

УДК 577.29;577.2.08;575.22;579.84

БИОЧИП ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ И КАРБАПЕНЕМАЗ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

© 2020 г. М. Ю. Рубцова¹, *, М. М. Уляшова¹,
Ю. И. Поболелова¹, Г. В. Преснова¹, А. М. Егоров¹

¹Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, 119991 Россия

*e-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2019 г.

После доработки 15.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Бактериальные бета-лактамазы и карбапенемазы обуславливают устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к классу бета-лактамных антибиотиков, включающих пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Их широкое распространение среди бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных представляет глобальную угрозу. Разработан биочип с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена для одновременной идентификации генов всех клинически значимых бета-лактамаз класса А и карбапенемаз классов А, В и D. На биочипе также определялись 25 замен в нуклеотидной последовательности бета-лактамаз класса А, кодирующие их ключевые замены аминокислотных остатков. Оптимизированы условия аллель-специфической гибридизации меченных биотином ДНК-мишеней с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности биочипа. Для получения ДНК-мишеней разработан метод мультиплексной амплификации всех исследуемых генов в одной реакции с одновременным введением биотина. Апробация биочипа проведена с использованием смесей генов бета-лактамаз и карбапенемаз, а также 68 образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Общее время анализа образца ДНК составляло ~4 ч. Продемонстрирована высокая специфичность идентификации комбинаций генов исследуемых ферментов, что может быть использовано для исследования мультирезистентных бактерий.

Ключевые слова: биочип, бета-лактамазы, карбапенемазы, гибридизационный анализ ДНК, мультиплексная ПЦР, пероксидаза, колориметрическая детекция

DOI: 10.31857/S0555109920020129

С момента открытия и до настоящего времени бета-лактамные антибиотики являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами для лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы. Однако широкое распространение бактерий, устойчивых к данному классу антибиотиков, признано глобальной угрозой и существенно ограничивает возможности химиотерапии [1–3]. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных бактерий к бета-лактамам является продукция ферментов бета-лактамаз (КФ 3.5.2.6), гидролизующих бета-лактамное кольцо антибиотиков [4]. С каждым годом стремительно растет количество известных бета-лактамаз, и к настоящему времени описано около 2800 различных представителей этого суперсемейства ферментов, которые подразделяют на четыре молекулярных класса А, В, С и D [4, 5]. Ферменты классов А, С и D содержат остаток серина в каталитическом активном центре, а фер-

менты класса В являются металло-бета-лактамазами. В настоящее время наибольшую опасность представляют бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), способные расщеплять пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений, а также карбапенемазы (КФ 3.5.2.6), гидролизующие наряду с пенициллинами и цефалоспорины самые новые антибиотики класса бета-лактамов – карбапенемы.

Наиболее распространенные БЛРС относятся к трем типам (TEM, SHV и CTX-M), причем все они представлены сериновыми гидролазами класса А. Внутри каждого типа ферментов присутствует ограниченное число аминокислотных мутаций, называемых ключевыми и влияющих на каталитические свойства, субстратную специфичность и устойчивость ферментов к ингибиторам бета-лактаманной природы (клавулановой кислоте, сульбактаму и та-зобактаму) [6]. У бета-лактамаз TEM типа к клю-

чевым относят замены аминокислотных остатков в положениях 69, 130, 104, 164, 238, 240, 244, 275 и 276, у бета-лактамаз SHV типа – 35, 69, 130, 179 и 234, 238, 240, у СТХ-М типа – 167 и 240. Большинство этих замен кодируется единичными заменами в нуклеотидной последовательности генов, то есть одонуклеотидным полиморфизмом (ОНП).

В отличие от бета-лактамаз класса А карбапенемазы разнообразны по своему строению и относятся к трем молекулярным классам А, В и D [4, 7]. Среди сериновых карбапенемаз класса А наиболее распространенными являются ферменты КРС типа [8]. Эти ферменты гидролизуют практически все группы бета-лактаманых антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины всех поколений, карбапенемы и азтреонам, что обусловлено структурой активного центра и расположением каталитического остатка серина таким образом, что он доступен для различных субстратов [9].

Молекулярный класс В объединяет все металло-бета-лактамазы (МБЛ), в активном центре которых присутствуют один или два иона Zn^{2+} [10]. Данные ферменты характеризуются высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все бета-лактаманые антибиотики за исключением монобактамов. МБЛ нечувствительны к ингибиторам бета-лактаманой природы, а ингибируются только хелатирующими агентами, например, ЭДТА. Наиболее распространенными типами карбапенемаз являются VIM и IMP, которые на основании гомологии последовательностей разделяются на три и пять субкластеров соответственно.

В 2007 г. были впервые обнаружены новые МБЛ, относящиеся к NDM типу и гидролизующие все классы бета-лактаманых антибиотиков, за исключением монобактамов [11], а уже к 2012 г. эти ферменты были найдены у бактерий, присутствующих на всех континентах земного шара. Бактерии, продуцирующие данные МБЛ, как правило, относятся к мульти- и пан-резистентным, поскольку на плаزمиде, несущих ген bla_{NDM} , всегда располагается комплекс интегрона класса I, включающий комплекс других генов устойчивости к бета-лактамам (гены карбапенемаз КРС, OXA, VIM типов, БЛРС и бета-лактамаз класса C), макролидам (гены эритромицинэстеразы), аминоглюкозидам (гены 16S метилазы), хинолонам (гены Qnr), тетрациклинам (гены системы эффлюкса), сульфонамидам (гены дигидроптероатсинтазы) и рифампицину (гены рифампицин-модифицирующих ферментов) [12, 13].

Среди карбапенемаз OXA типа класса D выделяют 5 субкластеров: OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-48 и OXA-58. Их субстратная специфичность сильно различается, но, в основном, они гидролизуют карбапенемы, пенициллины и це-

фалоспорины I поколения (цефалотин и цефалоридин) [14].

В настоящее время появление множественной устойчивости к нескольким и даже практически ко всем существующим антибактериальным препаратам привело к появлению мультирезистентных, экстремально резистентных и пан-резистентных штаммов [12, 15]. При этом наблюдается экспоненциальный рост устойчивости как среди возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных), так и внебольничных инфекций. Обнаружены бактерии, продуцирующие одновременно несколько бета-лактамаз класса А совместно с карбапенемазами различных классов. Появление множественной устойчивости возбудителей одновременно к нескольким типам антибиотиков существенно ограничивает выбор адекватной лекарственной терапии. Для рационального применения антибактериальных препаратов необходимо понимание молекулярных механизмов индукции резистентности и наличие адекватных высокотехнологичных методов ее идентификации.

