

М. Л. Филипенко¹, М. А. Дымова¹, Е. А. Храпов¹,
У. А. Боярских¹, Т. И. Петренко², А. Г. Чередниченко²,
У. А. Кожамкулов³, Е. М. Раманкулов³

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Научно-исследовательский институт туберкулеза
ул. Охотская, 81 А, Новосибирск, 630040, Россия

³ Национальный центр биотехнологии Казахстана
ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Республика Казахстан

E-mail: max@niboch.nsc.ru

СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К РИФАМПИЦИНУ ИЗОЛЯТОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* *

Разработан быстрый и недорогой метод детекции мутаций в «коровом» регионе гена *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы *Mycobacterium tuberculosis*, вызывающих устойчивость к антитуберкулезному препарату рифампицину. Метод основан на пост-ПЦР анализе кривых плавления с высоким разрешением амплифицированных фрагментов ДНК с использованием коампликации тестируемой ДНК и ДНК дикого типа. При анализе ДНК из рифампицин-чувствительных и устойчивых изолятов, несущих тестируемую мутацию, метод показал 100 % чувствительность и специфичность. Суммарное время проведения анализа, начиная с выделения ДНК из биологического образца (бактериальные клетки или мокрота), не превышает 5,5 ч.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, лекарственная устойчивость, мутации.

Антибиотикоустойчивость у микобактерий туберкулезного комплекса – достаточно хорошо изученное явление с точки зрения молекулярно-генетических механизмов. Описаны мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду, этамбутолу, пипразинамиду, рифампицину и другим противотуберкулезным препаратам [1]. Рифампицин активно используется как противотуберкулезный препарат, имея минимально ингибирующую концентрацию (МИК) 0,1–0,2 мкг/мл. Механизм действия антибиотика состоит во взаимодействии с РНК-полимеразой и ингибировании процесса транскрипции. Показано, что 95 % устойчивых

изолятов имеют мутации в «коровом» регионе гена *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы размером 81 п. н. Наиболее часто мутации возникают в 531 (Ser → Leu) и 526 (His → Tyr) кодонах. С возникновением устойчивости к рифампицину также ассоциированы другие нуклеотидные замены: в 511, 515, 516, 526 и других кодонах, встречающиеся значительно реже.

Определение устойчивости микобактерий классическими бактериологическими методами занимает 1–2 мес., которые можно считать «потерянными» для больного. В настоящее время разработан ряд методов,

* Работа проведена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (гос. контракт № 11.519.11.2013).

позволяющих диагностировать лекарственную устойчивость микобактерий к рифампицину посредством прямого выявления мутаций в «коровом» регионе гена *rpoB* с использованием различных молекулярно-генетических подходов [1]. Методы выявления лекарственной резистентности, основанные на анализе ДНК микобактерий, выполняются в течение нескольких дней, показывают достаточную специфичность и чувствительность. Существует насущная необходимость уменьшения их цены, упрощения их выполнения, увеличение их надежности и адаптации к клинико-диагностическим лабораториям фтизиатрических учреждений.

В 1997 г. предложен новый вид анализа продуктов ПЦР, основанный на использовании интеркалирующих флуоресцентных красителей ДНК и возможностей оборудования для проведения ПЦР в режиме «реального времени» [2]. После проведения стандартной ПЦР реакционная смесь, содержащая амплифицированный фрагмент ДНК, подвергается нагреванию, что приводит к переходу фрагмента ДНК из двухцепочечной формы в одноцепочечную, диссоциации красителя и снижению уровня флуоресценции. В результате получается характерная кривая плавления, специфичная для конкретного ПЦР-фрагмента. Попытки увеличения информативности флуоресцентного мониторинга плавления ДНК привели к появлению метода анализа кривых плавления с высоким разрешением (high resolution melting curve analysis – HRM, HRMA, HRMCA) [3]. Мутации в пределах анализируемого ПЦР-фрагмента ДНК приводят к небольшим изменениям температуры плавления, что сдвигает кривую по оси значения температуры или, в отдельных случаях, меняет ее форму. Ранее описано применение HRM-анализа для быстрой детекции мутаций, вызывающих лекарственную устойчивость у микобактерий туберкулеза [4–6]. Однако описанные подходы не позволяют достичь высоко воспроизводимых результатов, что особенно важно в клинической практике.

