

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iaacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iaacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование. Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели. При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2024.

Содержание

Болезни и возбудители

- 4 Фёдорова А.В., Хрульнова С.А., Ветохина А.В., Молчанова И.В., Куцевалова О.Ю., Клясова Г.А.
Гены вирулентности у *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из гемокультуры больных с гематологическими заболеваниями
- 14 Умпелева Т.В., Скорняков С.Н., Вахрушева Д.В.
Биопленки при микобактериальной инфекции
- 21 Исаева Г.Ш., Чумарев Н.С.
Микробиота верхних дыхательных путей при COVID-19

Антимикробные препараты

- 31 Карпова Е.В., Колчанова Н.Э., Петровская Т.А., Тапальский Д.В.
Микробиологическая активность тиамфеникола и тиамфеникола глицината ацетилцистеината в отношении клинически значимых микроорганизмов и образуемых ими биопленок
- 40 Андреева И.В., Стецюк О.У., Козлов Р.С.
Цефтаролина фосамил – цефалоспорины V поколения с анти-MRSA активностью в лечении тяжелых инфекций в педиатрической практике

Антибиотикорезистентность

- 59 Чеботарь И.В., Кулешов К.В.
Между антибиотикорезистентностью и вирулентностью: диалектика бактериального фитнеса
- 67 Эйдельштейн М.В., Шайдуллина Э.Р., Иванчик Н.В., Дехнич А.В., Микотина А.В., Склеенова Е.Ю., Сухорукова М.В., Азизов И.С., Шек Е.А., Романов А.В., Трушин И.С., Кузьменков А.Ю., Козлов Р.С.
Антибиотикорезистентность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования
- 79 Вербенко Д.А., Соломка В.С., Дерябин Д.Г., Левичева Ю.Ю., Карамова А.Э., Кубанов А.А.
Определение генетических детерминант устойчивости штаммов *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам методом минисеквенирования

Опыт работы

- 87 Бонцевич Р.А., Тихойванова А.А., Анненков Н.В., Батищева Г.А., Невзорова В.А., Мартыненко И.М., Биккинина Г.М., Кетова Г.Г., Богданова В.О., Лучинина Е.В.
Определение выбора режима антибактериальной терапии старших курсов медицинских вузов по антимикробной терапии (итоги проекта KANT-IV)
- 98 Лихачев И.В., Кафтырева Л.А., Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В.
Разработка E-тестов для выявления потенцирующего эффекта антимикробных соединений в отношении полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Описание клинических случаев

- 104 Рачина С.А., Федина Л.В., Алхлавов А.А., Гасанова Д.Р., Зайналабидова Х.Г., Коваль А.А., Бурмистрова Е.Н., Савочкина Ю.А., Сычев И.Н., Кулешов В.Г., Ларин Е.С.
Сложности выбора режима антибактериальной терапии нозокомиальной пневмонии в ОРИТ: клинические наблюдения
- 113 Довгань Е.В., Андреев В.А., Боровой В.Н., Кузьмина Е.В., Андреева И.В., Коваленко Т.Н., Овчинников Т.Г., Козырев О.А.
Риноцеребральный мукормикоз у пациентов с COVID-19: описание случаев и лечение в условиях областного стационара

Определение генетических детерминант устойчивости штаммов *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам методом минисеквенирования

Вербенко Д.А., Соломка В.С., Дерябин Д.Г., Левичева Ю.Ю., Карамова А.Э., Кубанов А.А.

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Дмитрий Анатольевич Вербенко
Эл. почта: verbenko@cnikvi.ru

Ключевые слова: лепра, *Mycobacterium leprae*, лекарственная устойчивость, генетические детерминанты резистентности, *folP1*, *rpoB*, *gyrA*.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать метод выявления генетических детерминант устойчивости клинических изолятов *Mycobacterium leprae* к трем группам антимикробных препаратов: дапсону, рифампицину и фторхинолонам.

Материалы и методы. В работе использовали клинические изоляты *M. leprae*, полученные от пациентов, находящихся на лечении в Сергиево-Посадском филиале «ГНЦДК» Минздрава России с диагнозами «Лепра. Лепроматозный тип», «Лепра мультибактериальная, пограничная форма». Выделение тотальной ДНК из анализируемых образцов после их гомогенизации проводили с использованием набора «Проба-НК» (Россия). Выбор последовательностей олигонуклеотидов и гибридационных зондов для амплификации участков генома *M. leprae*, потенциально содержащих детерминанты резистентности, осуществлен согласно информации портала BLAST, а их синтез выполнен ООО «Синтол» (Россия). Первый этап амплификации целевых фрагментов генома *M. leprae* проведен с использованием набора «QIAGEN Multiplex PCR kit» (Германия), а последующее минисеквенирование – с использованием набора «SNaPshot» на приборе ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Анализ полученных данных проводили с использованием Peak Scanner Software.

