

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА И ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ МУТАЦИЙ ГЕНА *embB* МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА, АССОЦИИРУЕМЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЭТАМБУТОЛУ, МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Ю. С. АЛЯПКИНА^{1,2}, Е. Е. ЛАРИОНОВА³, Т. Г. СМЕРНОВА³, Я. И. АЛЕКСЕЕВ^{1,4}, Л. Н. ЧЕРНОУСОВА³, М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ²

¹ООО «НПФ «Синтол», Москва, Россия

²НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

³ФГБНУ «ЦНИИ туберкулеза», Москва, Россия

⁴ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

На основе технологии аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени изучен спектр возможных мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированного с устойчивостью к этамбутолу. Выявлено 5 различных мутаций в кодоне 306 и 3 мутации – в кодоне 406 гена *embB*. Выявленные мутации подтверждены методами секвенирования и масс-спектрометрии. В результате анализа частоты встречаемости выявленных *embB* мутаций разработан набор реагентов для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к этамбутолу методом мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Из 107 исследованных образцов клинических изолятов в 49 (45,8%) обнаружены мутации гена *embB* МБТ, в 58 (54,2%) – мутаций не обнаружено. В 39 (36,4%) образцах выявлены мутации в 306-м кодоне гена *embB*, в 9 (8,4%) – обнаружены мутации в 406-м кодоне, и 1 (0,9%) образец определен с мутациями и в 306-м, и в 406-м кодонах. Высокий уровень совпадения результатов молекулярно-генетического и бактериологического анализа лекарственной чувствительности/устойчивости (84%) показал высокую значимость мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ и необходимость их обязательного определения для выявления этамбутол-устойчивых штаммов МБТ. При использовании молекулярно-генетического анализа установлен уровень чувствительности исследования 75,8% при специфичности относительно стандартных культуральных методов 95,6%.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, этамбутол, аллель-специфичная ПЦР в реальном времени

Для цитирования: Аляпкина Ю. С., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Алексеев Я. И., Черноусова Л. Н., Владимирский М. А. Изучение спектра и частоты встречаемости мутаций гена *embB* микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциируемых с устойчивостью к этамбутолу, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 11. – С. 27-35. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-27-35

INVESTIGATION OF RANGES AND FREQUENCY OF MUTATIONS IN THE *embB* GENE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ETHAMBUTOL USING REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

YU. S. ALYAPKINA^{1,2}, E. E. LARIONOVA³, T. G. SMIRNOVA³, YA. I. ALEKSEEV^{1,4}, L. N. CHERNOUSOVA³, M. A. VLADIMIRSKIY²

¹NPF Sintol, Moscow, Russia

²Research Institute of Phthisiopulmonology of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

⁴All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Based on real-time allele-specific polymerase chain reaction, the ranges of potential mutations in codons of 306 and 405 of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* associated with resistance to ethambutol were investigated. 5 different mutations were detected in codon 306 and 3 mutations were found in codon 406 of the *embB* gene. The detected mutations were confirmed by sequencing and mass spectrometry. By analyzing the frequency of detected mutations of , the set of reagents was developed for rapid testing of susceptibility tuberculous mycobacteria to ethambutol by multi-competitive allele-specific real-time PCR. Out of 107 tested specimens of clinical isolates, mutations of the *embB* gene of *M. tuberculosis* were detected in 49 (45.8%) specimens, and no mutations were found in 58 (52.2%) specimens. 39 (36.4%) specimens had mutations in codon 306 of the *embB* gene, and 9 (8.4%) specimens had a mutation in codon 406, and 1 (0.9%) specimen had mutations in both codons 306 and 406. The high level of agreement in the results of molecular genetic and bacteriological tests (84%) proved the significance of mutations in codons 306 and 406 of the *embB* gene in *M. tuberculosis* and the need for their identification in order to detect ethambutol resistant strains of *M. tuberculosis*. When using molecular genetic tests, the sensitivity level made 75.8%, while the specificity of standard culture-based methods makes 95.6%.

Key words: tuberculous mycobacteria, drug resistance, ethambutol, real-time allele-specific PCR

For citations: Alyapkina Yu.S., Larionova E.E., Smirnova T.G., Alekseev Ya.I., Chernousova L.N., Vladimirovskiy M.A. Investigation of ranges and frequency of mutations in the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* associated with resistance to ethambutol using real-time polymerase chain reaction. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 11, P. 27-35. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-11-27-35

Этамбутол (EMB) [(S,S')-2,2'-(этилендиимино)ди-1-бутанол] является препаратом первого ряда, который используется в сочетании с изониазидом (INH), рифампицином (RMP) и пиразинамидом (PZA) для профилактики возникновения лекарственной устойчивости. Открыт в 1961 г. при скрининге случайно выбранных соединений на противотуберкулезную активность [3]. EMB – это бактериостатический препарат, который обладает специфическим действием против размножающихся микобактерий и не оказывает никакого влияния на бактерии, не участвующие в репликации. EMB препятствует биосинтезу арабиногалактана в клеточной стенке. Он тормозит процесс полимеризации арабиноарабиногалактана и липоарабиноманнана в оболочке клетки и индуцирует накопление D-арабинофуранозил-Р-декапrenoла, являющегося промежуточным продуктом биосинтеза арабиана [10]. Мутации, вызывающие устойчивость, могут быть локализованы в группе генов, кодирующих трансмембранные белки арабинозил-трансферазы, названной *emb*-оперон – *embCAB*. У *M. tuberculosis* *emb*-оперон состоит из трех арабинозил-трансфераз – *embC*, *embA*, *embB*, которые гомологичны между собой на 60% и, по-видимому, возникли путем дупликации гена [3].

