



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56690 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/15
A61K 31/455
A61K 39/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКИ РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ДО ІЗОНІАЗИДУ

1

(21) u201007857
(22) 23.06.2010
(24) 25.01.2011
(46) 25.01.2011, Бюл. № 2, 2011 р.
(72) АНТОНЕНКО ПЕТРО БОРИСОВИЧ, КРЕСЮН
ВАЛЕНТИН ЙОСИПОВИЧ, БАЖОРА ЮРІЙ ІВА-
НОВИЧ, АНТОНЕНКО КАТЕРИНА ОЛЕКСІЇВНА
(73) ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ
(57) Спосіб експрес-діагностики резистентності
мікобактерій до ізоніазиду, що оснований на моле-

2

кулярно-біологічному дослідженні збудника тубер-
кульозу, який **відрізняється** тим, що зразки збуд-
ника туберкульозу досліджують з мокротиння хво-
рого на туберкульоз за допомогою полімеразно-
ланцюгової реакції з попереднім застосуванням
тест-системи "ДНК-сорб-В" ("АмплиСенс МБТ-
Ерн") і при ампліфікації ДНК фрагмента з молеку-
лярною вагою 435 п.н. діагностують резистент-
ність досліджуваного ДНК-ізоляту збудника тубер-
кульозу до ізоніазиду.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до фармакогенетики і фізіотрії і може бути
застосований для визначення медикаментозної
резистентності збудника туберкульозу.

Як відомо, туберкульоз є головною причиною
смертності серед інфекційних хвороб. З початку
90-тих років минулого сторіччя спостерігалось
стрімке зростання поширеності туберкульозу в
Україні. Поширення туберкульозної інфекції у ве-
ликій мірі пов'язано з феноменом медикаментоз-
ної резистентності мікобактерій туберкульозу
(МБТ). Це обумовлює важливість удосконалення
діагностики медикаментозної резистентності збуд-
ника туберкульозу [1].

Відомий метод діагностики резистентності
збудника туберкульозу до ізоніазиду за допомогою
мультиплексної алель-специфічної полімеразно
ланцюгової реакції (МАС-ПЛР) [2]. Найбільш бли-
зький до запропонованого технічного рішення є
спосіб «Склад реактивної суміші для діагностики
резистентності до ізоніазиду збудника туберкульо-
зу» [3], в якому склад реакційної суміші для діагно-
стики резистентності до ізоніазиду збудника тубе-
ркульозу додатково має компоненти - буфер для
полімеразно-ланцюгової реакції червоний та воду
для полімеразно-ланцюгової реакції.

Однак вказані розробки мають той недолік, що
ДНК-ізолят отримують з культурального середо-
вища, який потребує термін 1,5-2 місяці.

В основу корисної моделі поставлено задачу
розробки експрес-методу діагностики резистент-

ності до ізоніазиду збудника туберкульозу шляхом
виділення ДНК-ізолятів збудника туберкульозу
безпосередньо з мокротиння хворих, що дозво-
лить значно скоротити час, потрібний для діагнос-
тики медикаментозної резистентності
M.tuberculosis.

Поставлена задача вирішується тим, що зраз-
ки збудника туберкульозу досліджують з мокро-
тиння хворого на туберкульоз за допомогою полі-
меразно-ланцюгової реакції з попереднім
застосуванням тест-системи «ДНК-сорб-В» («Амп-
лиСенс МБТ-Ерн») і при ампліфікації ДНК фрагме-
нту з молекулярною вагою 435 п.н. діагностують
резистентність досліджуваного ДНК-ізоляту збуд-
ника туберкульозу до ізоніазиду.

Спосіб виконується наступним чином.

Мокротиння об'ємом не менш ніж 500 мкл зби-
рали у одноразові ємкості, додавали «Муколізін» у
співвідношенні 1:5. Суміш залишали на 20-30 хв.,
періодично струшуючи. Після цього відбирали 100
мкл матеріалу та поміщали у маркіровані 1,5 мл
пробірки типу «Еппендорф». У кожную пробірку вно-
сили по 10 мкл внутрішнього контролю
Mycobacterium tuberculosis complex, по 300 мкл
лізірующего розчину. У одну пробірку вносили 100
мкл негативного контролю (негативний контроль).
В іншу пробірку вносили 90 мкл негативного кон-
тролю та 10 мкл позитивного контролю ДНК
Mycobacterium tuberculosis H37Ra (позитивний
контроль).

(13) U
(11) 56690
(19) UA

Усі проби старанно перемішували на вортексі та центрифугували для видалення капель з кришок пробірок. Усі пробірки прогрівали 5 хв. при 65 °С. У кожену пробірку додавали 25 мкл сорбенту універсального. Перемішували на вортексі та залишали у штативі на 2 хв. Ще раз перемішували та залишали на 5 хв. Проби центрифугували при 5 тис. об/хв. протягом 30 с. Видаляли надосадну рідину, додавали по 300 мкл розчину для відмивання 1, перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту універсального, знову центрифугували при 5 тис. об/хв. протягом 30 с і видаляли надосадну рідину. Додавали по 500 мкл розчину для відмивання 2, перемішували на вортексі до повного ресуспендування сорбенту універсального. Центрифугували при 10 тис. об/хв. протягом 30 с. Видаляли надосадну рідину.

Поміщали пробірки з відкритими кришками до термостату на 5-10 хв. при 65 °С, додавали по 50 мкл ТЕ-буферу для елюції ДНК. Перемішували на вортексі. Поміщали в термостат на 5 хв. при 65 °С, періодично струшуючи на вортексі. Центрифугували при 16 тис. об/хв. протягом 1 хв. Надосадна рідина містила очищену ДНК і була готова для постановки ПЛР.

