

Слизень В.В., Суркова Л.К., Залуцкая О.М. Метод детекции у *Mycobacterium tuberculosis* мутаций в 90 кодоне гена *gyrA*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам// Достижения медицинской науки, 2012

Название: Метод детекции у *Mycobacterium tuberculosis* мутаций в 90 кодоне гена *gyrA*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам

В.В. Слизень, Л.К. Суркова, О.М. Залуцкая

Тематическая рубрика в кодах государственного рубрикатора ГРНТИ

Название темы НИР: «Разработать тест-систему для молекулярной экспресс-идентификации и мониторинга лекарственной устойчивости к противотуберкулезным лекарственным средствам резервного ряда (фторхинолонам) при множественно лекарственно-устойчивом туберкулезе».

Сроки выполнения НИР: январь 2011 – декабрь 2013

Научный руководитель: Суркова Лариса Константиновна

Организация исполнитель: Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Белорусский государственный медицинский университет

Источники финансирования: Республиканский бюджет

Фторхинолоны приобретают значение в лечении туберкулеза, в связи с использованием их в качестве препаратов второго ряда для лечения множественно резистентного туберкулеза. Резистентность к фторхинолонам среди множественно лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* резко ограничивает возможность лечения и уменьшает шанс на успех терапии. Ранняя диагностика широко лекарственно устойчивого

туберкулеза позволяет своевременно скорректировать терапию и увеличить шанс на благоприятный исход заболевания. Определение спектра резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам с использованием классических методов занимает до 3 месяцев, что диктует необходимость разработки методов экспресс диагностики лекарственно устойчивых *M. tuberculosis*. Устойчивость к фторхинолонам связана у 60 - 90% изолятов *M. tuberculosis* с мутациями в кодонах 90, 91, 94 гена *gyrA*, что позволяет рассматривать эти кодоны как маркеры резистентности к фторхинолонам, и как индикаторы широкой лекарственной устойчивости микобактерий.

Цель работы - разработать метод ранней диагностики широкой лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

Кодон 90 *gyrA* гена *M. tuberculosis* (код доступа к сиквенсу *gyrA* гена *M. tuberculosis* H37Rv – NC_000962.2, GenBank, NCBI) характеризуется присутствием *gcg* в положениях 268, 269, 270 соответственно. Мутация в этом кодоне, ассоциированная с устойчивостью к фторхинолонам, происходит в положении 269 и сопровождается заменой *gcg* на *gtg*. Для выявления мутации в 90 кодоне *gyrA* гена нами разработан метод ПЦР в реальном времени с системой двойного распознавания, когда в каждый образец реакционной смеси вносят два праймера (прямой GYR-F-200/218 5'-ACCGCAGCCACGCCAAGTC-3' и обратный GYR-R-358/339 5'-CTGGCGAGCCGAAGTTGCC-3') два зонда, один из которых специфически взаимодействует с мутантным типом кодона и мечен R6G, а второй

специфически взаимодействует с диким (немутированным) типом кодона и мечен FAM. В пробах с *M. tuberculosis*, имеющими мутации в 90 кодоне *gyrA* гена, регистрируется флюоресценция выше пороговой для R6G-зонда (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм), в то время как FAM-зонд (возбуждение – 520 нм, экстинкция – 548 нм) к «дикому» типу не флюоресцирует. В пробах с *M. tuberculosis*, не имеющих мутации, флюоресцирует FAM-зонд к "дикому типу", в то время как R6G -зонд к «мутантному» типу не флюоресцирует. Определение флюоресценции проводят для проб исследуемой ДНК, для положительных контрольных образцов, отрицательных контрольных образцов, фона. Для выявления точечных мутаций в кодоне 90 *gyrA* гена *M. tuberculosis* используют уникальные последовательности праймеров, амплифицирующих *gyrA* ген, и уникальные последовательности зондов, специфичных к «дикому» (gcg) и мутантному (gtg) 90-му кодону *gyrA* гена. В реакционные смеси введены присадки, которые оптимизируют ПЦР реакцию и повышают ее чувствительность и специфичность. Примеры получаемых результатов и их интерпретация с использованием данного способа приведена на рисунке 1.