Цель исследования – модифицировать HRM-анализ для разработки быстрого, недорогого и воспроизводимого метода детекции мутаций в «коровом» регионе гена *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*, вызывающих устойчивость к рифампицину.

Материал и методы

В работе использовали 5 мМ раствор SYTO9 в DMSO («MolProbe», США), 2 мМ dNTP (ИХБФМ СО РАН), термостабильную ДНК-полимеразу Taq-cold (20 ед/мкл) (ИХБФМ СО РАН).

Для анализа использована ДНК 61 изолята микобактерий туберкулезного комплекса, выделенных от больных с легочными формами туберкулеза, проживавших на территории Северо-Западного и Западно-Сибирского регионов Российской Федерации за период 2000–2008 гг. Выделение ДНК из культуры *M. tuberculosis* проводилось согласно описанной методике [7].

Устойчивость к антибиотикам определялась согласно приказу Минздрава СССР № 558 от 08.06.1978 «Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе» методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна – Йенсена. Рекомендованы следующие концентрации препаратов: стрептомицин – 10 мкг/мл; изониазид – 1; рифампицин – 40; этамбутол – 5 и канамицин – 30 мкг/мл. ПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 67 мМ трис-HCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 % Твин 20, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров (Rpo11 5'-GACGTGGAGG CGATCACAC и Rpo12 5'-GGCACGCTCA CTTGACAGAC) и 1 ЕД/акт Taq-полимеразы. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США) с начальной денатурацией при 96 °С в течение 2 мин, далее 35 циклов с денатурацией при 95 °С в течение 5 с, отжигом праймеров при 63 °С в течение 5 с и синтезом при 72 °С в течение 5 с. Для анализа кривой плавления ПЦР смесь нагревали до 96 °С 5 мин, далее инкубировали минуту при температуре 63 °С и проводили плавление со скоростью 0,2 °С на один шаг снятия флуоресцентного сигнала, вплоть до 96 °С. Для оценки качества ПЦР-аликвоты реакции фракционировали в 6 % полиакриламидном геле. Для HRM-анализа использовали «Precision Melt AnalysisTM Software» («Bio-Rad», США).

Результаты исследования и обсуждение

Ранее с помощью прямого секвенирования отобрано 14 изолятов ДНК *M. tuberculosis*, устойчивых к рифампицину и несущих мутации в разных положениях гена *rpoB*

(см. таблицу). Кроме того, в работе использовали три чувствительных к рифампицину изолята без мутаций и референтный штамм H37Rv. Получена ДНК описанных изолятов. Кроме того, в коллекции были 12 образцов ДНК из мокроты, образцы которой были идентифицированы как «положительные» бактериальным посевом с последующим выделением ДНК из полученных бактериальных культур. Из них 2 образца несли мутацию Ser531Leu и 10 – не содержали мутаций коровой области гена *rpoB*, что выяснено в результате амплификации и секвенирования «корового» района *rpoB* на геномной ДНК из выделенных культур. Полученную коллекцию ДНК с описанными фенотипическими и генотипическими характеристиками использовали для разработки метода скрининга мутаций в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* с помощью HRM-анализа.

На первом этапе произведена попытка классифицировать тестируемые образцы

ДНК по наличию мутаций с помощью классического HRM-анализа с применением интеркалирующего красителя SYTO9. После тщательной оптимизации ПЦР удалось правильно классифицировать большую часть образцов с мутацией и без них (см. таблицу). Так, наиболее распространенная мутация Ser531Leu (531 TCG → TTG, транзигция) надежно выявлялась даже при использовании в качестве интеркалирующего красителя SybrGreen I – более дешевого, но не являющегося насыщающим для ДНК при используемых концентрациях. Однако воспроизводимость детекции транверсий 516 GAC → GTC и 526 CAC → CTC была неудовлетворительной. В связи с этим предприняты попытки модифицировать метод для увеличения надежности дифференцирования вариантов с мутацией и без нее. Известно, что при анализе однонуклеотидных замен (SNP) в геноме человека методом HRM наиболее надежно выявляются гетерозиготы. Это обусловлено тем, что после