Результаты. Разработан метод минисеквенирования, позволяющий одновременно выявлять шесть наиболее распространенных генетических детерминант устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам непосредственно в кожном биоптате пациента. Анализируемые детерминанты расположены в участках, определяющих возникновение резистентности к дапсону – в геномном локусе *folP1* (T53, P55), рифампицину – в гене *rpoB* (D441, H451, S456) и фторхинолонам – в гене *gyrA* (A91). Контрольной реакцией, подтверждающей присутствие *M. leprae* в биоптате кожи, является ПЦР с использованием праймеров к некодирующему повторяющемуся элементу генома лепры *RLEP*. Апробация метода на образцах клинического материала от пациентов больных лепрой показала отсутствие значимых детерминант устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам, наиболее часто используемым для терапии данного заболевания.

Выводы. Система быстрой идентификации устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам представляется важным инструментом для персонализации медицинской помощи больным лепрой с возможностью выбора оптимальной схемы химиотерапии.

Original Article

Identification of antimicrobial resistance determinants in *Mycobacterium leprae* using SNaPshot technique

Verbenko D.A., Solomka V.S., Deryabin D.G., Levicheva Yu.Yu., Karamova A.E., Kubanov A.A.

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, Russia

Contacts:

Dmitry A. Verbenko
E-mail: verbenko@cnikvi.ru

Key words: leprosy, *Mycobacterium leprae*, antimicrobial resistance, *folP1*, *rpoB*, *gyrA*.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. The development of a method for identifying frequent genetic determinants of *Mycobacterium leprae* clinical isolates resistance to three groups of antimicrobial drugs: dapsone, rifampicin and fluoroquinolones using SNaPshot technique.

Materials and methods. The study included *M. leprae* clinical isolates obtained from skin biopsies of patients undergoing leprosy treatment at the Sergiev Posad branch of the State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology of the Ministry of Health of Russia. One of the patients has the diagnosis 'Leprosy, lepromatous type', the second one has the diagnosis 'Leprosy. Multibacterial leprosy, borderline'. The selection of oligonucleotide sequences and hybridization probes for *M. leprae* drug resistance-determining genomic regions PCR was carried out according to information from the BLAST, the synthesis was performed by 'Synthol' LLC (Russia). The first PCR was carried out using the QIAGEN

Multiplex PCR kit (Germany), and subsequent SNP analysis using the “SNaPshot” kit at the ABI 3130 Genetic Analyzer. The data obtained were depicted using Peak Scanner Software.

Results. A method of six most frequent genetic determinants of antimicrobial resistance of *M. leprae* identification in patient skin biopsies was developed. Drug resistance of the disease is caused by the *M. leprae* genome mutations located in drug resistance-determining regions in the genomic loci: *folP1* for dapsone, *rpoB* for rifampicin and *gyrA* for fluoroquinolones resistance. The SNP polymorphisms stipulated drug resistance as a result of changes in the amino acid sequence of the transcribed protein, are determined in following *M. leprae* genome regions: *rpoB*: D441, H451, S456; *gyrA*: A91; *folP1*: T53, T55. The technique is SNaPshot determination of nine SNP performed on DNA isolated from the patient’s biological material. The control reaction confirming the presence of *M. leprae* DNA in the sample is PCR using primers to the non-coding repeat element of the leprosy genome *RLEP*. The pilot application of the technique developed to the samples of clinical material from patients showed the absence of *M. leprae* resistance determinants to antimicrobial drugs most often used to treat leprosy.

Conclusions. The use of a system for rapid identification of leprosy clinical isolates resistance to antimicrobial therapy will personalize the provision of medical care and provide the opportunity to select the optimal chemotherapy regimen, which will lead to increased efficiency of treatment of the disease.

Введение

Лепра (болезнь Гансена) – инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, приводящее к глубоким поражениям кожи, периферической нервной системы, а также передней камеры глаза, верхних дыхательных путей, яичек, кистей и стоп [1–2]. Заболевание распространено в тропических странах, особенно в Индии, Филиппинах и Бразилии [1]. В России отмечаются единичные случаи заболеваемости, в основном обусловленные трансграничным переносом лепры из эндемичных очагов заболеваемости, а также скрытая заболеваемость, связанная со сложностью диагностики ранних стадий лепры, инкубационный период которой составляет от 5 до 40 лет [3]. Спектр фармакологических препаратов терапии лепры в настоящее время ограничен, а их длительное применение способствовало появлению резистентных штаммов *M. leprae*, при этом уровень выявляемой в эндемичных странах резистентности лепры к антимикробным препаратам в настоящее время возрастает [4–9].