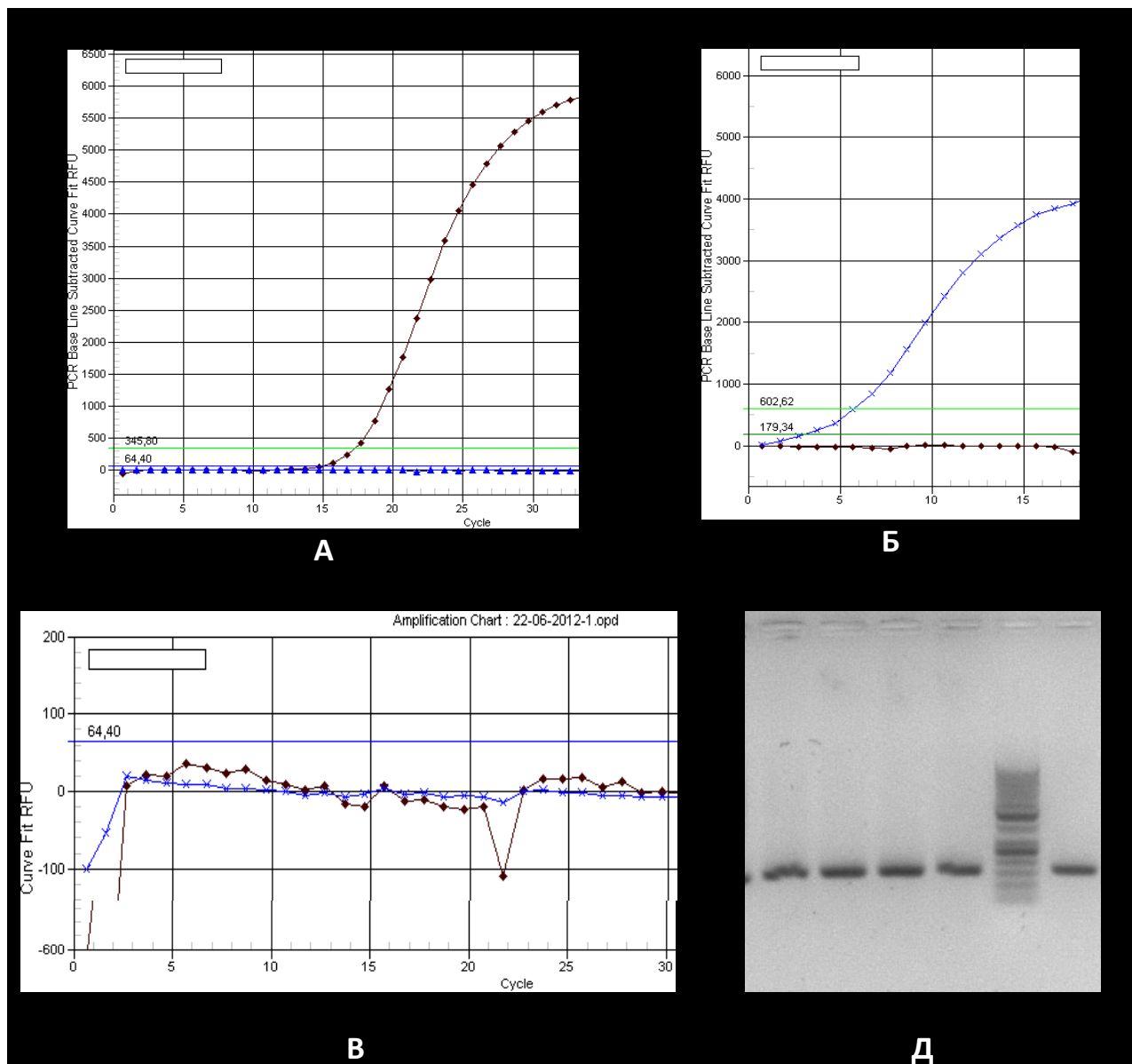
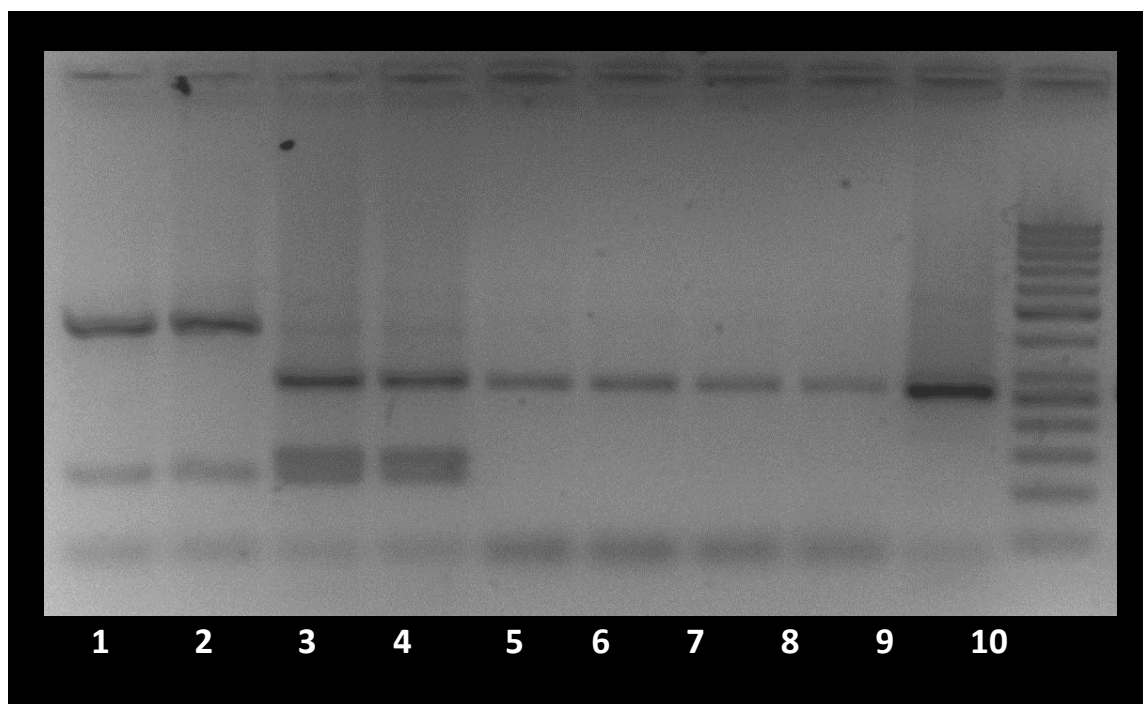