Мутации, вызывающие устойчивость к EMB на уровне оперона *embCAB*, происходят с частотой 10^{-5} . Чаще всего при анализе устойчивых к EMB клинических изолятов наблюдаются мутации в кодоне 306 гена *embB*: на них приходится не менее 68% резистентных штаммов [8-10].

В последнее время появились сообщения о мутациях, возникающих в кодоне 406 гена *embB* и также вызывающих устойчивость к этамбутолу [5-7]. По всей вероятности, это второй по значимости кодон после 306, мутации в котором могут встречаться достаточно часто и приводят к устойчивости к этамбутолу. Спонтанные мутации, возникающие в других кодонах гена *embB* (497 и др.) и других генах оперона *embCAB*, не играют важной роли в формировании устойчивости.

Цель работы: изучение спектра и частоты встречаемости мутаций в гене *embB* микобактерий туберкулезного комплекса (МБТ), ассоциированных с устойчивостью к этамбутолу, и сравнение полученных генетических характеристик штаммов с данными бактериологического анализа. Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение № 14.579.21.0012 от 05 июня 2014 г.; уникальный идентификатор RFMEFI57914X0012). При выполнении работы использовали оборудование Центра коллективного пользования «Биотехнология» ВНИИСБ.

Материалы и методы

Штаммы и образцы

Всего исследовано 107 клинических изолятов МБТ: 16 клинических изолятов *M. tuberculosis*, фе-

нотипически устойчивых к EMB, с известными молекулярно-генетическими характеристиками, полученными с помощью метода масс-спектрометрии MALDI, и 36 клинических изолятов с известной фенотипической устойчивостью к EMB из лаборатории молекулярно-генетических методов исследования Центрального НИИ туберкулеза; 34 клинических изолята *M. tuberculosis* с известной фенотипической устойчивостью к EMB из лаборатории микробиологии НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова; 21 клинический изолят *M. tuberculosis* с известной фенотипической устойчивостью к EMB из бактериологической лаборатории Калужской областной туберкулезной больницы.

Пробоподготовка и выделение ДНК

Пробоподготовку образцов и выделение ДНК осуществляли с помощью наборов реагентов для выделения ДНК из культур микобактерий «М-Сорб-Туб» и «Экспресс-Туб» (ООО «НПФ Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией к набору.

Проведение аллель-специфичной ПЦР-РВ (АС-ПЦР-РВ) для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к этамбутолу

Для проведения исследования на участке гена *embB* (GenbankU68480, участок последовательности 7795-8275) выбраны: флуоресцентный линейный зонд Cy5-*emb306*_up типа TaqMan, не содержащий мутаций, прямой и обратный праймеры *embB306-F* и *embB306-R* (для исследования участка, содержащего 306 кодон); флуоресцентный зонд Cy5-*emb406*_up типа TaqMan, не содержащий мутаций, прямой и обратный праймеры *embB406-F* и *embB406-R* (для исследования участка, содержащего 406-й кодон); соответствующие аллель-специфичные праймеры к кодонам 306 и 406 AL и Alm (табл. 1).

Праймеры и зонды синтезированы фосфитамидным методом на олигонуклеотидном синтезаторе ASM-2000 (Россия, г. Новосибирск) с использованием реагентов ООО «НПФ Синтол» (Россия, Москва) и очищены в ПААГ и с помощью ВЭЖХ. Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл включала: 2,5х реакционный буфер, содержащий $MgCl_2$ и dNTP, (ООО «НПФ Синтол», Россия); 5 пмоль соответствующего зонда; 10 пмоль каждого праймера; 2,5 ед. Hot-Rescue Taq-полимеразы (ООО «НПФ Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК.

Постановку АС ПЦР-РВ осуществляли на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно инструкции к прибору. Температурный протокол АС ПЦР-РВ: 95°C – 5 мин, 50 циклов: 62°C – 50 с, 95°C – 20 с. Результаты ПЦР-РВ регистрировали автоматически с помощью программного обеспечения CFX96. Интерпретацию результатов осуществляли согласно принципу АС ПЦР.

Проведение мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ

Отобранные по результатам анализа частоты мутаций аллель-специфичные праймеры к кодо-

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидных праймеров, аллель-специфичных праймеров и зондов для исследования специфических участков гена *embB*, содержащих кодоны 306 и 406, методом АС-ПЦР-РВ

Table 1. The sequence of oligonucleotide primers, allele-specific primers and probes for testing specific parts of the *embB* gene, containing codons 306 and 406 using real-time allele-specific PCR

Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Обозначение праймеров и зондов	Последовательность праймеров, зондов, аллель-специфичных праймеров
<i>embB306</i>			
прямой праймер		embB306-F	CGTGGTGATATTCGGCTTCCT
обратный праймер		embB306-R	GCCGAACCAGCGGAAATAG
зонд		Cy5-emb306_up	Cy5-TCATCGGCGCGAATTCGTCGGAC-BHQ2
Met	ATG	emb306AL	TCGGCGACTCGGGCCAT
Met – Ile	ATG – ATA	emb306Alm1	TCGGCGACTCGGGCT
Met – Leu	ATG – CTG	emb306Alm2	TCGGCGACTCGGGCCAG
Met – Val	ATG – GTG	emb306Alm3	TCGGCGACTCGGGCCAC
Met – Ile	ATG – ATC	emb306Alm4	TCGGCGACTCGGGCG
Met – Ile	ATG – ATT	emb306Alm5	TCGGCGACTCGGGCA
<i>embB406</i>			
прямой праймер		embB406-F	AGTGTGCTGGCTGCTGCTGTC
обратный праймер		embB406-R	GTGTGAATCGGCGGTAACGA
зонд		Cy5-emb406_up	Cy5-CGTGAGGTGCTGCCCGCCTCG-BHQ2
Gly	GGC	emb406AL	GAGCCGAGCGCGATGATGC
Gly – Ala	GGC – GCC	emb406Alm5	GAGCCGAGCGCGATGATGG
Gly – Asp	GGC – GAC	emb406Alm6	GAGCCGAGCGCGATGATGT
Gly – Cys	GGC – TGC	emb406Alm7	GAGCCGAGCGCGATGATGCA
Gly – Ser	GGC – TCC	emb406Alm8	GAGCCGAGCGCGATGATGGA

нам 306 и 406 гена *embB* *M. tuberculosis* синтезировали с различными флюорофорами на 5'-конце. 3'-меченные олигонуклеотиды-гасители выбраны согласно комплементарности аллель-специфичным праймерам для кодонов 306 и 406 гена *embB* [BHQ2-*embB306* (GCC CGA GTC GCC-BHQ2), RTQ1-*embB406* (CAT CAT CGC GCT CGG C – RTQ1)].

Мультиконкурентную аллель-специфичную ПЦР в формате реального времени проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) в два этапа. На первом этапе выполняли предварительную амплификацию с целью накопления специфических фрагментов гена *embB* участков 306-го и 406-го кодонов соответственно. Температурно-временной режим амплификации: 95°C – 5 мин, 20 циклов: 64°C – 50 с, 95°C – 20 с. На втором этапе определяли лекарственную устойчивость к этамбутолу с помощью разработанного в ходе выполнения настоящей работы комплекта реагентов для определения мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* (см. результаты). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 2,5х реакционный буфер, содержащий MgCl₂ и dNTP (ООО «НПФ Синтол», Россия); 5 пмоль зонда; 10 пмоль общего праймера; 5 пмоль праймера дикого типа; 10 пмоль каждого из 2-3 участвующих в данном анализе 5'-флюоресцентно-меченных аллель-специфичных праймеров; 20-30 пмоль комплементарного праймера-гасителя (из расчета 10 пмоль на каждые 10 пмоль флюоресцентных праймеров); 2,5 ед. Hot-Rescue Taq-полимеразы (ООО «НПФ Синтол», Россия) и 5 мкл

образца ДНК. Температурный протокол ПЦР-РВ: 95°C – 3 мин, 50 циклов: 62°C – 40 с; 58°C – 40 с, 95°C – 20 с. Результаты ПЦР-РВ регистрировали автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с приборами для ПЦР-РВ.

Проведение секвенирования

Для секвенирования фрагментов гена *embB* МБТ, содержащих кодоны 306 и 406, использовали следующие праймеры: embB306-F и embB306-R для 306 кодона и embB406-F и embB406-R для 406-го кодона (табл. 1). Амплифицированные образцы ДНК-фрагментов выделяли из агарозного геля с помощью набора реагентов для очистки ДНК (KR-011, ООО «Омникс», Россия). Секвенирование проводили на секвенаторе Applied Biosystem 3130XL по стандартному протоколу.

Результаты исследования

Определение спектра и частоты мутаций в кодонах 306, 406 гена *embB* МБТ с помощью методов аллель-специфичной ПЦР-РВ и секвенирования

Для оценки частоты встречаемости мутаций в гене *embB* *M. tuberculosis*, ассоциирующихся с устойчивостью к этамбутолу (ЕМВ), применили метод аллель-специфичной ПЦР-РВ (АС-ПЦР-РВ) [1].

Суть метода заключается в том, что при параллельной постановке ПЦР-РВ с праймерами, несущими замены на 3'-конце, начало роста флюоресценции будет различным для разных праймеров, т. е. каждому праймеру соответствует свое значение

порогового цикла, и чем меньше это значение, тем более специфичен праймер (рис. 1). По разнице в значениях пороговых циклов C_t (Δ) между праймером дикого типа (AL) и аллель-специфичными праймерами с соответствующими мутациями на

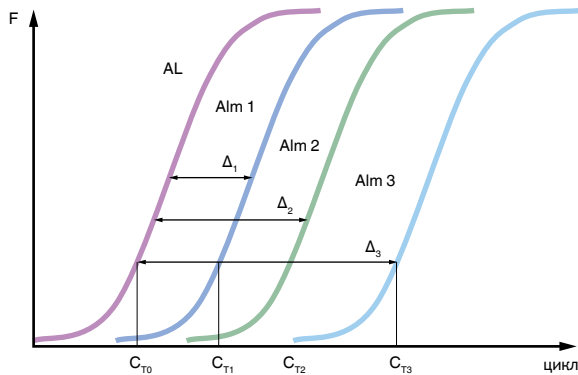


Рис. 1. Принцип аллель-специфичной ПЦР-РВ: разница (Δ) между пороговыми циклами кинетических кривых (C_t) для праймера дикого типа (AL) и аллель-специфичных праймеров (Alm)

Fig. 1. The concept of real-time allele-specific PCR: difference (Δ) between threshold cycles of kinetic curves (C_t) for wild type primer (AL) and allele-specific primers (Alm)

3'-конце (Alm) можно судить о наличии мутации в определенном образце. В качестве контрольного выступает образец без мутаций с определенными значениями порогового цикла и $\Delta_{\text{контр}}$ для каждого аллель-специфичного праймера.