Выявление штаммов лепры с лекарственной устойчивостью осложнено невозможностью культивирования *M. leprae* на искусственных питательных средах. Идентификация детерминант антибиотикорезистентности *M. leprae* для рифампицина, дапсона и офлоксацина стала возможна только после развития методов ПЦР и секвенирования ДНК. Использование этих технологий позволило существенно увеличить чувствительность определения генетических детерминант устойчивости, что позволило получать результат с использованием смешанных образцов ДНК *M. leprae* и пациента в течение суток. Лекарственная устойчивость лепры развивается при появлении генетических детерминант резистентности в определенных геномных ло-

кусах: *folP1* для дапсона, *rpoB* для рифампицина и *gyrA* для офлоксацина [4, 9]. Возникновение генетических детерминант резистентности обусловлено точечными мутациями, поиск которых осуществляется секвенированием участков генома, определяющих возникновение резистентности (DRDR, drug resistance-determining region) либо полногеномным анализом штамма *M. leprae* [6, 9]. В настоящее время секвенирование является «золотым стандартом» выявления устойчивости клинических изолятов лепры к антимикробным препаратам, рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения [4]. Разработаны и другие подходы современной молекулярной диагностики, например аллель-специфичная гибридизация [10–12]. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов осуществляется также методом минисеквенирования, либо масс-спектрометрической идентификацией [13]. Применение минисеквенирования для выявления устойчивости клинических изолятов лепры к антимикробным препаратам позволит в случае необходимости расширить систему мониторинга генетических детерминант включением в нее дополнительных маркеров, которые могут быть выявлены в качестве детерминант антибиотикорезистентности лепры в будущем. Метод минисеквенирования характеризуется достаточной чувствительностью и специфичностью для прямой идентификации мутаций в образце ДНК, выделенной из биоптата кожи пациента, без дополнительного культивирования лепры в лапках мышей или броненосцах и без применения сложных процедур подготовки библиотек полногеномного секвенирования.

Цель исследования – разработать метод, позволяющий проводить выявление наиболее распространенных в эндемичных странах генетических детерминант рези-

стентности клинических изолятов лепры к трем группам антимикробных препаратов дапсону, рифампицину, а также фторхинолонам, с использованием технологии минисеквенирования.

Материалы и методы

Для разработки метода использовалась геномная ДНК, выделенная из биоптата кожи локтя, полученного в 2023 г. от пациента А, 1940 г.р., находящегося на лечении в СПФ ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России с диагнозом «А30.5: лепра мультибактериальная, лепроматозная форма, активная стадия. Рецидив» [14]. При окраске препарата биоптата ткани локтя по Циль-Нильсену средний бактериоскопический индекс (БИН) микобактерий составил 3,23; при бактериоскопическом исследовании обнаружены гомогенные и зернистые микобактерии лепры (средний БИН = 3,67).

Выбор последовательностей олигонуклеотидов и гибридационных зондов для амплификации участков детерминант антибиотикорезистентности осуществлен согласно информации портала BLAST [15], синтез выполнен ООО «Синтол» (Россия). Определение генетических детерминант антибиотикорезистентности микобактерий лепры осуществляли последовательным проведением двух этапов ПЦР с промежуточной очисткой и последующим определением однонуклеотидных полиморфизмов после разделения в капилляре генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer согласно инструкции производителя набора SNaPshot (Applied Biosystems, США).

Проверка разработанного метода осуществлялась на геномной ДНК, выделенной из биоптата кожи, полученного в 2023 г. от пациента Б., находящегося на лечении в СПФ ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России с диагнозом «А30.4: лепра мультибактериальная, пограничная форма, активная стадия» [16]. При окраске препарата биоптата ткани по Циль-Нильсену средний БИН микобактерий составил 3,17.

Исследование по определению генетических детерминант резистентности выполнено в референс-центре, созданном на функциональной основе на базе ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, в целях предупреждения распространения биологических угроз (опасностей).

Выявление ДНК *M. leprae* в смеси геномной ДНК человека, предположительно содержащей ДНК микобактерий лепры, осуществляли с использованием молекулярно-генетического анализа видоспецифичного некодирующего многокопийного элемента генома *RLEP* (*leprae* specific repetitive element) [17]. Образцы биоптата кожи весом не более 30 мг предварительно гомогенизировали с использованием автоматической шаровой мельницы Tissue Lyser II (Qiagen, Германия) в течение 10 мин. с частотой 20 Гц в 400 мкл лизирующего буфера, входящего в состав набора для выделения ДНК, после чего проводили выделение ДНК с использованием набора «Проба-НК» («ДНК-технология», Россия) согласно инструкции производителя. Качество полученных образцов ДНК оценивали с помощью спек-

трофотометра по отношению спектров УФ-поглощения на длинах волн 260/280 нм.

Обнаружение ДНК *M. leprae* методом ПЦР в реальном времени проводили, как описано ранее [3] с использованием прибора Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) в 0,1 мл пробирках фирмы Biologix (Китай). Реакцию осуществляли в 20 мкл смеси, включающей 0,1 мкМ каждого праймера и гидролизующейся пробы; 5 мкл готовой реакционной смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS («Евроген», Россия), а также деионизированную воду. Амплификацию проводили по программе, включающей плавление ДНК и активацию Taq полимеразы в течение 5 мин. при температуре 95°C и последующими 40 циклами, включающими отжиг праймеров при 60°C с одновременной детекцией флуоресценции по каналу FAM в течение минуты и плавление при 95°C в течение 15 сек. Эксперимент осуществляли в присутствии отрицательного контроля (содержащего деионизированную воду вместо ДНК), а также положительного контроля для повторяющегося участка генома лепры *RLEP*, содержащего искусственно синтезированный эквивалент количества 1000 копий анализируемого участка ДНК.

