



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

И ЕГО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

IMPROVED DIAGNOSTIC STRATEGIES FOR THE DETECTION OF TB DISEASE AND DRUG RESISTANCE AT THE POINT-OF-CARE BY MULTIPLE TECHNOLOGIES

*М.Рубцова¹, М.Уляшова¹, Г.Преснова¹, А.Егоров¹, Е.Ларионова², Л.Черноусова², И.Яминский^{1,3}, Д.Яминский^{1,3}, А.Ахметова^{1,3}
M.Rubtsova¹, M.Ulyashova¹, G.Presnova¹, A.Egorov¹, E.Larionova², L.Chernousova², I.Yaminsky^{1,3}, D.Yaminsky^{1,3}, A.Ahmetova^{1,3}*

С целью разработки комплекса диагностических тест-систем для быстрого выявления микобактерий туберкулеза и определения их устойчивых к антибиотикам форм создан международный консорциум, в котором Россию представляют компания "Центр перспективных технологий", МГУ им. М.В.Ломоносова и ЦНИИ туберкулеза. Планируется разработать несколько тест-систем для комплексной диагностики с применением молекулярно-генетических и иммунологических методов мультианализа микобактерий на биочипах.

In the international consortium for developing complex diagnostic test-systems for rapid detection of tuberculosis mycobacteria and their antibiotic-resistant forms, Russia is represented by the Advanced Technologies Center, Lomonosov Moscow State University and Central Research Institute of Tuberculosis. It is planned to develop several test systems for integrated diagnosis using molecular-genetic and immunologic methods of mycobacteria biochip-based multi-analysis.

Последние десятилетия во многих странах мира, независимо от их экономического статуса и уровня жизни населения, отмечается неуклонный рост заболеваемости туберкулезом (ТБ). Поэтому разработка новых методов диагностики и лечения ТБ продолжает оставаться актуальной. По данным ВОЗ [1, 2] совершенствование этих методов позволило добиться снижения смертности на 45% за период с 1990 по 2013 годы, что в абсолютных значениях составляет десятки миллионов спасенных человеческих жизней. Однако показатели по-прежнему угрожающие: по оценкам ВОЗ в 2013 году 9 млн. человек заболели туберкулезом, причем около 64% случаев заболевания были выявлены впервые. Смертность в 2013 году составила 1,5 млн. человек. Особую опасность представляют сочетание ТБ- и ВИЧ-инфекций, которые сложнее диагностировать и лечить. Около 1,1 млн. (13%) всех ТБ-больных инфицированы ВИЧ.

Существенной проблемой является устойчивость микобактерий ТБ (*M.tuberculosis*) к действию антибиотиков – основного средства лечения этого заболевания [3, 4]. В настоящее время выделяют следующие виды устойчивости:

- множественную лекарственную устойчивость (МЛУ, англ. – multiple drug resistance, MDR) – устойчивость возбудителя ТБ к основным антибиотикам первого ряда (изониазид, рифампицин);
- широкую лекарственную устойчивость (ШЛУ, англ. – extensively drug resistance, XDR) – сочетанную устойчивость к антибиотикам первого и второго ряда (изониазид, рифампицин, фторхинолоны, аминогликозиды и др.).

Устойчивость связана с мутациями в определенных генах микобактерий, причем каждый конкретный тип устойчивости обусловлен наличием нескольких мутаций.

Исследование в разных регионах мира обнаружило более половины устойчивых возбу-

¹ МГУ им. М.В.Ломоносова / Lomonosov Moscow State University

² ФГБНУ "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза" / Central Research Institute of Tuberculosis

³ Центр перспективных технологий / Advanced Technologies Center



дителей ТБ в трех странах: Индии, Китае и России. Неадекватное лечение может вызвать селективный отбор резистентных штаммов. С клинической точки зрения причинами возникновения резистентных штаммов являются поздняя диагностика первичной лекарственной устойчивости возбудителя, неадекватное или незавершенное предыдущее лечение. ШЛУ ТБ – наиболее сложный для лечения вид резистентности. Факторами риска развития ШЛУ являются первичная МЛУ, распространенный двухсторонний процесс в легких, более трех курсов химиотерапии туберкулеза в анамнезе и применение противотуберкулезных препаратов резервного ряда в предыдущих курсах химиотерапии.