Анализ мутаций с помощью АС-ПЦР-РВ заключается в том, что Δ мутаций каждого исследуемого образца сравнивают с Δ мутаций контрольного образца (рис. 2). Если нет мутации, то Δ исследуемого образца будет равна Δ контроля и всегда будет больше 0 (рис. 2а). При наличии мутации Δ данной мутации может иметь отрицательное значение (т. е. реакция с аллель-специфичным праймером опережает реакцию с праймером дикого типа), может быть равна 0 или значительно меньше данной $\Delta_{\text{контр}}$ контрольного образца (при наличии гетерогенного образца – смеси дикого и мутантного) (рис. 2б, в, г).

Для каждого исследуемого образца сравнивали Δ каждой мутации ($C_{\text{TAlm}} - C_{\text{TAL}}$) с $\Delta_{\text{контр}}$, определенной для штамма дикого типа. В результате скрининга 30 этамбутол-устойчивых образцов (табл. 2) с помощью метода АС-ПЦР-РВ наличие мутаций показано в 26 образцах. 22 образца имели мутации в кодоне 306 [14 – Met – Val (ATG – GTG); 2 – Met – Ile (ATG – ATA); 2 – Met – Ile (ATG – ATC); 2 – Met – Ile (ATG – ATT); 2 – Met – Leu (ATG – CTG)],

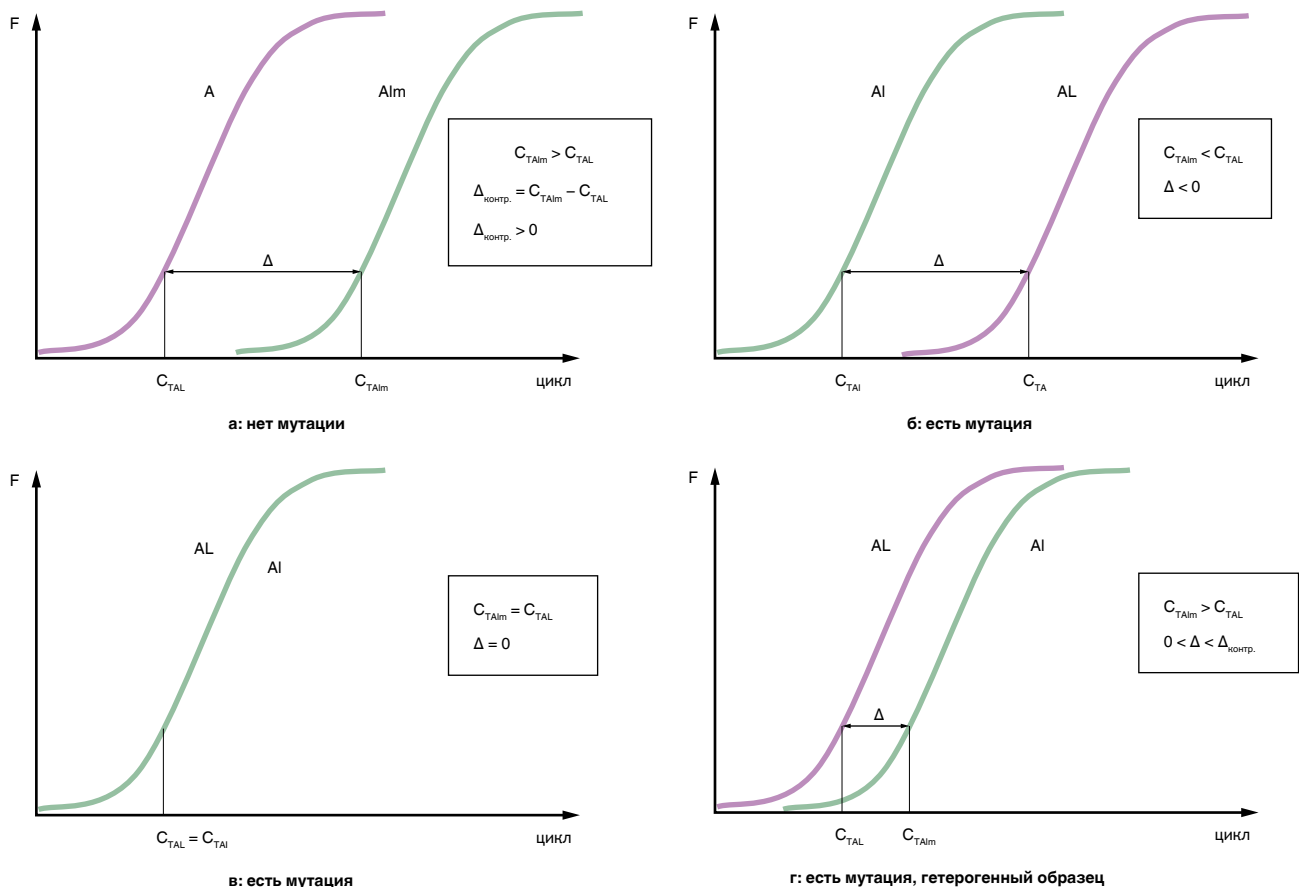


Рис. 2. Анализ кинетических кривых АС-ПЦР-РВ при наличии или отсутствии мутации: а) образец не содержит мутации; б), в) образец содержит мутацию; г) мутация в гетерогенном образце