Результаты

Особенностью метода минисеквенирования является использование двух последовательных мультиплексных реакций ПЦР с разными наборами праймеров, с последующим определением аллельных вариантов при помощи фрагментного анализа в капилляре генетического анализатора. В первоначальной реакции производится амплификация короткого (60–300 н.о.) фрагмента геномной ДНК, включающего в себя участок генома, в котором расположен однонуклеотидный полиморфизм. Второй этап ПЦР заключается в гибридизации одного праймера, фланкирующего однонуклеотидный полиморфизм, с участком амплифицированного ранее фрагмента ДНК с последующим терминированием реакции путем встройки флуоресцентно меченого дидезоксинуклеотидфосфата. Различные типы нуклеотидных оснований при этом помечены различными красителями. Праймер, фланкирующий однонуклеотидный полиморфизм, может быть не полностью комплементарным амплифицированному фрагменту в той части, которая отдалена от однонуклеотидного полиморфизма. Это свойство используется для конструирования праймеров такого размера, чтобы можно было проводить разделение продуктов реакции минисеквенирования сразу нескольких однонуклеотидных полиморфизмов одновременно. Достройка некомплементарной части праймера может осуществляться поли-(TG)-последовательностью.

Для практической реализации данного метода были выбраны однонуклеотидные полиморфизмы, приводящие к аминокислотным заменам, представленным в Таблице 1. Проведение первого этапа ПЦР осуществляли для трех участков генома *M. leprae* *rpov*,

Таблица 1. Наиболее распространенные генетические детерминанты устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам, анализируемые с помощью метода минисеквенирования

| Антимикробные препараты | Мишень препарата (кодирующий ген) | Аминокислотные замены, ведущие к развитию резистентности |
|-------------------------|---|--|
| Дапсон | Дигидроптероат-синтетаза (<i>folP1</i>) | T53I (A) P55R (L) |
| Рифампицин | РНК-полимераза (<i>rpoB</i>) | D441Y(N) H451Y(D) S456L (M, F, W) |
| Фторхинолоны | ДНК-гираза (<i>gyrA</i>) | A91V (P,T) |

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для мультиплексной ПЦР целевых участков генома *M. leprae*

| Участок генома | Наименование праймера | Нуклеотидная последовательность 5'-3' | Длина фрагмента |
|----------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------|
| <i>folp1</i> | C_F | CCTGACGATGCTGTCCAG | 246 н.о. |
| | C_R | GTGGTCGTGTAGCAACTG | |
| <i>rpoB</i> | A_F | GTCGAGGCGATCACGCCGC | 278 н.о. |
| | A_R | GCTGTTACTTGGCTAGTCTG | |
| <i>gyrA</i> | B_F | GATGGTCTCAAACCGGTACATC | 225 н.о. |
| | B_R | TGGGCCGCTTGGCTTAAACGGAAC | |
| <i>RLEP</i> | k_F | GCAGCAGTATCGTGTAGTGAA | 102 н.о. |
| | k_R | TGCGCTAGAAGGTTGCCGTAT | |

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для проведения второго этапа (гибридизационной ПЦР) при определении генетических детерминант устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам

| Анализируемая детерминанта устойчивости | Нуклеотидная последовательность гибридирующегося праймера 5'-3' | Размер ампликона | Аллельный вариант дикого типа |
|--|---|------------------|-------------------------------|
| <i>folp1</i> Thr53Arg Thr53Ile | (TG) ₂₇ TCGACGTCGGTGGCGAATCGA | 76 | C |
| <i>folp1</i> Thr53Ala | (TG) ₃₀ TCGACGTCGGTGGCGAATCG | 81 | A |
| <i>Folp1</i> Pro55Leu | (TG) ₉ GGATCGGTCCTAATGGCACCG | 40 | G |
| <i>GyrA</i> Ala91Val | GGCACTAACGTGTCATAAATCGAT | 25 | G |
| <i>RpoB</i> Asp441Tyr Asp441Asn | (TG) ₇ CGACAGAGGGTTGTTCTGAT | 35 | C |
| <i>RpoB</i> His451Asp His451Tyr | (TG) ₁₃ CAACCCTCTGCGGGCCTGACC | 55 | C |
| <i>RpoB</i> Ser456Phe | (TG) ₁₂ AAACCACCCGGGCCAGCGC | 45 | C |
| <i>RpoB</i> Ser456Met | (GT) ₁₂ GGGCCTGACCCACAAGCGCCGGCTG | 50 | T |
| <i>RpoB</i> Ser456Trp Ser456Phe Ser456Met Ser456Leu | GTGTGGGCCTGACCCACAAGCGCCGGCTGT | 31 | C |