В связи с многообразием и опасностью широкого распространения бета-лактамаз и карбапенемаз становится актуальной задача поиска надежных методов их диагностики. В настоящее время для этих целей, в основном, используются микробиологические тесты [16]. Однако они длительны по времени (24–72 ч) и малоэффективны при определении карбапенемаз. При этом трактовка их результатов часто неоднозначна, особенно в случаях, когда наблюдается одновременная продукция нескольких типов бета-лактамаз и карбапенемаз. В последние годы активно развиваются молекулярно-генетические методы идентификации генов бета-лактамаз, включающие амплификацию нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) и методы молекулярной гибридизации [18–20]. К их недостаткам можно отнести необходимость проведения множества параллельных процессов амплификации для увеличения количества определяемых типов генов. Как правило, подразделения гетерогенных типов ферментов на субкластеры не проводятся.

Перспективными для одновременного определения множества генов в одном анализе являются методы анализа ДНК на биочипах [21–23]. Данная технология характеризуется высокой производительностью и позволяет проводить анализ в малом объеме реакционной смеси, что снижает расход реагентов и стоимость анализа в целом. В предыдущей работе [24] был разработан метод гибридизационного анализа ДНК на биочипах с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена. При этом на поверхности мембранного носителя образуется нерастворимый окрашенный продукт, определение интенсивности окраски которого

проводится с использованием оптического сканера высокого разрешения. Данный биочип был использован для определения генов трех типов БЛРС (TEM, SHV и CTX-M), относящихся к классу А.

Цель работы – разработка метода одновременной идентификации трех типов генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV, CTX-M) и восьми типов генов карбапенемаз (KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) путем гибридационного анализа на биочипах с колориметрической детекцией.

МЕТОДИКА

Набор праймеров для ПЦР и аминоксидифицированные олигонуклеотидные зонды синтезированы в “Синтол” (Россия). Образцы ДНК, выделенных из культур контрольных штаммов микроорганизмов-продуцентов бета-лактамаз и карбапенемаз, а также образцы ДНК, выделенных из клинических образцов возбудителей внутрибольничных инфекций, были предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (Смоленск, Россия) и НИИ нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко (Москва, Россия).

Иммобилизацию олигонуклеотидных зондов на поверхности биочипов из нитроцеллюлозы BioTrace NT (“Pall Corporation”, США) проводили как описано в работе [24]. Структуры зондов для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз класса А и определения ОНП в них были описаны ранее [24, 25]. Амплификацию исследуемых генов с одновременным включением в качестве метки биотина проводили в процессе мультиплексной ПЦР: общий объем смеси составлял 25 мкл и содержал: 5 мкл 5 × KAPA2G буфер М, 2 мМ хлорид магния, KAPA2G Fast HotStart ДНК-полимераза (“KAPA Biosystems”, США), по 100 мкМ dATP, dGTP и dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-12-биотин (“ДНК-синтез”, Россия), по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров (список и структуры праймеров приведены в табл. 1) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (“Eppendorf”, Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 30 циклов амплификации (10 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 10 с – элонгация при 72°C), 2 мин – завершающий этап элонгации при 72°C.

Для фрагментации меченые ПЦР-продукты растворяли до концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl, рН 8.0, содержащий 10 мМ MgSO₄ и 1 мМ CaCl₂), и добавляли ДНКазу I (0.5 мЕд./1 нг ДНК) (“Fermentas”, Германия). Инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем добавляли 3 мМ ЭДТА

и дополнительно инкубировали в течение 10 мин при 65°C. Размер полученных фрагментов составлял 50–150 п.н. 750 нг меченой фрагментированной ДНК растворяли в гибридационном буфере 2xSSPE, рН 7.4, содержащем 0.02 М NaH₂PO₄, 0.002 М ЭДТА, 0.3 М NaCl и 1.6 пмоль/мл контрольного меченого биотином олигонуклеотида (положительный контроль гибридазации). Биочип помещали в гибридационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в термомиксере Thermomixer Comfort (“Eppendorf”, Германия) в течение 1 ч при 45°C. После гибридазации мембраны отмывали два раза по 15 мин при комнатной температуре фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0.05% Твина 20 (ФСБТ). Для детекции результатов гибридазации микрочипы инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворе (1 мкг/мл) конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (“Имтек”, Россия) в ФСБТ, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Микрочипы отмывали при перемешивании ФСБТ (10 мин) и ФСБ (10 мин) при комнатной температуре и помещали на 10 мин в субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), H₂O₂ (“НВО Иммунотех”, Россия) и декстран сульфата натрия (“Sigma-Aldrich”, США) до конечной концентрации 0.5% (по массе). После высушивания биочипы сканировали на сканере Perfection V750 Pro (“Epson”, Германия) при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения в формате tiff обрабатывали количественно с использованием программы Scan Array Express (“PerkinElmer”, version 3.0, Германия). Аналитическим сигналом являлась интенсивность окрашивания зоны биочипа. Сигнал принимался значимым, если средняя интенсивность превышала интенсивность фоновое окрашивания более, чем на 5 величин стандартного отклонения. Принцип определения нуклеотида в позиции ОНП и кодируемой аминокислотной замены описан в работе [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Совместная амплификация генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР. Для получения ДНК-мишеней всех исследуемых генов был разработан метод одновременной амплификации генов трех типов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV и CTX-M) и восьми типов карбапенемаз классов А, В, и D (KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) в процессе одной мультиплексной ПЦР. Для реакции амплификации было использовано 18 пар праймеров (табл. 1). Поскольку гены, кодирующие бета-лактамазы CTX-M типа и карбапенемазы OXA типа, достаточно разнородны, они были разделены на основании гомологии нуклеотидных последовательностей на 4 и 5 кластеров соответственно. Для каждого генетического кластера была подо-

Таблица 1. Последовательность и характеристики праймеров для амплификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз в мультиплексной ПЦР