Fig. 2. Analysis of kinetic curves of real-time allele-specific PCR in case there is mutation and no mutation: а) the specimen without mutation, б), в) the specimen with the mutation; г) the mutation is in the heterogeneous specimen

Таблица 2. Итоговая таблица определения спектра *embB* мутаций МБТ в кодонах 306 и 406 различными молекулярно-генетическими методами и сравнение с данными микробиологического анализа лекарственной чувствительности к этамбутолу

Table 2. The summary table of mutations in the *embB* gene of *M. tuberculosis*, codons 306 and 406 detected by various molecular-genetic methods and comparison with data of bacteriological tests of drug susceptibility to ethambutol

№	Образец	АС-ПЦР-РВ	Мультиконкурентная АС-ПЦР-РВ	Сиквенс	Микро-биология	MALDI
1	Cn 7	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	нд	ЕМВ	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)
2	Cn 10	Alm5emb 306 ATG-ATT (Met-Ile)	Alm5emb 306 ATG-ATT (Met-Ile)	emb 306 ATG-ATT (Met-Ile)	ЕМВ	emb 306 ATG-ATT (Met-Ile)
3	Cn 12	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)	emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)	ЕМВ	emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)
4	Cn 20	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	ЕМВ	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)
5	Cn 34	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	ЕМВ	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)
6	Cn 89	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	emb 406 GGC-AGC(Gly-Ser)	ЕМВ	emb 406 GGC-AGC(Gly-Ser)
7	Ms 34	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile) Alm6 emb 406 GGC-GAC(Gly-Asp)	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile) Alm6emb 406 GGC-GAC(Gly-Asp)	emb 306 ATG-ATC(Met-Ile) Alm6emb 406 GGC-GAC(Gly-Asp)	ЕМВ	emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)
8	Ms 40	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	ЕМВ	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)
9	Ms 42	Alm5 emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)	Alm5 emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)	нд	ЕМВ	emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)
10	Ms 44	Alm5 emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)	Alm5 emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)	emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)	ЕМВ	emb 406 GGC-GCC(Gly-Ala)
11	Ms 70	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	emb 406 GGC-AGC (Gly-Ser)	ЕМВ	emb 406 GGC-AGC (Gly-Ser)
12	Ms 157	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	Мутаций <i>emb</i> 306, 406 не обнаружено	ЕМВ	emb 406 GGC-AGC (Gly-Ser)
13	Ms 163	Alm5emb 306 ATG-ATT(Met-Ile)	Alm5emb 306 ATG-ATT(Met-Ile)	нд	ЕМВ	emb 306 ATG-ATT(Met-Ile)
14	Ms 168	Alm1emb 306 ATG-ATA(Met-Ile)	Alm1emb 306 ATG-ATA(Met-Ile)	emb 306 ATG-ATA(Met-Ile)	ЕМВ	emb 306 ATG-ATA(Met-Ile)
15	Ms 169	Alm6emb 406 GGC-GAC(Gly-Asp)	Alm6emb 406 GGC-GAC(Gly-Asp)	emb 406 GGC-GAC (Gly-Asp)	ЕМВ	emb 406 GGC-GAC (Gly-Asp)
16	Ms 171	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	нд	ЕМВ	emb 306 ATG-GTG(Met-Val)
17-25	1655,1804, 1831,1913, 1914,1917, 1927,1930, 1967	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	Alm3emb 306 ATG-GTG(Met-Val)	нд	ЕМВ	нд
26-28	1657, 1921, 1929	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)	Alm4 emb 306 ATG-ATC(Met-Ile)	нд	ЕМВ	нд
29-30	1765, 1926	Alm2 emb 306 ATG-CTG(Met-Leu)	Alm2 emb 306 ATG-CTG(Met-Leu)	нд	ЕМВ	нд

Примечание: ЕМВ – устойчив к этамбутолу; нд – анализ не проводился

3 образца имели мутации в кодоне 406 [2 – Gly – Ala (GGC – GCC); 1 – Gly – Asp (GGC – GAC)], и 1 образец был определен с мутациями в кодонах и 306, и 406 [Met – Ile (ATG – ATC) , Gly – Asp (GGC – GAC)]. В 4 образцах мутации не определены ни в 306-м, ни в 406-м кодонах.

Для подтверждения полученных результатов и определения возможных других мутаций в кодонах 306, 406 специфические участки гена *embB* 4 образцов без мутаций и 9 образцов, имеющих различные мутации, секвенированы (табл. 2).

При исследовании специфического фрагмента гена *embB*, содержащего кодон 306, все мутации,

определенные с помощью метода АС-ПЦР-РВ, подтверждены, дополнительных мутаций не выявлено. В 4 фенотипически устойчивых к ЕМВ образцах с неопределенными молекулярно-генетическими характеристиками мутаций в кодоне 306 не выявлено. При исследовании специфического фрагмента гена *embB*, содержащего кодон 406, в 2 образцах из 4 неопределенных определена мутация Gly – Ser (GGC – AGC), не вошедшая ранее в анализ с помощью метода АС-ПЦР-РВ. Таким образом, дополнительно с помощью секвенирования в 2 образцах из 4 неопределенных определена мутация Gly – Ser (GGC – AGC), ранее не вошедшая

в анализ. Для 11 образцов мутации подтверждены. Общее число штаммов с определенными мутациями составило 28 из 30. Результаты распределения выявленных мутаций в кодонах 306, 406 гена *embB* МБТ представлены в табл. 3.