gyrA, *folp1*, содержащих в последовательности исследуемые детерминанты устойчивости к антимикробным химиопрепаратам, а также контрольной реакции для повторяющегося участка генома лепры *RLEP*, с последующей визуализацией успешного прохождения реакции в системе гель-документации VersaDoc (Bio-Rad) при окраске бромистым этидием после проведения разделения фрагментов электрофорезом в 2% агарозном геле (буфер TAE, напряжение 180 В, время 30 мин.). Для определения молекулярного веса амплифицированных фрагментов использовался маркер длин 100–1000 п.н. фирмы Thermo Fisher Scientific (США). Информация о последовательностях праймеров, использованных для первой реакции ПЦР названных генов, и размерах амплифицированных фрагментов представлена в Таблице 2.

ПЦР проводили в 0,1 мл пробирках фирмы Biologix (Китай) в объеме 20 мкл, содержащих буфер для ПЦР из набора QUAGEN Multiplex PCR Kit (Германия) 10 мкл, по 5 пМ каждого из праймеров в 1 мкл смеси, от 1 до 100 нМ ДНК, а также деионизированную воду. Амплификацию проводили по программе, включающей плавление ДНК и активацию Taq полимеразы в течение 15 мин. при температуре 95°C и последующими 40 циклами, включающими отжиг праймеров при 57°C в течение минуты, элонгацию при 72°C в течение минуты, а также плавление при 95°C в течение 30 сек. Очистка продуктов ПЦР по окончании реакции производилась инкубированием при 37°C в течение 45 мин. в присутствии ферментов экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы: к 5 мкл продукта ПЦР добавляли 0,5 мкл ExoI и 1 мкл FastUP (Thermo Fisher Scientific (США), с инактивацией ферментов в течение 15 мин. при 85°C.

Очищенные продукты первого этапа ПЦР смешивали в соотношении 1:1:1 и использовали для прове-

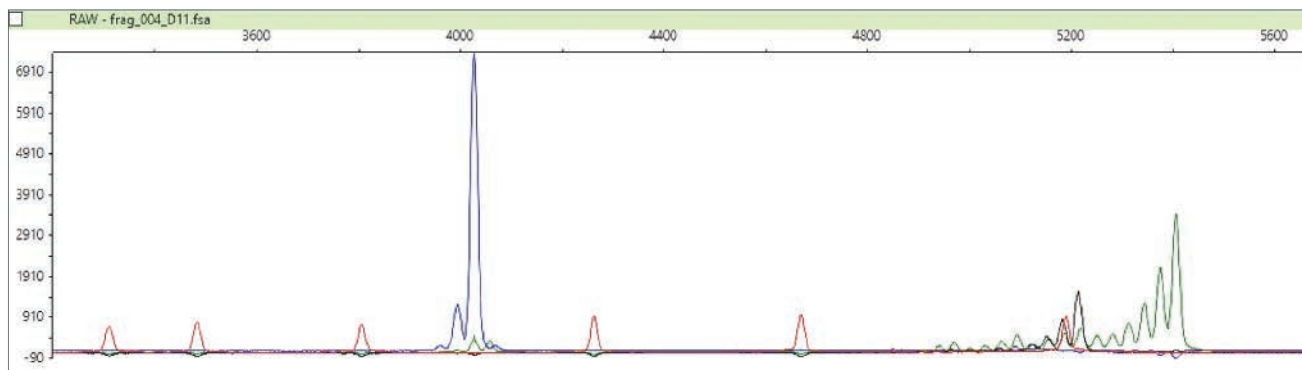


Рисунок 1. Пример определения трех однонуклеотидных полиморфизмов генетических детерминант резистентности *M. leprae* к дапсону. Цвет пика указывает на аллельный вариант, размер пика (подвижность в капилляре) определяет конкретную детерминанту, маркер молекулярного веса обозначен пиками красного цвета. Слева направо: детерминанты замен T53I, T53A и P55L в дигидроптероат-синтетазе

