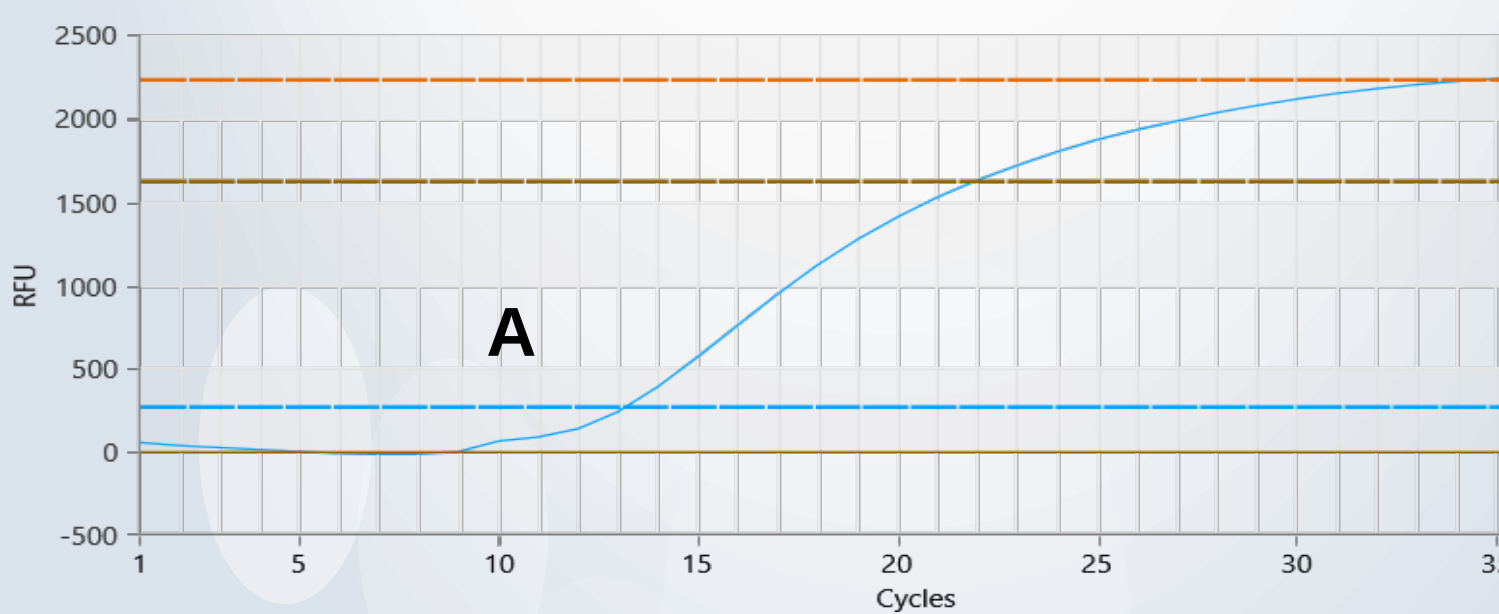


Рисунок 1 – Принцип определения мутаций устойчивости к макролидам и аминогликозидам у микобактерий комплекса *M. abscessus*

В случае отсутствия мутаций в генах, регистрируется флюоресценция выше пороговой на канале FAM, на канале R6G/JOE и ROX — флюоресценция ниже пороговой (А).

В случае мутации T2068/2070G в гене *rrl* регистрируется флюоресценция на канале ROX, на канале FAM флюоресценция ниже пороговой (Б).

В случае присутствия мутаций устойчивости к аминогликозидам — *rrs* A1383G и к макролидам — *erm*(41) T28C и *rrl* A2058G, у микобактерий комплекса *M. abscessus* отмечается рост флюоресценции на канале R6G/JOE, на канале FAM — флюоресценция ниже пороговой (В).

Вывод: метод определения ЛЧ *M. abscessus* к макролидам и аминогликозидам позволяет быстро выявлять устойчивые микобактерии на основании выявления мутаций в генах с использованием ПЦР-РВ; метод имеет высокую чувствительность и специфичность — 94 и 98%.