Таблица 3. Распределение выявленных мутаций в кодонах 306, 406 гена *embB* МБТ

Table 3. Distribution of detected mutations in codons 306 and 406 of the *embB* gene of *M. tuberculosis*

Замена аминокислоты	Нуклеотидная замена	Количество штаммов
<i>embB306</i>		
Met – Ile	ATG – ATA	2 (6,9%)
Met – Leu	ATG – CTG	2 (6,9%)
Met – Val	ATG – GTG	14 (48,3%)
Met – Ile	ATG – ATC	3 (10,3%)
Met – Ile	ATG – ATT	2 (6,9%)
Всего в 306-м кодоне		23 (79,3%)
<i>embB406</i>		
Gly – Ala	GGC – GCC	2 (6,9%)
Gly – Asp	GGC – GAC	2 (6,9%)
Gly – Cys	GGC – TGC	- (0%)
Gly – Ser	GGC – TCC	- (0%)
Gly – Ser	GGC – AGC	2 (6,9%)
Всего в 406-м кодоне		6 (20,7%)
Всего		29 (100%)

Сравнительный анализ *embB* мутаций МБТ, определенных с помощью методов АС-ПЦР-РВ, секвенирования, масс-спектрометрии MALDI и микробиологических данных

Мутации в клинических изолятах, определенные методом АС-ПЦР-РВ и методом секвенирования, сравнили с микробиологическими данными и данными масс-спектрометрии MALDI. Результаты сравнительного анализа показаны в табл. 2. Из 30 образцов, фенотипически устойчивых, мутации в кодонах 306, 406 гена *embB* выявлены в 28 (93,3%) образцах. Совпадение результатов по определению конкретных мутаций для 16 образцов с методом масс-спектрометрии составило в целом 90,6% (для кодона 306 – 93,75%, для 406 – 87,5%). Таким образом, высокий уровень совпадения результатов определения устойчивости МБТ к этамбутолу, полученных различными молекулярно-генетическими и бактериологическими методами, показал высокую значимость мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ и необходимость их обязательного определения при создании коммерческих молекулярно-генетических наборов реагентов для выявления этамбутол-устойчивых штаммов МБТ.

Разработка набора реагентов для экспресс-определения лекарственной устойчивости МБТ к этамбутолу методом мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ

По итогам исследования частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ

к этамбутолу, для создания набора реагентов выбраны мутации в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ. В основе набора реагентов для выявления мутаций лежит метод мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ [1, 2, 4]. Мультиконкурентная АС-ПЦР в реальном времени основана на конкурентном встраивании аллель-специфичных праймеров с различными нуклеотидами на 3'-конце. В реакционной смеси ПЦР-РВ содержатся прямой и обратный праймеры, гибридационный флюоресцентный зонд, не содержащие мутаций, а также 5'-флюоресцентно-меченные аллель-специфичные праймеры, несущие на 3'-конце определенные нуклеотидные замены, и общий комплементарный аллель-специфичным праймерам 3'-меченный олигонуклеотид-гаситель. Каждый аллель-специфичный праймер со своей нуклеотидной заменой мечен своим флюоресцентным красителем, что позволяет по мере накопления продукта реакции определять его присутствие в исходной ДНК по изменению флюоресценции. В одной пробирке одновременно можно определять до трех точек мутаций (зонд + 3 аллель-специфичных праймера) по числу возможных флюорофоров, одновременно считываемых прибором. Если анализируемый образец не содержит мутаций, то будет идти ПЦР-РВ с прямым и обратным праймерами, не мечеными и не содержащими мутаций, и нарастание флюоресценции будет наблюдаться только по флюорофору гибридационного зонда. Если образец содержит мутацию, то нарастание флюоресценции будет наблюдаться и по флюорофору гибридационного зонда, и по флюорофору 5'-флюоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера, который будет встраиваться вместо обычного праймера, не содержащего мутаций. Гибридационный флюоресцентный зонд, не содержащий мутаций, является маркером присутствия искомого специфического фрагмента и играет роль внутреннего контроля, контролируя возможное ингибирование реакции в целом.

Анализ для экспресс-определения устойчивости МБТ к этамбутолу состоит из двух этапов. Первый этап включает проведение ПЦР-РВ с целью накопления специфических фрагментов гена *embB*, в котором могут содержаться мутации, ассоциирующиеся с лекарственной устойчивостью. Стадия предварительной ПЦР-РВ введена для повышения чувствительности и специфичности анализа клинических образцов, содержащих большое количество неспецифической ДНК (ДНК человека и др.), и проводится одновременно для обоих специфических участков гена *embB*, содержащих кодоны 306 и 406 соответственно. С целью снижения риска контаминации режим амплификации предварительной ПЦР-РВ специально включает только 20 циклов, при этом рост флюоресценции обычно еще не регистрируется прибором. Амплификаты исследуемых образцов, полученные после постановки предварительной ПЦР-РВ, используют для последующей

постановки всех реакций мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Вторым этапом анализа включает обнаружение конкретных мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB*, ассоциирующихся с устойчивостью к этамбутолу. Интерпретация результатов в методе мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ описана в [1, 4] и заключается в следующем. Образец считается чувствительным (не имеет мутаций в данном кодоне), если рост флюоресценции наблюдается только по флюорофору гибридизационного зонда, который не содержит мутаций и является маркером, контролируя ингибирование реакции и наличие в образце специфического фрагмента гена *embB M. tuberculosis*. Образец считается устойчивым к этамбутолу (имеет мутацию в каком-либо кодоне), если рост флюоресценции наблюдается по каналу гибридизационного зонда и по одному или нескольким каналам на мутации.