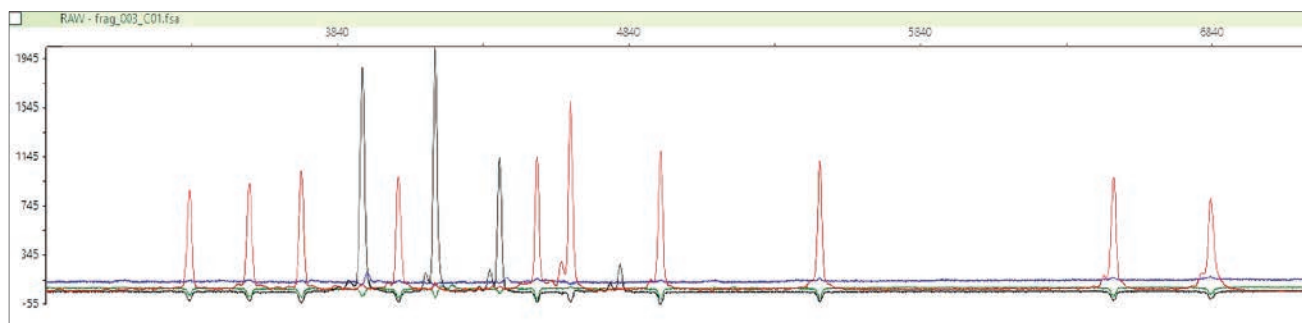


Рисунок 2. Пример определения пяти однонуклеотидных полиморфизмов генетических детерминант резистентности *M. leprae* к рифампицину. Цвет пика указывает на аллельный вариант, размер пика (подвижность в капилляре) определяет конкретную детерминанту, маркер молекулярного веса обозначен пиками красного цвета. Слева направо: детерминанты замен S456L(W), D441Y(N), S456F, S456M, H451D(Y) в субъединице В РНК-полимеразы

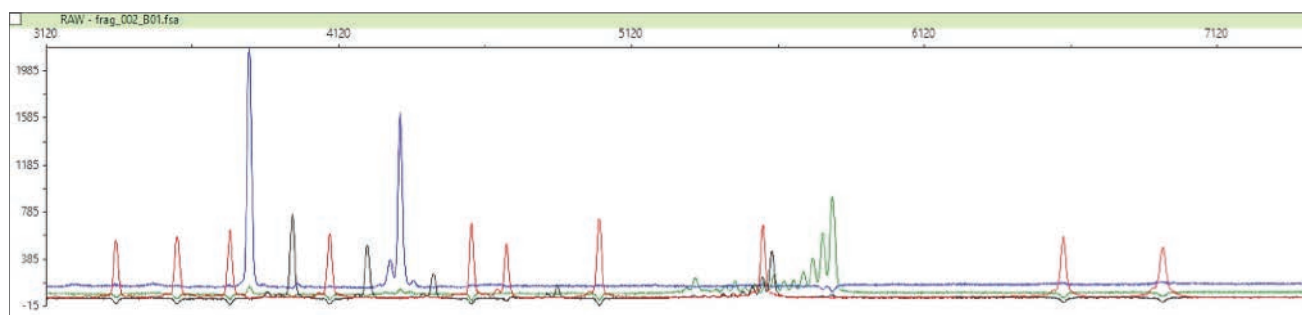


Рисунок 3. Пример определения девяти однонуклеотидных полиморфизмов генетических детерминант резистентности *M. leprae* к дапсону, рифампицину и фторхинолонам. Цвет пика указывает на аллельный вариант, размер пика (подвижность в капилляре) определяет конкретный однонуклеотидный полиморфизм (согласно Таблице 3). Маркер молекулярного веса DS-120 IIZ обозначен пиками красного цвета

дения гибридизационной ПЦР с олигонуклеотидами, фланкирующими однонуклеотидные полиморфизмы, последовательности которых приведены в Таблице 3. Реакцию осуществляли в 0,1 мл пробирках фирмы Biologix (Китай) в объеме 10 мкл, содержащем 5 мкл готовой смеси 2x SNaPshot PCR ready Master Mix, 3 мкл воды, 1 мкл смешанных очищенных продуктов ПЦР и 1 мкл смеси праймеров. Амплификацию проводили по программе, включающей 25 циклов: отжиг праймеров при 50°C в течение 5 сек., элонгацию при 60°C в течение 30 сек., а также плавление при 95°C в течение 10 сек. Очистка продуктов ПЦР по окончании реакции производилась инкубированием при 37°C в течение 45 мин. в присутствии щелочной фосфатазы: к 5 мкл продукта ПЦР добавляли 1 мкл фермента FastUP (Thermo Fisher Scientific (США), с инактивацией в течение 15 мин. при 85°C.

К 0,5 мкл очищенного продукта второго этапа ПЦР добавляли 9 мкл деионизированного формамида, маркер молекулярного веса Gene Mapper LIZ-120 (Applied Biosystems, США) и проводили денатурацию полученной смеси при 95°C в течение 5 мин. с последующим охлаждением на льду.

Разделение смеси продуктов второго этапа мультиплексной ПЦР производили в генетическом анализаторе ABI 3130 Genetic Analyser фирмы «Applied Biosystems» (США) согласно протоколу работы с набором SNaPshot. Разделение проводили в стандартном капилляре длиной 50 см, заполненным полимером POP-7. Время введения образца составило 7 сек. Полученные хроматограммы визуализировали при помощи программного обеспечения Peak Scanner Software 2 (Applied Biosystems, США). Расшифровка производилась по сопоставлению времени удержания амплифицированных фрагментов с маркером молекулярного веса Gene Mapper LIZ-120. Производитель набора SNaPshot (Applied Biosystems, США) предлагает также возможность автоматической расшифровки однонуклеотидных полиморфизмов при использовании соответствующего программного обеспечения, например «Gene Mapper Software».