Россия относится к странам с высокой заболеваемостью ТБ. Существенной и наиболее важной проблемой в развитии туберкулезной эпидемии являются распространяющиеся среди населения штаммы, устойчивые к большинству препаратов, применяемых в противотуберкулезной терапии. Особую опасность представляет рост доли ШЛУ ТБ с 4,9 до 20% [1]. Эти пациенты представляют собой опасный "резервуар" устойчивых инфекций, на которые не действуют известные антибиотики. Возникает серьезная угроза неконтролируемого распространения штаммов микобактерий, обладающих ШЛУ. Заболевание передается

воздушно-капельным путем, что создает угрозу его распространения в крупных городах с высокой плотностью населения и большими потоками мигрантов, значительная часть которых не обследована. Поэтому так важно воспрепятствовать увеличению случаев заболевания тяжелыми формами ТБ, которые характеризуются высокой смертностью.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Поскольку лекарственная резистентность обусловлена мутациями в генах микобактерий ТБ, перспективным является применение методов молекулярно-генетического анализа. В последние годы активно развиваются технологии секвенирования и мультиплексного молекулярно-генетического анализа: мультиплексная ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с дальнейшей гибридизацией на биочипах различного типа [5–7]. Секвенирование в основном используется в научных исследованиях, так как для практического применения в клинических лабораториях эта технология сложна, характеризуется высокой стоимостью оборудования и имеет ограничения, связанные с вероятностью ложных результатов.

Разнообразие форм устойчивости и наличие штаммов, резистентных одновременно к нескольким препаратам, требуют развития технологий мультианализа микобактерий

In the past decades, many countries, regardless of their economic status and living standards, have seen a steady rise in the tuberculosis (TB) incidence. Therefore, developing new methods of TB diagnosis and treatment remains to be a vital task. According to WHO [1, 2], improving these methods helped to reduce the mortality by 45% between 1990 and 2013, which, in absolute terms, amounts to dozens of millions of saved human lives. However, the figures remain alarming: according to the estimates of WHO, 9 million people were infected with TB in 2013, and nearly 64% of the cases were detected for the first time. The mortality amounted to 1.5 million people in 2013. Especially dangerous

is the combination of TB and HIV infections, which are more difficult to diagnose and treat. Nearly 1.1 million (13%) of all TB patients are HIV infected.

The essential problem is the resistance of TB Mycobacteria (*M. tuberculosis*) to antibiotics used as the main treatment of this disease [3, 4]. Currently, specialists distinguish the following types of resistance:

- Multiple drug resistance (MDR) – resistance to the main TB antibiotics of the first line (isoniazid, rifampicin);
- Extensive drug resistance (XDR) – combined resistance to the first and second line antibiotics (isoniazid, rifampicin, fluoroquinolones, aminoglycosides, etc.).

Resistance is associated with mutations in certain mycobacteria genes, with each specific type of resistance being due to the presence of multiple mutations.

Research in different regions of the world revealed that more than a half of resistant TB pathogens are found in three countries: India, China and Russia. Inadequate treatment may cause a certain selectivity of resistant strains. From the clinical perspective, the causes for emergence of resistant strains are late diagnosis of resistance to primary drugs and inadequate or incomplete prior treatment. The XDR TB resistance is the hardest to treat. The risk factors for XDR emergence are the primary MDR, common two-way



Рис.1. Общий вид 96-луночного планшета
Fig.1. General view of the 96-cell tablet

ПРОЕКТ "МУЛЬТИ-ТБ"