Для набора реагентов выбраны наиболее значимые мутации, возникающие в гене *embB* МБТ и приводящие к возникновению этамбутол-устойчивых штаммов МБТ. Выбранные для анализа мутации в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ составили 3 реакционные смеси для проведения различных реакций мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ: [Met – Ile(ATG – ATA); Met – Ile(ATG – ATC); Met – Ile(ATG – ATT)] – 1 смесь *emb306-1*; [Met – Leu(ATG – CTG); Met – Val(ATG – GTG)] – 2 смесь *emb306-2*; [Gly – Ala(GGC – GCC); Gly – Asp(GGC – GAC); Gly – Ser(GGC – AGC)] – 3 смесь *emb406*. Каждая реакционная смесь анализируется в одной пробирке, пробирки объединены между собой и анализируются одновременно в одинаковых условиях амплификации. Таким образом, для экспресс-определения лекарственной устойчивости к этамбутолу одного образца необходим один стрип из 3 пробирок.

Все 30 клинических изолятов МБТ, используемых ранее для определения частоты мутаций, проанализированы с помощью разработанного набора для экспресс-определения лекарственной устойчивости к этамбутолу методом мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Результаты полностью совпали с результатами АС-ПЦР-РВ и секвенирования (табл. 2). Кроме того, разработанный набор реагентов апробировали при исследовании 36 клинических изолятов, полученных после анализа в системе Bactec MGIT 960 в Центральном НИИ туберкулеза, 20 клинических изолятов, полученных после анализа в системе Bactec MGIT 960 в Московском НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, и 21 клинического изолята, полученного после бактериологического исследования на твердой среде Левенштейна – Йенсена в микробиологической лаборатории Калужской областной туберкулезной больницы. Всего из 107 образцов по данным бактериологии 62 были устойчивы к этамбутолу, 45 – чувствительны. В результате исследования по данным молекулярно-генетического анализа из 107 образцов в 49 (45,8%) обнаружены мутации гена

embB МБТ, в 58 (54,2%) – мутаций не выявлено. В 39 (36,4%) образцах выявлены мутации в кодоне 306 гена *embB* [28 ATG–GTG (Met–Val), 3 ATG–ATA (Met–Ile), 2 ATG–CTG (Met–Leu), 4 ATG–ATC (Met–Ile), 2 ATG–ATT (Met–Ile)], в 9 (8,4%) обнаружены мутации в кодоне 406 (4GGC–GCC (Gly–Ala), 3GGC–GAC (Gly–Asp), 2 GGC–AGC (Gly–Ser), и 1 (0,9%) образец определен с мутациями в кодонах и 306, и 406 [ATG–ATC (Met–Ile), GGC–GAC (Gly–Asp)]. Совпадение результатов, полученных с помощью мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ, с данными исследования лекарственной чувствительности с помощью культуральных методов составило 84%: данные по устойчивости полностью совпали для 90 образцов, в 15 образцах, устойчивых по данным Bactec, мутации не обнаружены, у 2 фенотипически чувствительных по данным анализа на твердых средах образцов выявлены мутации. Все образцы с противоречивыми результатами дополнительно исследовали методом секвенирования, а 13 фенотипически устойчивых к ЕМВ образцов, мутации в которых не выявлены в *embB* гене, повторно анализировали в системе Bactec MGIT 960. Повторный анализ на жидких питательных средах полностью подтвердил фенотипическую устойчивость этих образцов к ЕМВ, однако по данным секвенирования показано, что эти образцы не имеют мутаций ни в кодоне 306, ни в кодоне 406 гена *embB* МБТ. Вероятно, возникновение устойчивости к ЕМВ в этих образцах обусловлено другими мутациями. Частота мутаций для кодона 306 гена *embB* в целом составила 80%, для кодона 406 – 20%. Включение в диагностический набор мутаций кодона 406 гена *embB* МБТ позволило повысить диагностическую чувствительность набора с 64,5% (если бы определялись мутации только в кодоне 306) до 75,8%. Таким образом, разработанный набор реагентов для определения лекарственной устойчивости МБТ к ЕМВ с помощью метода мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ, основанный на определении мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ, показал высокую диагностическую чувствительность (75,8%) и специфичность (95,6%) относительно стандартных культуральных методов определения лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам.

Закключение

На основе технологии аллель-специфичной ПЦР в реальном времени изучен спектр возможных мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ, ассоциированного с устойчивостью к ЕМВ. Выявлено 5 различных мутаций в кодоне 306 и 3 мутации – в кодоне 406 гена *embB*. Выявленные мутации подтверждены методами секвенирования и масс-спектрометрии. По итогам исследования частоты встречаемости мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ЕМВ, разработан набор реагентов для экспресс-определения лекарственной

устойчивости МБТ к ЕМВ методом мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Высокий уровень совпадения результатов молекулярно-генетического и бактериологического анализа (84%) показал вы-