Сопоставление полученных данных с аллельными вариантами дикого типа и выводы о наличии генетических детерминант устойчивости лепры к антимикробным препаратам при обнаружении отклонений от аллелей дикого типа.

Результат анализа генетических детерминант устойчивости клинического изолята лепры, выделенного из биоптата ткани пациента А представлен на Рисунках 1–3 в качестве примера определения девяти однонуклеотидных полиморфизмов генетических детерминант резистентности лепры к дапсону, рифампицину и фторхинолонам не выявили наличия мутаций в анализируемых участках генома *M. leprae*. Полученный результат полностью подтверждается данными секвенирования участков генома, определяющих возникновение резистентности, проведенного ранее [18].

Проведенный анализ полученного от пациента Б. образца биоптата кожи выявил наличие ДНК *M. leprae*.

Пороговый цикл амплификации в образцах ДНК при уровне 5000 усл. ед. флуоресценции оказался равен 14,8, что свидетельствует о высоком уровне бактериальной обсемененности, подтвержденным результатами бактериоскопии (средний БИН более 3). Определение генетических детерминант резистентности лепры к дапсону, рифампицину и фторхинолонам, проведенное в условиях, описанных для анализа биоптата пациента А., не выявило наличия мутаций в анализируемых участках генома *M. leprae*. Полученные данные свидетельствуют о высокой вероятности отсутствия устойчивости клинического изолята лепры, выявленной у пациента Б., к терапии антимикробными препаратами. Однако, малая вероятность недостаточно эффективной терапии заболевания стандартными схемами комбинированной лекарственной терапии в случае лепры все же остается [18, 19]. Подобные ситуации возникают достаточно редко, и в таком случае, для окончательного ответа на вопрос об устойчивости клинического изолята пациента к химиотерапии необходимо проведение полногеномного анализа генетических детерминант резистентности, поскольку разработанная нами система позволяет проводить анализ только наиболее распространенных генетических детерминант резистентности.

Обсуждение

Полученные данные выявили дикий тип аллельных вариантов полиморфизмов, мутации в которых определяют возникновение устойчивости лепры к антимикробной терапии, в двух исследованных клинических изолятах, полученных от пациентов с высоким уровнем бактериальной нагрузки *M. leprae*. Хотя полученные результаты оказались сопоставимы с данными, полученными для одного из пациентов методом прямого секвенирования по Сэнгеру, для окончательной проверки работы разработанной системы определения устойчивости лепры к антимикробной терапии и расчета параметров чувствительности и специфичности требуется проведение анализа расширенной выборки клинических изолятов.

Заключение

Разработанный метод определения устойчивости лепры к антимикробным препаратам позволит проводить выявление резистентности клинических изолятов лепры из кожного биоптата пациента к трем группам антимикробных препаратов дапсону, рифампицину, а также фторхинолонам. Метод основан на выделении смеси ДНК человека и микобактерий лепры (предполагается присутствие микобактерий в образце, подтвержденное при помощи ПЦР-исследования с использованием праймеров к некодирующему повторяющемуся элементу генома лепры *RLEP*). Для проведения теста применяется технология минисеквенирования, которая может быть заменена технологией анализа однонуклеотидных замес с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии [13] с использованием того же набора олигонуклеотидов и

проведения ПЦР в аналогичных условиях. Метод позволяет проводить определение шести наиболее распространенных генетических детерминант устойчивости *M. leprae* к антимикробным препаратам (Таблица 1).

Использование системы быстрой идентификации устойчивых к терапии АМП штаммов поможет назначению терапии лепры с учетом резистентности, что позволит избежать развития тяжелых последствий заболевания.