Компания "Центр перспективных технологий", МГУ им. М.В. Ломоносова и ЦНИИ туберкулеза участвуют в международном проекте "Мульти-ТБ" по созданию биочипа, позволяющего идентифицировать множество генов и наличие мутаций в них в одном анализе. Иностранцы партнеры проекта представлены немецкой научной группой биоаналитики и биопроцессов Института клеточной терапии и иммунологии общества Фраунхопера (Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Branch Bioanalytics and Bioprocesses) и немецкой компанией LIONEX Diagnostics & Therapeutics. Задачей международного консорциума является разработка комплекса диагностических тест-систем для быстрого выявления микобактерий ТБ и определения их устойчивых к антибиотикам форм на основе молекулярно-генетической и иммунологической диагностики. В рамках проекта предполагается создать несколько типов диагностических систем.

Все разработанные к настоящему времени и зарегистрированные для практического применения методы имеют ограничения, связанные с недостаточной мультиплексностью или сложностью и высокой стоимостью анализа. Ни один из методов не позволяет одновременно выявлять микобактерии ТБ и определять их устойчивость к препаратам как первого, так и второго ряда. Как правило, технологии, обеспечивающие высокую

туберкулеза на биочипах для ускоренного обнаружения возбудителя и определения его устойчивости к антибиотикам как первого, так и второго ряда в одном анализе. Мультиплексный анализ на биочипах позволяет выявить десятки, сотни и даже тысячи видоспецифичных генетических последовательностей, а также генетических вариаций, определяющих резистентность микобактерий к антибактериальной терапии.

lung processes, more than three tuberculosis chemotherapy cycles in a patient's history, and use of the second line anti-TB drugs the in the prior chemotherapy courses.

Russia is a country with a high TB incidence. The most significant and important problem related to the TB epidemic is the widespread of strains resistant to most drugs used in an antituberculosis therapy. The greatest danger is associated with an increase in the XDR TB share from 4.9% to 20% [1]. These patients represent a dangerous "reservoir" of resistant infections, which are not treatable by known antibiotics. There is a serious risk of the uncontrolled

spread of XDR Mycobacteria strains. The disease is transmitted by airborne droplets, which create a threat of their spreading in large cities with high population density and large flows of migrant, many of whom are not examined. Therefore, it is important to prevent the increasing incidence of severe TB forms characterized by high mortality.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

The methods of molecular genetic analysis appear especially promising because drug resistance is associated with mutations in genes of TB Mycobacteria. In recent years, sequencing technologies

and multiplex molecular-genetic analyses have been rapidly developing with technologies such as multiplex PCR, real-time PCR, PCR with subsequent hybridization on biochips of various types [5-7]. Sequencing is mostly used in scientific research, because it is too complex for practical application in clinical laboratories, being characterized by high equipment cost and limitations associated with high chances of obtaining false results.

The variety of resistance forms and presence of strains resistant to multiple drugs require developing technology for tuberculosis mycobacteria analysis on biochips for

МЕЖДУНАРОДНАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ
**«БИОТЕХНОЛОГИИ
В КОМПЛЕКСНОМ РАЗВИТИИ
РЕГИОНОВ»**

XIV МЕЖДУНАРОДНАЯ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА
«МИР БИОТЕХНОЛОГИЙ–2016»



При поддержке
Правительства Москвы

www.mosbiotechworld.ru

ОРГАНИЗАТОРЫ

Министерство промышленности
и торговли Российской Федерации

Министерство образования
и науки Российской Федерации

Министерство сельского хозяйства
Российской Федерации

Министерство экономического развития
Российской Федерации

Федеральное агентство научных
организаций (ФАНО России)

Российская академия наук

Департамент науки, промышленной
политики и предпринимательства
г. Москвы

Департамент природопользования
и охраны окружающей среды
г. Москвы

Российский союз химиков

ООО «Экспо-биохим-технологии»



ООО «Экспо-биохим-технологии»

+7 (495) 645 78 70, 780 41 09

E-mail: ser@biomos.ru

www.mosbiotechworld.ru

ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ КОНФЕРЕНЦИИ

СЕКЦИИ:

- Биоэнергетика
- Генно-инженерные технологии в сельскохозяйственном производстве
- Пищевая биотехнология
- Биотехнология в решении проблем охраны окружающей среды
- Промышленная экология. Внедрение и развитие биотехнологий по направлениям ТП «Технологии экологического развития»
- Охрана здоровья населения. Качество жизни и активное долголетие
- Инновации, финансы и бизнес в становлении биотехнологической индустрии в регионах
- Биотехнология и образование
- Биотехнологические проекты – стимул развития региональной инфраструктуры

КРУГЛЫЕ СТОЛЫ:

- Биотехнология для решения актуальных проблем АПК в странах СНГ и ЕврАзЭС
- Лесная биотехнология
- Биоматериалы в здравоохранении и биоиндустрии
- Ключевые биотехнологии робототехнических комплексов
- Биозтика и Российское законодательство о биологической и медицинской этике

ПРЕЗЕНТАЦИИ РЕГИОНОВ И ПРОМЫШЛЕННЫХ
ПРЕДПРИЯТИЙ, СЕМИНАРЫ

ТЕМЫ ВЫСТАВКИ «МИР БИОТЕХНОЛОГИЙ 2016»

- Процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований. Компьютерные технологии.
- Лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы.
- Биочипы и биосенсоры.
- Весь спектр биопродуктов для фармацевтической и пищевой промышленности, агропромышленного комплекса, биогеологии, промышленных производств, а также биоагенты для охраны и восстановления окружающей среды.
- Биологически-активные добавки.
- Тест-системы для определения алкоголя и наркотических веществ.
- Биокаталитические технологии.
- Питательные среды.
- Биопрепараты для медицины и косметологии, а также готовые продукты на их основе.
- Альтернативные источники энергии, в т.ч. из возобновляемого сырья.
- Промышленная и лабораторная безопасность.

КОНКУРС НА ЛУЧШУЮ ПРОДУКЦИЮ

представленную на выставке «Мир биотехнологий-2016»,
условия участия сайте: www.mosbiotechworld.ru

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ-БИОТЕХНОЛОГОВ

Прием тезисов докладов участников конференции до 10 января 2016. Правила оформления тезисов и условия участия в конкурсе на сайте:
www.mosbiotechworld.ru/rus/pub.php/pub.php

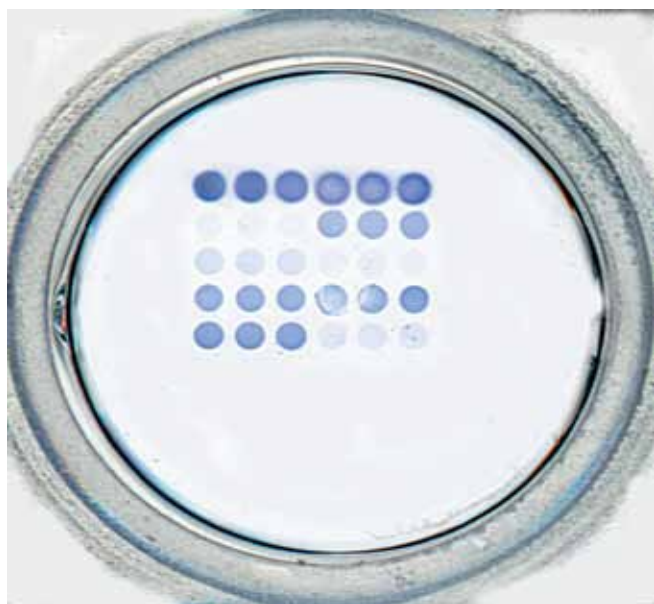


Рис.2. Результат определения нуклеиновых кислот на микрочипе в лунке планшета

Fig.2. Result of the determination of nucleic acids on a microchip in the cell of tablet

мультиплексность, являются трудоемкими, длительными по времени и требуют дорогостоящих компонентов и оборудования, что ограничивает их применение в реальной практике.