Другим етапом визначали мутантні послідовності в кодоні 315 гена *katG* *M.tuberculosis* за допомогою мультіплексної алель-специфічної полімеразно ланцюгової реакції (МАС-ПЛР). Для цього використовуються три праймери. Внутрішній зворотний праймер *katg5R* розташовується так, що його 3'-кінець приєднується до другого нуклеотиду (G) кодона 315 дикого типу алелі (AGC). У випадку відсутності мутації ампліфікується фрагмент з молекулярною вагою 292п.н. за допомогою зовнішнього прямого праймеру *katg0F* та внутрішнього зворотного праймеру *katg5R*. Якщо мутація (AGC→ACC) має місце - внутрішній праймер *katg5R* не приєднується і фрагмент з молекулярною вагою 292п.н. не ампліфікується. Замість цього два зовнішніх праймери *katg0F* та *katg4R* фланкують весь регіон геному *katG*, що досліджується. У цьому випадку ампліфікується фрагмент з молекулярною вагою 435п.н. Таким чином, фрагмент 435п.н. ампліфікується тільки у штамів з *fortG*-мутаціями та є обраним як індикатор медикаментозної резистентності збудника туберкульозу до ізоніазиду [2].

На фіг. 1 зображено результати електрофорезу за умов використання запропонованого способу. Утворення фрагмента, що, згідно маркерів молекулярної ваги, складається з 292 пар

нуклеотидів, свідчить про відсутність у цих доріжках мутації у кодоні 315 геному *katG*, тобто вони є чутливими до дії ізоніазиду.

Ампліфікація фрагмента, що, згідно маркерів молекулярної ваги, складається з 435 пар нуклеотидів, свідчило про наявність мутації у кодоні 315 геному *katG*, тобто вони є нечутливими до дії ізоніазиду.

Було проведено дослідження 30 зразків мокротиння. З них 24 зразка містили ДНК *M. tuberculosis*. Серед 24 зразків 13 (54,2 %) мали мутацію в кодоні 315 гена *katG*, тобто були ізоніазид-резистентними, а 11 зразків (45,8 %) не мали мутації, тобто були ізоніазид-чутливими.

Серед ізолятів, що мали мутацію кодону 315 гена *katG*, 84,6 % (або 11 зразків) були резистентними до ізоніазиду, згідно даних стандартного культурального методу. Серед 15 культур з резистентністю до ізоніазиду, згідно даних стандартного культурального методу, 86,7 % мали мутацію в кодоні 315 гена *katG*. Отже, специфічність заявленого способу визначення резистентності до ізоніазиду склала 84,6 %, чутливість - 86,7 %.

В порівнянні з прототипом, запропонований спосіб експрес діагностики резистентності до ізоніазиду за рахунок виділення ДНК збудника туберкульозу безпосередньо з мокротиння хворих, скорочує час, потрібний для діагностики медикаментозної резистентності *M. tuberculosis*, з 1-1,5 місяців до 6-8 годин, що робить цей метод вкрай важливим і ефективним для своєчасної адекватної протитуберкульозної терапії.

Джерела інформації:

1. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, 4th Global Report The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007., Geneva, 2007.

2. Mokrousov I., Otten T., Filipenko M., Vyazovaya A. and all. Detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation // J Clin Microbiol. - 2002. - Vol. 40, № 7. - P. 2509-2512.

3. Пат. 29211 Україна, МПК (2006) A61K 31/00, C12Q 1/68, C12R 1/32 Склад реактивної суміші для діагностики резистентності до ізоніазиду збудника туберкульозу / Антоненко К. О., Кресюн, В. Й, Антоненко П. Б. (Україна).; заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № u200708746 ; заявл. 30.07.2007; опубл. 10.01.2008, Бюл. № 1. - 4 с.

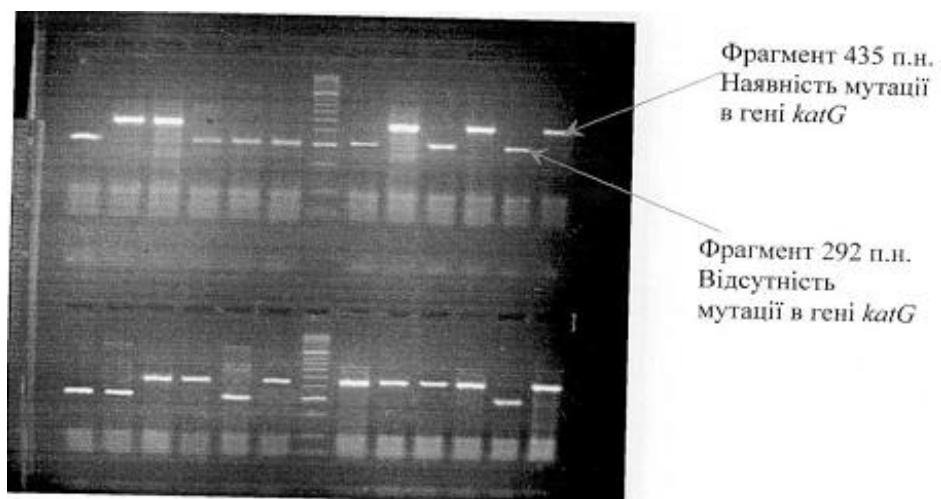


Fig. 1