Изоляты *M. tuberculosis*, использованные в исследовании

№	Изолят	Резистентность к рифампицину	Мутация <i>rpoB</i>	Выявление HRM	Выявление модифицированным HRM
1	52	0	нет	0	0
2	451	0	нет	0	0
3	321	0	нет	0	0
4	387	1	531 TCG → TTG	1	1
4	399	1	531 TCG → TTG	1	1
5	210	1	531 TCG → TTG	1	1
6	367	1	516 GAC → GTC	0	1
7	319	1	516 GAC → GTC	1	1
8	372	1	516 GAC → GTC	1	1
9	379	1	526 CAC → TAC	1	1
10	290	1	526 CAC → TAC	1	1
11	7	1	526 CAC → CTC	0	1
12	389	1	526 CAC → CTC	0	1
13	378	1	526 CAC → CTT	1	1
14	5	1	526 CAC → AAC	1	1
15	420	1	511CTG → CCG, 515ATG → ATA	1	1
16	301	1	533CCG	1	1
17	2	1	513 CAA → AAA	1	1

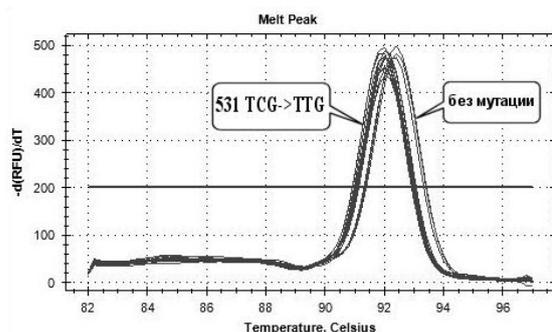


Рис. 1. Выявление транзиции 531 TCG → TTG в гене *groB* методом HRM с использованием интеркалирующего красителя SybrGreenI. Графически представлена кривая плавления продуктов амплификации: ось ординат – значения отрицательной производной интенсивности флуоресценции по температуре; ось абсцисс – температура, °C

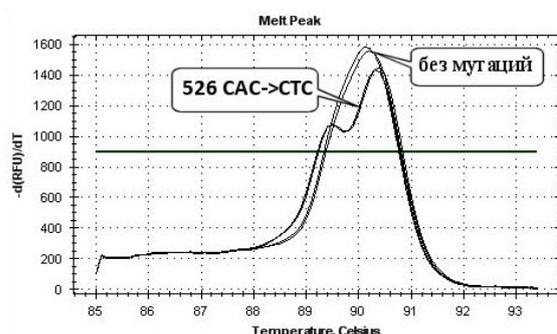


Рис. 2. Выявление трансверсии 526 CAC → CTC в гене *groB* методом HRM с использованием коамплификации тестируемой ДНК и ДНК дикого типа. Графически представлена кривая плавления продуктов амплификации: ось ординат – значения отрицательной производной интенсивности флуоресценции по температуре; ось абсцисс – температура, °C

плавления ампликонов двух типов и их дальнейшей реассоциации образуются молекулы четырех типов – две исходных и две, несущие неспаренные основания (мисматчи) в области SNP, обладающие значительно более низкой температурой плавления. Суперпозиция кривых плавления этих фрагментов ДНК дает характеристическую кривую, которая часто содержит два перегиба и значительно отличается от кривой плавления ампликона дикого типа. Этот факт использован в целом ряде исследований по скринингу высокопенетрантных мутаций для моногенных заболеваний человека [8].

Мы предположили, что формирование «искусственных» гетеродуплексов с помощью коампликации ДНК дикого типа и тестируемой ДНК поможет увеличить надежность анализа. Для этого в качестве первого этапа мы провели уравнивание концентраций анализируемых ДНК и референтной (дикого типа): проведена количественная ПЦР с той же парой праймеров (Rp011 / Rp012) с построением калибровочной кривой. С использованием регрессионного уравнения, построенного на данных калибровочной кривой, определены концентрации ДНК, проведено их уравнивание путем разведения до концентрации наименее концентрированной ДНК. Для проведения HRM-анализа мутаций в *groB* гене смешивали равное количество тестируемой ДНК и ДНК H37Rv, проводили амплификацию с финальным циклом денатурации и реассоциации для более эффективного формирования гетеродуплексов, фиксировали кривую плавления.