Тип фермента	Последовательность праймера, 5' → 3'	Длина, нукл.	GC, %	T _{пл.} , °C	Длина ампликона, п.н.
TEM	Пр	ATGAGTATTCAACAATTTCCGGTGTCTC	37.5	63.0	851
	Об	TTAATCAGTGAGGCASCTATCTC	43.5	63.0	
SHV	Пр	TTAATTCGCCTGTGTAATATCTC	33.3	60.0	856
	Об	GTTAGCGTTGCCAGTGTCTCG	60.0	67.0	
CTX-M-1	Пр	ATGGTTAAAAAATCACTGGCCSAG	41.7	66.0	869
	Об	CCGTCGGTGACCGAATTTAGCCCG	59.1	68.2	
CTX-M-2	Пр	ATGATGACTCAGAGCAATTCGCC	50.0	66.0	869
	Об	CCGTGGGTACCGAATTTCCGCCG	59.1	68.8	
CTX-M-8	Пр	ATGATGAGACATCGCGTTAAGC	45.5	64.4	869
	Об	CCGTGGGTGACCGAATTTCCGCCG	61.9	68.8	
CTX-M-9	Пр	GGTGACAAAAGAGAGTGC AACGG	54.5	66.7	868
	Об	CCCTTCGGCGATGATCTCCG	61.9	68.3	
IMP	Пр	GAAGG(C/T)GTTATGTTCAATC(T/A)TCC	37.5–41.7	61.5–63.4	586
	Об	GTA(A/C)G(T/C)TTCAGAG(T/C)GA(T/C)GC(G/A)TCTC			
VIM	Пр	GATGGTGTGTTGGTCCGATATCCG	52.2	67.1	505
	Об	CAATC(A/T)GCCAGATCGGCATCC	57.1	66.6	
SPM	Пр	CGTTTGTGTTGTTGCTCGTTGGG	47.8	67.2	643
	Об	CACATGGCATCTCCAGATAACC	50.0	66.3	
SIM	Пр	GTTTCCGGAAAGAACCCAGCCAG	60.9	70.8	588
	Об	GTCTCCGATTTCACTGTGGCTTGGG	56.0	69.7	
GIM	Пр	CTTGTAGCGTTGCCAGCTTTAGCTCG	53.8	70.0	614
	Об	CTGAACTTCCAACCTTGGCCATGCCCC	53.8	70.7	
NDM	Пр	CTTCCCTATCTCGACATGC	50.0	58.3	503
	Об	CGTAGTGTCTCAGTGTCCG	58.8	60.7	
KPC	Пр	TTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGG	47.8	65.5	801
	Об	CCCTCGCTGTCTTGTCTCATCC	60.0	66.5	
OXA-23	Пр	GAAACCCCGAGTCCAGATGTTCAAG	48.0	66.5	689
	Об	GGCATTCTGACCCGATTTCC	52.4	65.7	
OXA-40	Пр	GTTTCTCTCAGTGCATGTTCAATC	43.5	63.2	713
	Об	CATTTCTAAAGTTGAGCCGAAAAGGGG	44.0	65.4	
OXA-51	Пр	CGAAGCACACACTACGGGTG	60.0	66.2	648
	Об	CTCTTTTCCGAACAGAGCTAGGTATTC	42.3	64.2	
OXA-58	Пр	CTTGTGCTGAGCATAAGTAGAGTC	45.8	64.1	684
	Об	CCACTGCCCCATCTGCCCTTTTC	54.5	67.3	
OXA-48	Пр	GCGTGTATTAGCCTTATCCGGC	52.4	64.3	672
	Об	CCACACATTAATCATCAAGTTCAACC	40.0	63.7	

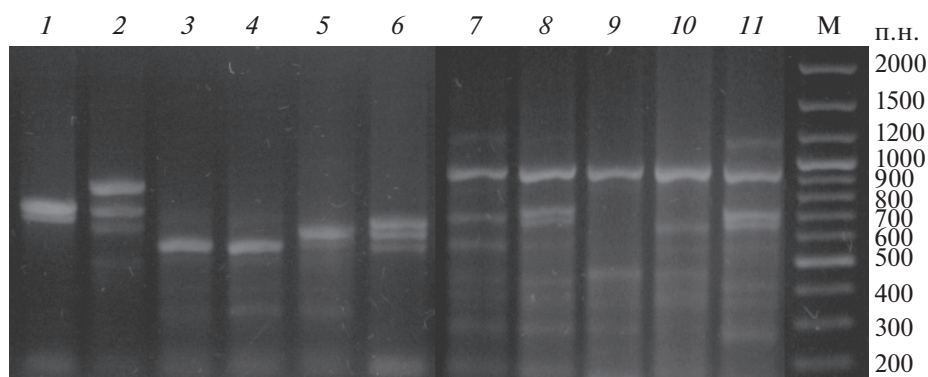


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР: 1 – OXA-40, 2 – OXA-48, 3 – VIM-1, 4 – VIM-2, 5 – IMP-1, 6 – IMP-2, 7 – TEM-1, 8 – SHV-5, 9 – SHV-18, 10 – CTX-M-15, 11 – CTX-M-3, М – ДНК-маркеры.

брана пара специфических праймеров. Результаты электрофореза продуктов амплификации исследуемых генов в 1%-ном агарозном геле показаны на рис. 1. Все целевые гены бета-лактамаз и карбапенемаз удалось амплифицировать с достаточным для дальнейшей гибридизации выходом (не менее 40 нг ДНК/мкл). При амплификации практически всех генов наблюдали образование неспецифических продуктов амплификации. Оптимизация температуры стадии отжига праймеров и времени проведения каждой стадии реакции амплификации позволила сократить общее время реакции до 40 мин.

Влияние условий гибридизации на специфичность гибридизации идентификационных зондов. Для одновременной идентификации разнородных генов бета-лактамаз и карбапенемаз в одном анализе, включая одновременное определение единичных замен в генах бета-лактамаз класса А, была проведена оптимизация условий гибридизационного анализа ДНК-мишени с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности биочипа. Целью оптимизации было повышение специфичности определения генов каждого типа, поскольку ДНК-мишени содержали побочные продукты амплификации. Было изучено влияние температуры гибридизации и солевого состава гибридизационного буфера, которые относятся к параметрам, наиболее существенно влияющим на специфичность определения ДНК в гибридизационном анализе. На биочипах с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами проводили гибридизацию 300 нг биотинилированной ДНК, амплифицированной из контрольных штаммов-продуцентов бета-лактамаз, в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. Далее определяли интенсивность сигналов гибридизации ДНК-мишени каждого типа бета-лактамаз со специфическими для них зондами, а уровень неспецифической гибридизации определяли по интенсивности сигналов гибри-

дизации данной ДНК-мишени с зондами для других типов и субклассов бета-лактамаз.

Выбор оптимальной температуры гибридизации.

При выборе температуры гибридизации основным критерием являлось то, что она должна быть ниже температуры плавления (T_m) образующихся гетеродуплексов между комплементарным зондом и ДНК-мишенью. Диапазон исследованных температур гибридизации составил от 40 до 50°C и не превышал T_m отдельных олигонуклеотидных зондов, а также ограничивался температурой, при которой наблюдали высокий уровень неспецифической гибридизации. Выборочные данные по гибридизации генов бета-лактамаз класса А (TEM, SHV и CTX-M типов) и карбапенемаз (VIM и OXA типов) с иммобилизованными на биочипах специфическими идентификационными зондами, полученные при разных температурах гибридизации, представлены на рис. 2.