Литература

1. Sugawara-Mikami M., Tanigawa K., Kawashima A., Kiriya M., Nakamura Y., Fujiwara Y., Suzuki K. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. Virulence. 2022;13(1):1985-2011. DOI: 10.1080/21505594.2022.2141987
2. The World Health Organization (WHO). Towards zero leprosy. Global leprosy (Hansen's Disease) strategy 2021-2030. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789290228509>. Accessed October 24, 2023.
3. Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G. The refinement of leprosy PCR diagnostics by the amplification of species-specific repeated fragment of the *Mycobacterium leprae* genome. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2018;63(8):511-516. Russian. (Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путем амплификации видоспецифичного повторяющегося фрагмента генома *Mycobacterium leprae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(8):511-516.) DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516
4. A guide for surveillance of antimicrobial resistance in leprosy: 2017 update. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2017. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789290225492>. Accessed November 10, 2023.
5. Lazo-Porras M., Prutsky G.J., Barrionuevo P., Tapia J.C., Ugarte-Gil C., Ponce O.J., et al. World Health Organization (WHO) antibiotic regimen against other regimens for the treatment of leprosy: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis. 2020;20(1):62. DOI: 10.1186/s12879-019-4665-0
6. Verbenko D.A., Solomka V.S., Kozlova I.V., Kubanov A.A. The genetic determinants of *Mycobacterium leprae* resistance to antimicrobial drugs. Vestnik dermatologii i venerologii. 2021;97(6):54-62. Russian. (Вербенко Д.А., Соломка В.С., Козлова И.В., Кубанов А.А. Генетические детерминанты резистентности *Mycobacterium leprae* к антимикробным препаратам. Вестник дерматологии и венерологии. 2021;97(6):54-62.) DOI: 10.25208/vdv1292
7. Aubry A., Sammarco Rosa P., Chauffour A., Fletcher M.L., Cambau E., Avanzi C. Drug resistance in leprosy: an update following 70 years of chemotherapy. Infect Dis. 2022;52:243-251. DOI: 10.1016/j.idnow.2022.04.001
8. Bouth R.C., Gobbo A.R., Barreto J.G., do Carmo Pinto P.D., Bittencourt M.S., Frade M.A.C., et al. Specialized active leprosy search strategies in an endemic area of the Brazilian Amazon identifies a hypermutated *Mycobacterium leprae* strain causing primary drug resistance. Front Med. 2023;10:1243571. DOI: 10.3389/fmed.2023.1243571
9. Chhabra S., Narang T., Sahu S., Sharma K., Shilpa S., Sharma A., et al. High frequency of ofloxacin resistance patterns of *M. leprae* from India: an indication to revisit second line anti-leprosy treatment regimen. J Glob Antimicrob Resist. 2023;35:262-267. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.10.006
10. Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D.A., et al. Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol. 2012;50(3):742-753. DOI: 10.1128/JCM.05183-11
11. Chen X., He J., Liu J., You Y., Yuan L., Wen Y. Nested PCR and the TaqMan SNP Genotyping Assay enhanced the sensitivity of drug resistance testing of *Mycobacterium leprae* using clinical specimens of leprosy patients. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(12):e0007946. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007946
12. Cambau E., Chauffour-Nevejans A., Tejmar-Kolar L., Matsuoka M., Jarlier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType LepraeDR, a novel ready-to-use molecular test. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7):e1739. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001739
13. Hahner S., Kostrzewa M., Wenzel T., Fröhlich T. Strategies for SNP genotyping by mass spectrometry. International Congress Series. 2003;1239:11-16. DOI: 10.1016/S0531-5131(02)00286-8

14. Kubanov A.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Smoliannikova V.A., Nefedova M.A. Leprosy recurrent developed after termination of antileprotic therapy. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2016;92(6):66-72. Russian. (Кубанов А.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Смольяникова В.А., Нефёдова М.А. Рецидив лепры, развившийся после прекращения противолепрозной терапии. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2016;92(6):66-72.) DOI: 10.25208/0042-4609-2016-92-6-66-72
15. Kubanov A.A., Rakhmatulina M.R., Levicheva Y.Y., Kondrakhina I.N., Kuznetsov O.E., Smolaynikova V.A., et al. Case report of leprosy in the Russian Federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2023;99(5):80-88. Russian. (Кубанов А.А., Рахматулина М.Р., Левичева Ю.Ю., Кондрахина И.Н., Кузнецов О.Е., Смольяникова В.А. и соавт. Новый случай лепры, выявленный на территории Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2023;99(5):80-88.) DOI: 10.25208/vdv14872
16. Braet S., Vandelannoote K., Meehan C.J., Brum Fontes A.N., Hasker E., Rosa P.S., et al. The repetitive element RLEP is a highly specific target for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(3):e01924-17. DOI: 10.1128/JCM.01924-17
17. Standard Nucleotide BLAST. National Center for Biotechnology Information. U.S National Library of Medicine. Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch. Accessed November 10, 2023.
18. Verbenko D.A., Levicheva Yu.Yu., Deryabin D.G., Obraztsova O.A., Karamova A.E., Solomka V.S., Kubanov A.A. Leprosy chemotherapy resistance clinical cases not associated with the genetic determinants of resistance to antimicrobial drugs. *Infekcionnye bolezni*. 2023;21(4):1-8. Russian. (Вербенко Д.А., Левичева Ю.Ю., Дерябин Д.Г., Образцова О.А., Карамова А.Э., Соломка В.С., Кубанов А.А. Случаи устойчивости к химиотерапии лепры, не связанные с генетическими детерминантами резистентности к антимикробным препаратам. *Инфекционные болезни*. 2023;21(4):1-8.) DOI: 10.20953/1729-9225-2023
19. Neto F.B.A., Buarque Feitosa R.D.B., da Silva M.S. Daily moxifloxacin, clarithromycin, minocycline, and clofazimine in nonresponsiveness leprosy cases to recommended treatment regimen. *Int J Trop Dis*. 2020;3:035. DOI: 10.23937/2643-461X/1710035