Для оценки способности модифицированного HRM-анализа детектировать мутации в гене *groB* проводили три серии экспериментов, каждая ДНК анализировалась при трехкратном повторе. При таком типе анализа мы смогли правильно дифференцировать все 14 изолятов с мутациями и 3 изолята дикого типа как с помощью визуального анализа кривых плавления экспериментальных образцов с соответствующими контрольными, так и с помощью специализированного программного обеспечения. Уникальные HRM-профили «дикого типа», ампликонов полученных на ДНК изолятов с транзициями и трансверсиями показаны на рис. 1, 2.

Далее проведена попытка применить оптимизированный метод для анализа ДНК из мокроты пациентов с известным статусом мутаций гена *groB*. Нам удалось правильно классифицировать два образца с мутацией Ser531Leu и девять образцов без мутации. В одном случае результаты ПЦР на ДНК из мокроты были негативными. Таким образом, предложенный подход обладает высокой специфичностью и чувствительностью при прямом анализе ДНК, выделенных из мокроты. Тем не менее для значимого определения указанных выше параметров необходимо тестирование метода на выборке значительно большего объема.

Впервые применение HRM для выявления мутаций в гене *rpoB* описано К. Г. Ноек и соавт. [4]. Они использовали формирование искусственных гетеродуплексов при анализе гаплоидного генома микобактерий для увеличения чувствительности детекции мутаций. Однако исследователи раздельно амплифицировали ДНК дикого типа и тестируемый образец, затем смешивали ампликоны и проводили фиксирование кривой плавления. В таком исполнении метод теряет гомогенность и теоретически имеет высокую вероятность ложных результатов ввиду склонности к кросс-контаминации ампликонами любых типов. А. Т. Pietzka и соавт. [5] также сообщали об относительно высоком (90 %) уровне чувствительности при детекции рифампициновой резистентности на малом количестве образцов. В то же время в работе Г. Е. Choi и соавт. [6] при использовании интеркалирующего красителя Eva Green достигнута близкая к 100 % чувствительность при одностадийном классическом HRM.

В нашем исследовании не удалось добиться стопроцентной чувствительности при выявлении мутаций в «коровой» области гена *rpoB* при использовании обычного HRM-анализа. Схожие проблемы описаны в статье М. V. Ramirez и соавт. [9]. Они отмечали низкую чувствительность выявления трансверсий в 516 и 526 кодонах, для решения этой проблемы они ввели две LNA-модифицированные пробы, что существенно увеличивало стоимость анализа. При такой реализации метода удалось добиться 91 % чувствительности и 98 % специфичности выявления рифампициновой резистентности на представительной выборке более 200 изолятов.

В проведенном исследовании показано, что интеркалирующий краситель SYBR Green I позволяет надежно осуществлять дискриминацию нуклеотидной замены С → Т в 531 кодоне гена *rpoB*. Индекс дискриминации не улучшается при использовании «насыщающего», широко применяемого для HRM-анализа, красителя SYTO9. Возможно, этот эффект связан с высоким (около 75 %) GC-содержанием ПЦР-фрагмента, что делает связывание SYBR Green I более эффективным и улучшает разрешение кривых плавления [10].

В противоположность к изониазиду, у 80–90 % штаммов *M. tuberculosis* устойчи-

вость к рифампицину обусловлена точковыми мутациями в небольшой области (81 п. о.) гена *rpoB*, кодирующей аминокислоты с 507 по 533 (кластер I) [11]. Более 90 % изолятов, устойчивых к рифампицину, также устойчивы и к изониазиду [12]. Таким образом, скрининг устойчивости к рифампицину с использованием предложенного нами подхода, учитывая его быстроту и низкую себестоимость, может быть эффективен для установления MDR-туберкулеза.