Анализ полученных результатов показал, что абсолютные интенсивности сигналов были выше при более низких температурах и уменьшались с увеличением температуры. При проведении гибридизации при 40°C абсолютная интенсивность сигналов оказалась высокой (для большинства зондов она превышала 25000 усл. ед.), однако при этом ряд наборов зондов, определяющих единичные замены в генах TEM бета-лактамаз, показывали низкую дискриминирующую способность. Для генов подгрупп CTX-M бета-лактамаз и IMP карбапенемаз при этой температуре наблюдалась сильная перекрестная гибридизация с наборами зондов других подгрупп (на диаграмме приведено значение для неспецифической гибридизации с наибольшей интенсивностью сигнала). При проведении гибридизации при 50°C интенсивность гибридизационных сигналов в целом была низкой и определение единичных замен, соответствующих мутациям аминокислотных остатков в позициях 69, 104 и 130 у TEM бета-лактамаз и в

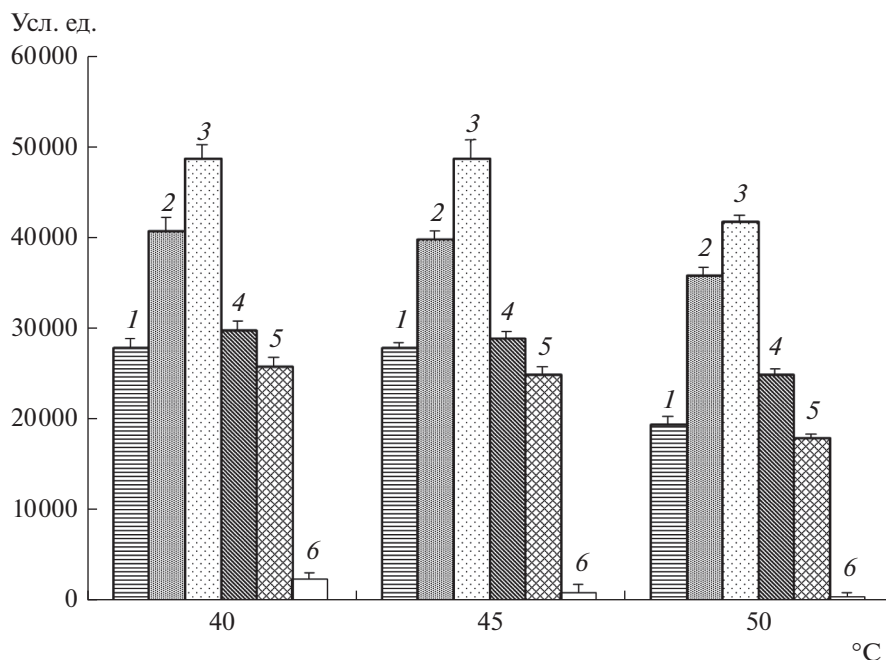


Рис. 2. Влияние температуры гибридизации (°C) на интенсивность окрашивания зоны биочипа (усл. ед.) при гибридном анализе генов бета-лактамаз (1 – TEM-1, 2 – SHV-1, 3 – CTX-M-15), карбапенемаз (4 – VIM-1, 5 – OXA-51) и неспецифической гибридизации (6).

позициях 69, 130 и 238/240 у SHV бета-лактамаз, оказалось невозможным. В качестве оптимальной температуры для проведения гибридизации было выбрано 45°C.

Выбор концентрации NaCl в гибридном буфере. Результат гибридизации олигонуклеотидных зондов с ДНК-мишенью зависел также от концентрации соли в гибридном буфере. Влияние концентрации NaCl на результат гибридизации изучали на двух вариантах генов карбапенемаз (IMP-1 и VIM-1) и двух различных генах бета-лактамаз класса А (SHV-1 и CTX-M-15). Гибридизацию проводили при 45°C. На рис. 3 показаны выборочно результаты гибридизации ДНК-мишени со специфическими зондами, полученные при использовании гибридного буфера с различным содержанием NaCl. Увеличение концентрации соли приводило до определенной ее концентрации к увеличению наблюдаемых интенсивностей гибридных сигналов вследствие уменьшения взаимного отталкивания заряженных фосфатных групп двух нуклеотидных цепей. Однако при использовании буфера с высокой концентрацией соли (1 М) специфичность реакции гибридизации падала. Для идентификации единичных замен в генах при проведении гибридизации при низкой концентрации соли в гибридном буфере (30 мМ) интенсивность гибридных сигналов была очень низкой, при этом не наблюдалось гибридных сигналов для более чем 50% наборов зондов. Это свидетельствовало о том,

что в гибридной смеси оказывалось недостаточно содержания ионов натрия, чтобы полностью экранировать отрицательные заряды сахарофосфатных остовов олигонуклеотидных зондов и ДНК-мишеней, и между ними при гибридизации действовали силы электростатического отталкивания. Увеличение содержания ионов натрия в гибридной смеси приводило к увеличению интенсивности гибридных сигналов, которые достигали максимальных значений при 0.3–1.0 М NaCl, и при этом выявлялось максимальное количество точечных замен в генах. Однако следует отметить, что интенсивность сигналов неспецифической гибридизации также возрастала. При этом для большинства наборов зондов значения неспецифической гибридизации увеличивались в большей степени, чем увеличение специфических сигналов, что в результате снижало специфичность выявления нуклеотидов. Таким образом, концентрация NaCl, соответствующая 0.3 М, была оптимальной для наиболее удачного соотношения эффективности и специфичности гибридизации.

Биочип для одновременной идентификации генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз. Для одновременной идентификации генов бета-лактамаз класса А (трех типов: TEM, SHV и CTX-M), карбапенемаз (восемь типов: KPC, NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, GIM и OXA) был проведен дизайн биочипа, который заключался в выборе количества специфических зондов для идентификации