Рисунок 1. Выявление мутации *gcg/gtg* в 90-м кодоне *gyrA* для диагностики устойчивости к фторхинолонам у *M. tuberculosis*

А – Результаты для штамм 717 *M. tuberculosis* без мутации в 90-м кодоне :- флюоресценция регистрируется на FAM-канале, в то время как флюоресценция R6G – зонда ниже пороговой; Б – Результаты для штамм 604 с мутацией в 90-м кодоне: флюоресцирует R6G –зонд, в то время как FAM-зонд не флюоресцирует. В – кривые флюоресценции в контроле без ДНК; Д – ампликоны размером 158 п.о., образуемые в ПЦР *gyrA* с разработанными праймерами, на рисунке приведен маркер молекулярного веса 50 bp;

С целью подтверждения присутствия мутации сопровождающейся заменой цитозина на тимин в положении 269 *gyrA* гена *M. tuberculosis* проводили рестрикцию с помощью BstUI *cg|cg* ампликона *gyrA* гена размером 320, получаемых с помощью пар праймеров 320-*gyr*-F-*caactacatcgactatgcga* и 320-*gyr*-R-*gggctncggtgtacctcat*. Появление мутации в положении 269 *gyrA* гена приводит к исчезновению сайта рестрикции BstUI *cg|cg*, что сопровождается изменением профиля образуемых рестрикционных фрагментов (рисунок 2).



1, 2 – профили рестрикции у штаммов 604 и 535 *M. tuberculosis* с мутацией 90-м кодоне; 3, 4 – профили рестрикции у штаммов 717 и 597 без мутации в 90-м кодоне *gyrA*; 5 – 6 – ампликоны *gyrA* гена, получаемые в ПЦР и подвергающиеся рестрикции эндонуклеазой BstUI *cg|cg*; 10 – маркер молекулярного веса 50 bp

Рисунок 2 – Результаты рестрикции с использованием ампликона *gyrA* гена (размером 320 п.о.) у штаммов *M. tuberculosis* с мутацией и без мутации в 90-м кодоне

Культуру микобактерий с мутацией в 90 кодоне, выявленной в ПЦР в реальном времени и подтвержденной в рестрикционном анализе, следует считать устойчивой к фторхинолонам.

Сравнение результатов секвенирования с результатами разработанного метода показало эффективность разработки в выявлении мутаций gcg/gtg, в 269 нуклеotide кодона 90 гена *gyrA*.

Таким образом, разработанный метод направлен на выявление замены нуклеотидов gcg—gtg, происходящей в 269 нуклеotide кодона 90 гена *gyrA*, что позволяет проводить раннюю диагностику устойчивости к фторхинолонам у *M. tuberculosis*. Метод предполагает проведение следующих стадий: 1) выделение стандартным способом ДНК из образцов диагностического материала или чистых культур микобактерий; 2) проведение ПЦР в реальном времени с парными зондами для выявления мутаций в 90 кодоне *gyrA* гена; 3) подтверждение присутствия мутации с использованием рестрикции ампликона гена *gyrA* размером 320 п.о. ферментом BstUI cgc|cg. В работе использованы новые последовательности зондов и праймеров.

Annotation

Method of mutation detection in *gyrA*-90 for early diagnosis of resistance to fluoroquinolons in *Mycobacterium tuberculosis*

V.V. Slizen, L.K. Surkova, O.M. Zalutskaya

Resistance to fluoroquinolones among multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* reduces the chance of treatment success. Early diagnosis of extensively drug-resistant tuberculosis allows to adjust therapy and increases the probability of a favorable outcome. The aim of the study was to develop a method of early diagnosis of drug-resistant *M. tuberculosis* via detection of resistance associated mutation in codon 90 of gyrA gene. To detect gcg/gtg mutation in codon 90 of gyrA gene we have developed the real-time PCR method with dual fluorogenic probes. The method comprises the following steps: 1) extraction of DNA from samples; 2) a real-time PCR with new sequences of primers and dual fluorogenic probes for identification of gcg/gtg mutation in codon gyrA-90; 3) confirmation of mutation presence by restriction of 320 bp amplicon of gyrA gene with enzyme BstUI cg | cg. The data got by this method correspond with the results of gyrA gene sequencing. *M. tuberculosis* with the mutation in codon 90, detected by real-time PCR and confirmed by a restriction analysis, should be considered resistant to fluoroquinolones.