В проекте "Мульти-ТБ" планируется разработать несколько диагностических тест-систем, которые позволят проводить комплексную диагностику в три этапа. Первый этап предполагает быстрый анализ мокроты, который позволит обнаружить

микобактерии в течение нескольких минут с использованием специфических антител, меченых наночастицами золота. Для подтверждения положительных результатов будет разработана тест-система на основе биочип-картриджа, сочетающего мультианализ на биочипе и флюидные технологии. В качестве специфических реагентов для определения специфического паттерна антител пациента будут использованы белковые маркеры-антигены. На этот же биочип будут добавляться антигены ВИЧ для одновременного обнаружения ко-инфекции ТБ и ВИЧ. Для третьего этапа диагностики будут разработаны молекулярно-генетические методы обнаружения генетических маркеров лекарственной устойчивости микобактерий на основе мультианализа на биочипах.

В связи с необходимостью проведения масштабных скрининговых исследований распространения возбудителей ТБ и его антибиотикоустойчивых форм при выработке стратегии основное внимание будет уделяться производительности технологий, времени проведения анализа и возможности внедрения в диагностические лаборатории различного уровня.

Российскими партнерами будет разработана диагностическая тест-система молекулярно-генетического мультианализа для ускоренного обнаружения микобактерий ТБ и определения их устойчивости к препаратам как первого, так и второго ряда в одном анализе. Технологическое решение будет основано на колориметрической детекции, преимущества которой были показаны при идентификации устойчиво-

rapid detection of the pathogen and detection of its resistance to antibiotics of both the first and second lines within one analysis. Multiplex analysis on biochips reveals dozens, hundreds, or even thousands of species-specific genetic sequences, as well as genetic variations, that determine the mycobacteria resistance to antibacterial therapy.

MULTI-TB PROJECT

Advanced Technologies Center, Lomonosov Moscow State University and Central Research Institute of Tuberculosis participate in the international project Multi-TB on the creation of biochips used for

identification of genetic sets and mutations within one analysis. The project's foreign partners are the German Branch for Bioanalysis and Bioprocesses of Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, and the German company LIONEX Diagnostics & Therapeutics. The goal of the international consortium is to develop a complex of diagnostic test-systems for rapid detection of TB Mycobacteria and identification of their antibiotic-resistant forms using molecular-genetic and immunological diagnostics. The project is expected to create several types of diagnostic systems.

All the methods that have been developed so far and registered for practical application have limitations associated with insufficient multiplexity or complexity and high analysis cost. None of the methods can simultaneously identify M.Tuberculosis and determine its resistance to both the first and second line drugs. Usually, the processes that provide high multiplexity are hard to implement, time-consuming and require expensive components and equipment, which limits their use in real practice.

The Multi-TB project is planning to develop several diagnostic test systems, which for comprehensive

сти бактерий к бета-лактамам антибиотикам [8]. Качественное изменение по сравнению с существующими в настоящее время молекулярно-генетическими методами будет заключаться в принципиальном расширении набора генетических маркеров для идентификации типа устойчивости одновременно к антибиотикам первого и второго ряда. Качественное изменение технологии биочипов будет состоять в выборе способов их изготовления, проведения гибридизационного анализа и детекции. Для упрощения методики, сокращения времени анализа и его адаптации к возможностям клинических лабораторий биочипы будут нанесены методом контактной печати в лунки 96-луночных планшетов (рис.1), разделенных на 8-луночные стрипы. Это позволит упростить стадии гибридизации, детекции и отмывки, которые могут быть выполнены с использованием стандартного оборудования для иммуноферментного анализа, доступного для лабораторий различного уровня. Будет проведена оптимизация условий гибридизационного анализа с целью сокращения времени при сохранении необходимых чувствительности и специфичности. Возможность автоматизации различных стадий анализа способствует сокращению общего времени анализа.