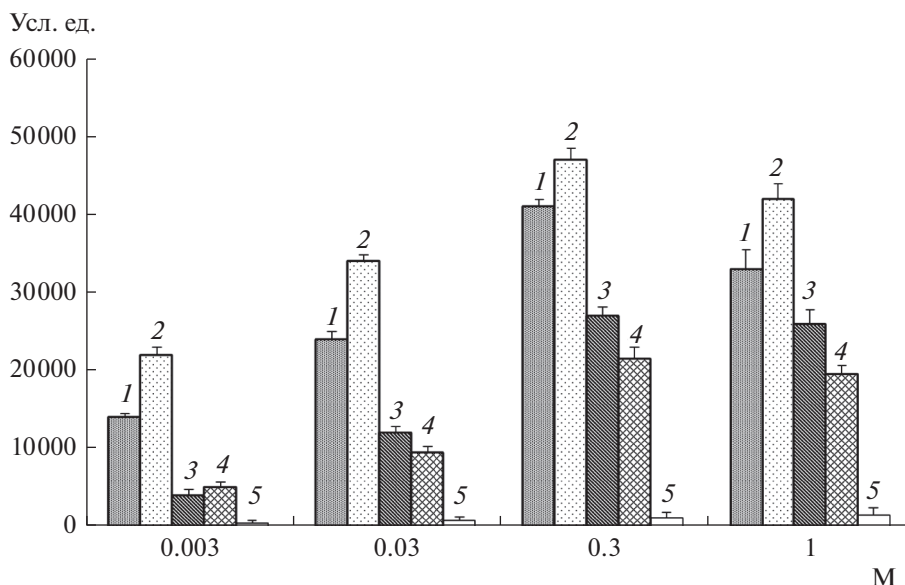


Рис. 3. Влияние концентрации NaCl (М) на интенсивность окрашивания зоны биочипа в гибридационном анализе генов бета-лактамаз (1 – SHV-1, 2 – CTX-M-15), карбапенемаз (3 – VIM-1, 4 – IMP-1) и неспецифической гибридации (5).

ции выбранных типов генов с учетом определения субкластеров и необходимого количества контрольных зондов, а также размещения зондов в необходимом количестве повторов.

Подобраны структуры зондов для идентификации отдельных субкластеров генов бета-лактамаз CTX-M типа (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 и CTX-M-9), карбапенемаз VIM типа (VIM-1, VIM-2 и VIM-7), IMP типа (IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11 и IMP-14), OXA типа (OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51 и OXA-58). Биочип включал олигонуклеотидные зонды для определения 15 позиций ОНП, кодирующих ключевые мутации в бета-лактамазах TEM и SHV типов, обуславливающих изменение профиля субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам (8 позиций в бета-лактамазах TEM типа, 7 – в бета-лактамазах SHV типа). Также биочип включал зонды для определения 10 позиций ОНП для идентификации бета-лактамаз внутри отдельных субкластеров (2 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-1, 5 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-2 и 3 – в бета-лактамазах субкластера CTX-M-9), поскольку они наиболее распространены в РФ и других странах [26]. Схема расположения олигонуклеотидных зондов на поверхности биочипа представлена на рис. 4.

Помимо специфических зондов каждый биочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидных зонда. Каждый зонд наносился в 3 повторах.

Биочип имел следующие размеры: 14 × 12 мм, зоны биочипа расположены в виде матрицы 21 × 18, общее количество зон 378, диаметр одной зоны с

иммобилизованным олигонуклеотидным зондом составлял ~ 350 мкм, расстояние между центрами соседних зон ~ 500 мкм.

Тестирование смесей генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз на биочипе. Возможность одновременной детекции генов различных бета-лактамаз и карбапенемаз была изучена на искусственно приготовленных смесях ДНК различных бета-лактамаз. Предварительно было проведено сравнение результатов гибридации продуктов амплификации изучаемых генов (по одному варианту для каждого типа генов) со специфическими праймерами и в процессе мультиплексной ПЦР. Для этого ДНК-мишени исследуемых ферментов, меченные биотином, были получены методом специфической ПЦР с одной парой специфических праймеров и методом мультиплексной ПЦР со смесью 18 пар праймеров. Несмотря на то, что мультиплексная ПЦР сопровождалась синтезом побочных продуктов реакции (рис. 1), было показано, что специфичность идентификации генов бета-лактамаз и карбапенемаз в гибридационном анализе на биочипах оказалась одинаково высокой для всех исследованных ДНК-мишеней, полученных в ПЦР с одной парой специфических праймеров и в процессе мультиплексной ПЦР.

Далее ДНК-мишени всех исследуемых генов получали разработанным методом мультиплексной ПЦР. Были протестированы различные варианты генов бета-лактамаз (TEM-1 и SHV-1), БЛРС класса А (TEM-3, TEM-6, SHV-2, SHV-5, CTX-M-3, CTX-M-9 и CTX-M-15) и карбапенемаз VIM-1, VIM-2, IMP-1, IMP-2, KPC-3, VIM-1,

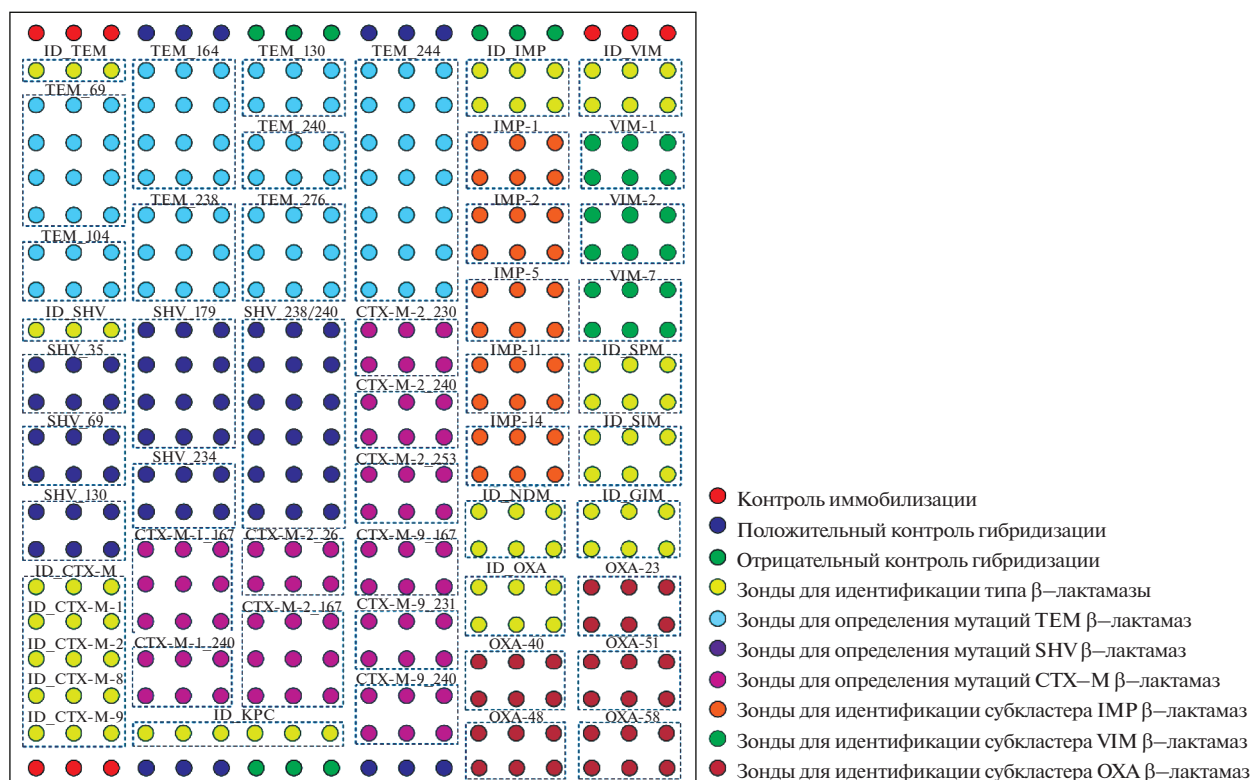


Рис. 4. Расположение олигонуклеотидных зондов на биочипе для идентификации генов 3 типов бета-лактамаз класса А, 8 – карбапенемаз и 24 позиций однонуклеотидного полиморфизма в генах