Заключение

Разработан метод для детекции мутаций в гене *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*, который обладает высокой чувствительностью и специфичностью (100 %), а также наиболее низкой стоимостью среди описанных к настоящему времени альтернативных подходов, имеет высокий уровень надежности и воспроизводимости. Суммарное время проведения анализа, начиная с выделения ДНК из биологического образца (бактериальные клетки или мокрота), не превышает 5,5 ч. Разработанный метод хорошо адаптируем к инструментальным возможностям современных клинико-диагностических лабораторий и, таким образом, уже в настоящее время может быть использован во фтизиатрической практике.

Список литературы

1. *Laurenzo D., Mousa S. A. Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis and Current Status of Rapid Molecular Diagnostic Testing // Acta Trop. 2011. Vol. 119, № 1. P. 5–10.*
2. *Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During the Polymerase Chain Reaction // Anal. Biochem. 1997. Vol. 245, № 2. P. 154–160.*
3. *Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., Vandersteen J. G., Pryor R. J. High-resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen // Clin. Chem. 2003. Vol. 49. P. 853–860.*
4. *Hoek K. G., Gey van Pittius N. C., Moolman-Smook H., Carelse-Tofa K., Jordaan A., Spuy G. D. van der, Streicher E., Victor T. C., Helden P. D. van, Warren R. M. Fluorometric Assay for Testing Rifampin Sus-*

ceptibility of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex // J. Clin. Microbiol. 2008. Vol. 46. P. 1369–1373.

5. Pietzka A. T., Indra A., Stoger A., Zeininger J., Konrad M., Hasenberger P., Allerberger F., Ruppitsch W. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates by *rpoB* Gene Scanning Using High-resolution Melting Curve PCR Analysis // J. Antimicrob. Chemother. 2009. Vol. 63. P. 1121–1127.

6. Choi G. E., Lee S. M., Yi J., Hwang S. H., Kim H. H., Lee E. Y., Cho E. H., Kim J. H., Kim H. J., Chang C. L. High-resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 11. P. 3893–3898.

7. Soolingen D. van, Borgdorff M. W., De Haas P. E. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in the Netherlands: a Nationwide Study from 1993 through 1997 // J. Infect. Dis. 1999. Vol. 180, № 3. P. 726–736.

8. Vossen R. H., Aten E., Roos A., Dunnen J. T. den. High-resolution Melting Analysis (HRMA): More than just Sequence Variant

Screening // Hum. Mutat. 2009. Vol. 30. P. 860–866.

9. Ramirez M. V., Cowart K. C., Campbell P. J., Morlock G. P., Sikes D., Winchell J. M., Posey J. E. Rapid Detection of Multidrug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* by Use of Real-time PCR and High-resolution Melt Analysis // J. Clin. Microbiol. 2010. Vol. 48, № 11. P. 4003–4009.

10. Giglio S., Monis P. T., Saint C. P. Demonstration of Preferential Binding of SYBR Green I to Specific DNA Fragments in Real-time Multiplex PCR // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31, № 22. E136.

11. Drobniowski F. A., Wilson S. M. The Rapid Diagnosis of Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* – A Molecular Story // J. Med. Microbiol. 1998. Vol. 47. P. 189–196.

12. Dye C., Espinal M. A., Watt C. J., Mbiaga C., William B. G. Worldwide Incidence of Multidrug-resistant Tuberculosis // J. Infect. Dis. 2002. Vol. 185. P. 1197–1202.

Материал поступил в редколлегию 06.11.2011

M. L. Filipenko, M. A. Dymova, E. A. Khrapov, U. A. Boyarskikh, T. I. Petrenko,
A. G. Cherednichenko, U. A. Kozhamkulov, E. M. Ramankulov

METHOD FOR DETECTION OF RIFAMPICIN RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES

Developing rapid and low-cost method for detection of rifampicin resistance mutations in the core region of the *rpoB* gene encoding of β -subunit of *Mycobacterium tuberculosis* RNA-polymerase. The method is based on post-PCR melting curves analysis of PCR product amplified from wild type and tested DNA mix. All of the 14 rifampicin resistant isolates and all 3 susceptible isolates were correctly identified by our method providing 100 % sensitivity and specificity. Total time for analysis performance did not exceed of 5 and half hours.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, mutations.