Колориметрическая система детекции будет основана на использовании биотина в качестве метки ДНК и выявлении его конъюгатом стрептавидина с ферментом пероксидазой. О положительном результате комплементарной гибридизации будет свидетельствовать окрашивание зоны биочипа (рис.2), регистрируемое оптиче-

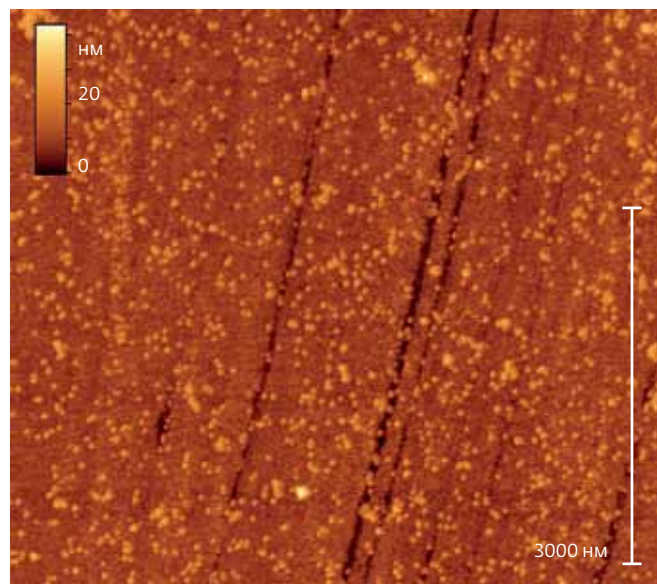


Рис.3. АСМ-изображение поверхности ДНК биочипа после проведения гибридизации с комплементарными ДНК-мишенями, мечеными наночастицами золота. Размер изображения 5 × 5 мкм

Fig.3. AFM image of the surface of the DNA biochip after the hybridization with complementary DNA target labeled with gold nanoparticles. The image size is 5×5 μm

ским методом. Это позволит разработать более дешевую систему детекции по сравнению с часто используемой в настоящее время флуоресцентной.

Для оптимизации технологии молекулярно-генетической идентификации туберкулеза

diagnosis in three stages. The first stage involves a rapid sputum test detecting mycobacteria in a few minutes using specific antibodies labelled with gold nanoparticles. To confirm the positive results, the project will develop a test-system based on a biochip cartridge that combines chip-based multi-analysis and fluid technologies. As specific reagents to detect the specific patterns of antibodies in a patient, the project will use protein antigen markers. The same biochip will be supplemented with HIV antigens for simultaneous detection of TB and HIV co-infection. For the third stage of diagnosis, the project will develop

molecular genetic methods to detect genetic markers of mycobacteria drug resistance using of biochip-based multi-analysis.

In connection with the need for large-scale screening studies of the TB agent spread and its antibiotics-resistant forms, the strategy will be focused on technology performance, analysis duration and feasibility in different level diagnostic laboratories.

The Russian partners develop a diagnostic test system to conduct molecular-genetic multi-analysis for rapid detection of TB mycobacteria and drug resistance of both the first and second lines in one

analysis. The technological solution is based on colorimetric detection, the advantages of which were demonstrated during the identification of bacterial resistance to beta-lactam antibiotics [8]. The qualitative distinction from the current molecular genetic techniques will be in fundamental expansion of the genetic markers range used to identify the resistance type to antibiotics of both the first and second line. The qualitative distinction of biochip technology will consist in the selection of their production methods, hybridization analysis and detection. To simplify the method, reduce the analysis duration and