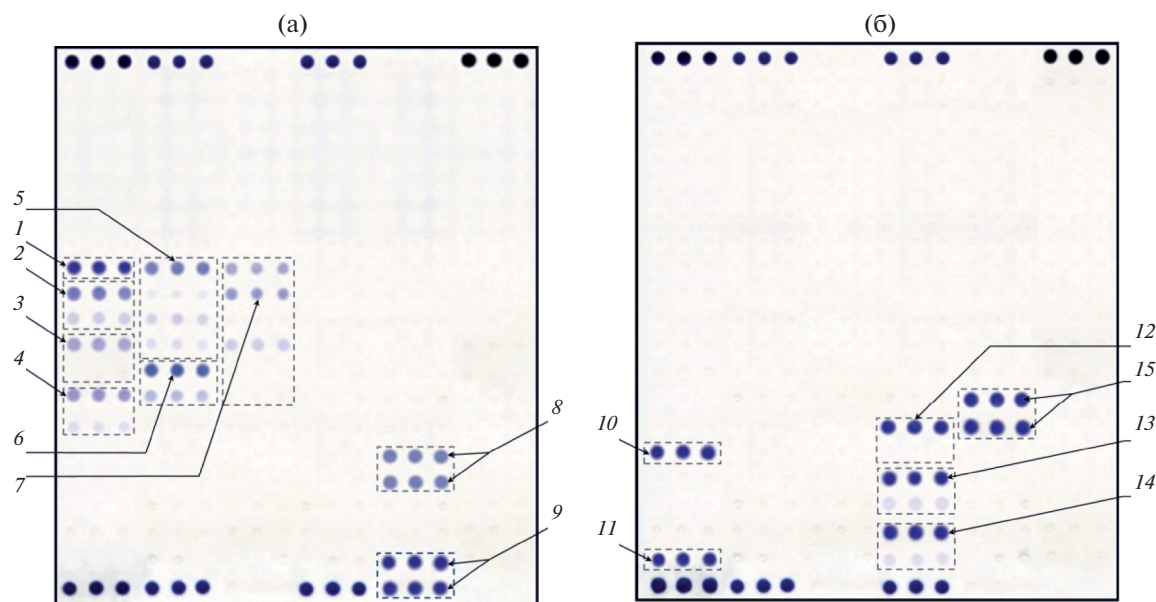


Рис. 5. Изображение биочипов после проведения гибридационного анализа смесей ДНК, выделенных из контрольных штаммов грамотрицательных бактерий: а – смеси генов бета-лактамазы SHV-5 (окрашивание зон биочипа получено для зондов 1 (тип SHV) и зондов, определяющих аминокислотные мутации в SHV бета-лактамазах: 2 – Leu35, 3 – Met69, 4 – Ser130, 5 – Asp179, 6 – Lys234, 7 – замены Gly238Ser/Glu240Lys) и карбапенемазы OXA-48 (окрашивание зон биочипа получено для зондов 8 (тип OXA) и 9 (субкластер OXA-48)); б – смеси генов бета-лактамазы CTX-M-9, окрашивание зон биочипа получено для зондов 10 (тип CTX-M), 11 (субкластер CTX-M-9) и зондов, определяющих аминокислотные мутации в субкластере CTX-M-9: 12 – Pro167, 13 – Ala231, 14 – Asp240) и карбапенемазы NDM-1, окрашивание зон биочипа получено для зондов 15 (тип NDM).