сокую значимость мутаций в кодонах 306 и 406 гена *embB* МБТ и необходимость их обязательного определения для выявления этамбутол-устойчивых штаммов МБТ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аляпкина Ю. С., Алексеев Я. И., Варламов Д. А., Домотенко Л. В., Шипина Л. К., Владимирский М. А. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину, капреомицину // Туб. и болезни легких. - 2014. - № 12. - С. 69-75.
2. Владимирский М. А., Аляпкина Ю. С., Варламов Д. А., Алексеев Я. И. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. - 2008. - № 4. - С. 38-44.
3. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью / под ред. И. Бастиана. Изд. «Медицина и жизнь», 2003.
4. Alyapkina Yu. S., Vladimirsky M. A., Varlamov D. A., Alekseev J. I., Shipina L. K. Rapid detection of *M. tuberculosis* gene mutations associated with drug resistance by modified allele-specific real-time PCR. Abstracts 16-th ERS Annual Congress, September 2006 // Eur. Resp. J. - 2006. - Vol. 28, suppl. 50. - P. 3456.
5. Dawei Shi et al. Characteristics of *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China // J. Antimicrob. Chemother. - 2011. - Vol. 66. - P. 2240-2247.
6. Hassan Safi et al. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. - 2010. - Vol. 54, № 1. - P. 103-108.
7. Plinke C. et al. *EmbCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *emb306* mutation // J. Antimicrob. Chemother. - 2010. - Vol. 65. - P. 1359-1367.
8. Sreevatsan S. et al. Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations // Antimicrob. Agents Chemother. - 1997. - Vol. 41, № 8. - P. 1677-1681.
9. Starks A. M. et al. Mutations at *embB* codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. - 2009. - Vol. 53, № 3. - P. 1061-1066.
10. Zhang Y., Yew W. W. Механизмы развития лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* // Туберкулез и легочные заболевания. - 2011. - Т. 2, № 1. - С. 7-20.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ООО «НПФ Синтол»,
127550, Москва, Тимирязевская, д. 42.
Тел.: 8 (499) 977-74-55.

Аляпкина Юлия Сергеевна
ведущий научный сотрудник.
E-mail: yulisyntol@mail

Алексеев Яков Игоревич
научный директор.

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,
107564, Москва, Яузская аллея, д. 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-91.

REFERENCES

1. Alyapkina Yu.S., Alekseev Ya.I., Varlamov D.A., Domotenko L.V., Shipina L.K., Vladimirskiy M.A. Development of real time PCR technology for rapid drug susceptibility testing of tuberculous mycobacteria to second line drugs: fluoroquinolones, amikacin, capreomicin. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, no. 12, pp. 69-75. (In Russ.)
2. Vladimirskiy M.A., Alyapkina Yu.S., Varlamov D.A., Alekseev Ya.I. et al. Application of PCR technique in real time for detection and monitoring of transmission of drug resistant strains of tuberculous mycobacteria. *Probl. Tub.*, 2008, no. 4, pp. 38-44. (In Russ.)
3. I. Bastian. *Tuberkulez s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustojchivostyu*. (Russ. Ed.: Multidrug-resistant Tuberculosis. Bastian, I., Portaels, F.). Meditsina i Zhizn Publ., 2003.
4. Alyapkina Yu.S., Vladimirsky M.A., Varlamov D.A., Alekseev J.I., Shipina L.K. Rapid detection of *M. tuberculosis* gene mutations associated with drug resistance by modified allele-specific real-time PCR. Abstracts 16-th ERS Annual Congress, September 2006. *Eur. Resp. J.*, 2006, vol. 28, suppl. 50, pp. 3456.
5. Dawei Shi et al. Characteristics of *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, vol. 66, pp. 2240-2247.
6. Hassan Safi et al. Allelic exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 1, pp. 103-108.
7. Plinke C. et al. *EmbCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *emb306* mutation. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, vol. 65, pp. 1359-1367.
8. Sreevatsan S. et al. Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, vol. 41, no. 8, pp. 1677-1681.
9. Starks A. M. et al. Mutations at *embB* codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, no. 3, pp. 1061-1066.
10. Zhang Y., Yew W.W. Molecular mechanisms of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* development. *Tuberkulez i Legochnye Zabolevaniya*, 2011, vol. 2, no. 1, pp. 7-20. (In Russ.)

FOR CORRESPONDENCE:

NPF Sintol,
42, Timiryazevskaya St., Moscow, 127550
Phone: +7 (499) 977-74-55.

Yulia S. Alyapkina
Senior Researcher.
E-mail: yulisyntol@mail

Yakov I. Alekseev
Scientific Director.

Central Tuberculosis Research Institute,
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564
Phone: +7 (499) 785-90-91.

Ларионова Елена Евгеньевна

старший научный сотрудник отдела микробиологии.

Смирнова Татьяна Геннадьевна

старший научный сотрудник отдела микробиологии.

Черноусова Лариса Николаевна

заведующая отделом микробиологии.

Владимирский Михаил Александрович

НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ

им. И. М. Сеченова,

*заведующий лабораторией иммунологических исследований
и молекулярной диагностики туберкулеза.*

127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4.

Elena E. Larionova

Senior Researcher of Microbiological Department.

Tatyana G. Smirnova

Senior Researcher of Microbiological Department.

Larisa N. Chernousova

Head of Microbiology Department.

Mikhail A. Vladimirsky

Research Institute of Phthisiopulmonology of I.M. Sechenov

First Moscow State Medical University,

*Head of Laboratory for Immunological Research and Molecular
Diagnostics of Tuberculosis.*

4, Dostoevsky St., Moscow, 127473

Поступила 26.04.2017

Submitted as of 26.04.2017