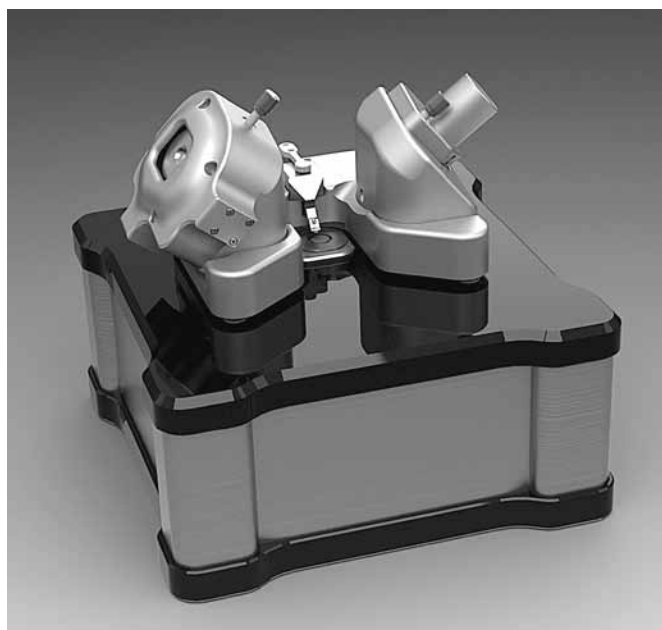


Рис.4. Быстродействующий сканирующий зондовый микроскоп FemtoScanX с проточной ячейкой для анализа биочипа
Fig.4. High-speed scanning probe microscope FemtoScanX with flow cell for analyzing of the biochip

эффективным инструментом является сканирующая зондовая микроскопия, которая позволяет прямым образом наблюдать состояние поверхности биочипа как при его производстве, так и в процессе его использования для диагностики (рис.3, 4). В работах [9, 10] представлен краткий обзор применения атомно-силовой микроскопии

(АСМ) для изучения поверхности микрочипов с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами и анализа результатов гибридизации ДНК-мишени; развиты подходы для основанного на АСМ количественного анализа ДНК на микрочипах с использованием таких параметров как высота, площадь и объем объектов на АСМ-изображениях; рассмотрены результаты АСМ-исследований поверхности ДНК-микрочипов до и после гибридизации, а также по детектированию ДНК с использованием золотых наночастиц в качестве метки.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO (2014) Global tuberculosis report 2014.
2. WHO. (2013). Global tuberculosis report 2013.
3. **Gandhi Neel R., Nunn Paul, Dheda Keertan, Schaaf H. Simon, Zignol Matteo, Soolingen Dick van, Jensen Paul, Bayona Jaime** // The Lancet. 2010. Vol. 375. PP. 1830-1843.
4. **Fonseca J.D., Knight G.M., McHugh T.D.** The complex evolution of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Infect Dis., 2015, 32: 94-100.
5. **Scott L.E., McCarthy K, Gous N., Nduna M., Van Rie A., Sanne I., Venter W.F., Duse A., Stevens W.** Comparison of Xpert MTB/RIF with other nucleic acid technologies for diagnosing pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting: a prospective study. PloS Med, 2011, 8: e1001061.
6. **Irina E.N., Shitikov E.A., Ikryannikova L.N., Alekseev D.G., Kamashev D.E., Malakhova M.V. et al.** Comparative Genomic Analysis of

adapt it to the potential of clinical laboratories, the biochips will be created with the help of contact printing in the cells of 96-cell plates (fig. 1) divided into 8-cell strips. This will simplify the stages of hybridization, detection and washing, which can be performed using standard equipment for enzyme immunoassay available in laboratories of different levels. Hybridization analysis conditions will be optimized with the aim of reducing duration while maintaining the required sensitivity and specificity. The automation capacity of various analysis stages will reduce the overall analysis duration.

The colorimetric detection system will be based on using biotin as a DNA label and on detection of its streptavidin conjugate with peroxidase enzyme. The positive results of complementary hybridization will be shown by biochip staining (fig. 2) registered using optical equipment. This will help to develop a cheaper detection system as compared to the current commonly used fluorescent detection.

The effective tool for optimizing the molecular-genetic tuberculosis detection technology is scanning probe microscopy, which is used as a direct way to observe the biochip surface during its production

and use for diagnosis (fig. 3, 4). Papers [9,10] present a brief overview of atomic force microscopy (AFM) used to examine the microchip surface with immobilized oligonucleotide probes and to analyze the hybridization of DNA-targets; there are well-developed approaches to AFM-based quantitative analysis of DNA on microchips using such parameters as the height, area and volume of the items in AFM images; the results of AFM examination of DNA microchip surface were reviewed before and after hybridization and DNA detection using gold nanoparticles as markers. ■