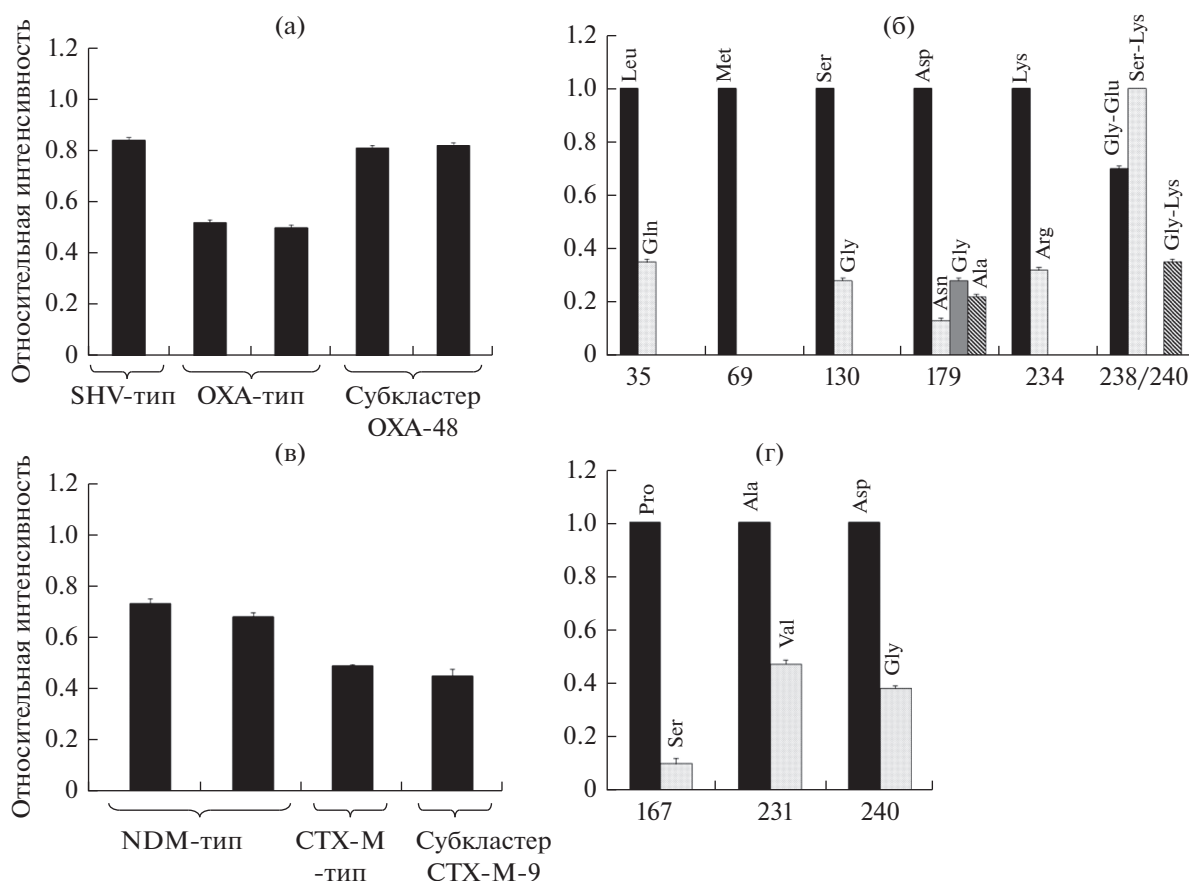


Рис. 6. Результаты гибридационного анализа смесей ДНК, выделенных из контрольных штаммов грамотрицательных бактерий, на которых идентифицированы: а, б – смесь генов бета-лактамазы SHV-5 и карбапенемазы OXA-48: а – значимые сигналы гибридазации получены для зондов “тип SHV”, “тип OXA”, “субкластер OXA-48”; б – значимые сигналы гибридазации получены для зондов, определяющих следующие аминокислоты в ключевых позициях SHV бета-лактамаз: Leu35, Met69, Ser130, Asp179, Lys234, замены Gly238Ser/Glu240Lys (соответствует SHV БЛРС); в, г – смесь генов бета-лактамазы CTX-M-9 и карбапенемазы NDM-1: в – значимые сигналы гибридазации получены для зондов “тип NDM”, “тип CTX-M”, “субкластер CTX-M-9”, г – значимые сигналы гибридазации получены для зондов, определяющих следующие аминокислоты в ключевых позициях CTX-M бета-лактамаз: Pro167, Ala231, Asp240.

VIM-2, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-51 и OXA-58 в различных сочетаниях. Все ДНК-мишени гибридовались как индивидуально, так и в комбинациях только со специфическими зондами, при этом уровень неспецифической гибридазации не превышал заданный интервал (5-кратное превышение стандартного отклонения усредненного значения аналитического сигнала). Во всех экспериментах наблюдали хороший уровень воспроизводимости интенсивности окрашивания всех трех повторов каждого зонда. Коэффициенты вариации интенсивностей окрашивания зон всех специфических зондов с комплементарной ДНК-мишенью, каждый из которых был нанесен в трех повторах, варьировали от 5 до 10%. Для зондов, уровень гибридазации ДНК-мишени с которыми был незначительным и соответствовал неспецифической гибридазации,

наблюдали более высокие значения коэффициентов вариации, но они не превышали 20%.

Результаты гибридационного анализа представлены выборочно для двух смесей ДНК. Смесь № 1 была получена из образцов ДНК карбапенемазы OXA-48 и бета-лактамазы SHV-5, смесь № 2 состояла из ДНК металло-бета-лактамазы NDM-1 и бета-лактамазы CTX-M-9. Продукция таких сочетаний бета-лактамаз класса А и карбапенемаз описана у мультирезистентных клинических штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций [27]. На рис. 5 представлены изображения биочипов после проведения гибридационного анализа двух смесей генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз, на рис. 6 – результаты количественной обработки интенсивностей окрашивания зон биочипа.

Поскольку все исследованные ДНК бета-лактамаз и карбапенемаз правильно и достоверно идентифицировались на биочипе, можно было

Таблица 2. Результаты гибридизационного анализа на биочипах образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных бактерий, на наличие генов бета-лактамаз и карбапенемаз

Типы/Субтипы найденных бета-лактамаз и карбапенемаз	Число штаммов
Штаммы, чувствительные к цефалоспорином 3–4 поколений и карбапенемам ($n = 19$)	
Не обнаружено генов бета-лактамаз	14
TEM-1	2
SHV-1	3
Штаммы, устойчивые к цефалоспорином 3–4 поколений ($n = 27$)	
Продуцирующие одну БЛРС, в том числе на фоне пенициллиназ TEM-1 и/или SHV-1 ($n = 19$)	
CTX-M-3	1
CTX-M-15	1
CTX-M-14	1
TEM-1 + SHV-5	1
TEM-1 + CTX-M-3	2
TEM-1 + CTX-M-15	6
TEM-1 + CTX-M-14	1
SHV-1 + CTX-M-15	3
TEM-1 + SHV-1 + CTX-M-15	3
Продуцирующие две БЛРС, в том числе на фоне пенициллиназ TEM-1 и/или SHV-1 ($n = 8$)	
SHV-5 + CTX-M-9	1
TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-3	1
TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-15	1
TEM-1 + SHV-5 + CTX-M-14	1
SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-14	1
TEM-1 + SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-15	2
TEM-1 + SHV-1 + SHV-5 + CTX-M-14	1
Штаммы, устойчивые к цефалоспорином 3–4 поколений и карбапенемам ($n = 22$)	
Продуцирующие одну карбапенемазу ($n = 12$)	
VIM-2	11
NDM	1
Продуцирующие две карбапенемазы ($n = 10$)	
OXA-23 + OXA-51	1
OXA-40 + OXA-51	5
OXA-58 + OXA-51	4

заклучить, что разработанный биочип позволял проводить высокоспецифическую идентификацию генов бета-лактамаз класса А и карбапенемаз с разделением отдельных типов ферментов на субкластеры даже при одновременной продукции нескольких ферментов в одном образце.

Апробация биочипа для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А. Разработанный олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А был апробирован на 68 образцах ДНК, выделенных из клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, полученных в

различных лечебных учреждениях России. Все штаммы были предварительно охарактеризованы фенотипически с использованием диско-диффузионного метода. Так, 19 образцов были чувствительны к действию цефалоспоринов 3–4 поколений и карбапенемов (отсутствие продукции БЛРС и карбапенемаз), 27 образцов оказались устойчивы к действию цефалоспоринов 3–4 поколений и характеризовались фенотипом БЛРС (+), а 22 образца – устойчивы к карбапенемам (карбапенемазы +).

Результаты гибридизационного анализа этих образцов на биочипах представлены в табл. 2. При тестировании 19 образцов ДНК, выделен-

ных из штаммов микроорганизмов, чувствительных к действию карбапенемов и цефалоспоринов 3–4 поколений, гены бета-лактамаз и карбапенемаз исследуемых типов не были обнаружены в 14, а среди 5 представителей *Enterobacteriaceae* spp. были идентифицированы гены пенициллиназ TEM-1 и SHV-1, которые обуславливали устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином I поколения. Таким образом, не было выявлено ложноположительных и ложноотрицательных результатов наличия генов бета-лактамаз и карбапенемаз при тестировании на биочипах ДНК клинических образцов.

При исследовании 27 образцов ДНК бактерий, устойчивых к цефалоспорином 3–4 поколений, в 19 были идентифицированы гены одной БЛРС (СТХ-М типа ($n = 18$) или SHV типа ($n = 1$)), в 8 – гены одновременно двух БЛРС (сочетания генов ферментов СТХ-М и SHV типов). Ложноотрицательных результатов при тестировании клинических образцов не было выявлено.

При анализе 22 образцов ДНК бактерий, устойчивых к действию карбапенемов, в 12 образцах были идентифицированы гены одной карбапенемазы (типа VIM ($n = 11$) или NDM ($n = 1$)), а в 10 – гены одновременно двух карбапенемаз ОХА типа.

Идентификация генов бета-лактамаз на микрочипах показала 100%-ное совпадение с данными микробиологического фенотипирования, секвенирования и метода ПЦР РВ. Разработанный биочип позволял правильно определить тип фермента, принадлежность к определенному субкластеру и наличие ключевых мутаций в ферментах класса А, определяющих профиль субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам.

Таким образом, оптимизация гибридационного анализа на биочипах и пробоподготовки ДНК-мишени, проведенная методом мультиплексной ПЦР, позволила создать биочип, с помощью которого в одном анализе можно специфично идентифицировать гены всех клинически значимых на сегодняшний день бета-лактамаз. К его преимуществам можно отнести впервые выполненную на одном биочипе идентификацию генов нескольких типов ферментов на уровне субкластеров (четырёх для бета-лактамаз СТХ-М типа, пяти для карбапенемаз ОХА типа, трех для карбапенемаз VIM типа, пяти для карбапенемаз IMP типа). Одновременно биочип позволял высокоспецифично определять ключевые замены в генах бета-лактамаз класса А, что важно для идентификации БЛРС. Общее время анализа образца ДНК составило около 4 ч. К одному из основных преимуществ разработанного метода относится высокая специфичность идентификации нескольких генов в одном образце, что может

быть использовано при исследовании мультирезистентных штаммов бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00014-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cassini A., Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S. // *Lancet Infect Dis.* 2019. V. 19. № 1. P. 56–66.
2. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J., Findlay D., Gyssens I., Heuer O.E., Kahlmeter G., Kruse H., Laxminarayan R., Liébana E., López-Cerero L., MacGowan A., Martins M., Rodríguez-Baño J., Rolain J.M., Segovia C., Sigauque B., Tacconelli E., Wellington E., Vila J. // *New Infections.* 2015. V. 16. № C. P. 22–29.
3. Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J. // *Lancet.* 2016. V. 387. № 10014. P. 176–187.
4. Bush K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 10. P. 1–20.
5. Bonomo R.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–16.
6. Bush K., Bradford P.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 8. P. 1–22.
7. van Duin D, Doi Y. // *Virulence.* 2017. V. 8. № 4. P. 460–469.
8. Naas T, Dortet L., Iorga B.I. // *Curr. Drug. Targets.* 2016. V. 17. № 9. P. 1006–1028.
9. Jean S.-S., Lee W.-S., Lam C., Hsu C.-W., Chen R.-J., Hsueh P.-R. // *Future Microbiol.* 2015. V. 10. № 3. P. 407–425.
10. Somboro A.M., Osei S.J., Amoako D.G, Essack S.Y., Bester L.A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. V. 7. № 18. pii: e00698-18.
11. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A., Zong Z. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2019. V. 32. № 2. pii: e00115-18.
12. Eichenberger E.M., Thaden J.T. // *Antibiotics (Basel).* 2019. V. 8. № 2. P. pii: E37.
13. Groundwater P.W., Xu S., Lai F., Varadi L., Tan J. Perry J.D., Hibbs D.E. // *Future Med. Chem.* 2016. V. 8. № 9. P. 993–1012.
14. Evans B.A., Amyes S.G. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. V. 27. № 2. P. 241–263.
15. Geisinger E., Isberg R.R. // *J. Infect. Dis.* 2017. V. 215. № S1. P. S9–S17.
16. Hammoudi D., Moubareck C.A., Moubareck D. // *J. Microbiol. Methods.* 2014. V. 107. P. 106–118.
17. Fleece M.E., Pholwat S., Mathers A.J., Houpt E.R. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2018. V. 18. № 3. P. 207–217.
18. Sekyere J.O., Govinden U., Essack S. Y. // *J. Appl. Microbiol.* 2015. V. 119. № 5. P. 1219–1233.
19. Murugan N., Malathi J., Therese K.L., Narahari H., Madhavan R. // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2018. V. 34. № 2. P. 79e88.
20. Lowman W., Marais M., Ahmed K., Marcus L. // *J. Hosp. Infect.* 2014. V. 88. № 2. P. 66–71.

21. Ledeboer N.A., Hodinka R.L. // *J. Clin. Microbiol.* 2011. V. 9. Suppl. P. S20–S24.
22. Moore N.M., Canton R., Carretto E., Peterson L.R., Sautter R.L., Traczewski M.M., Carba-R Study Team // *J. Clin. Microbiol.* 2017. V. 55. № 7. P. 2268–2275.
23. Ledeboer N.A., Lopansri B.K., Dhiman N., Cavagnolo R., Carroll K.C., Granato P., Thomson R.Jr., Butler-Wu S.M., Berger H., Samuel L., Pancholi P., Swyers L., Hansen G.T., Tran N.K., Polage C.R., Thomson K.S., Hanson N.D., Winegar R., Buchan B.W. // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. № 8. P. 2460–2472.
24. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 26. № 4. P. 1252–1260.
25. Ulyashova M.M., Khalilova Yu.I., Rubtsova M.Yu., Edelstein M.V., Alexandrova I.M., Egorov A.M. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 3. P. 101–109.
26. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2014. Т. 16. № 4. С. 254–265.
27. Bush K. // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2013. V. 1. № 1. P. 7–16.

Biochip For Simultaneous Identification of Beta-Lactamase and Carbapenemase Genes Conferring the Bacterial Resistance to Beta-Lactam Antibiotics

M. Yu. Rubtsova^{a,*}, M. M. Ulyashova^a, Yu. I. Pobolelova^a, G. V. Presnova^a, and A. M. Egorov^a

^a*Chemistry Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: mrubtsova@gmail.com*

Received September 5, 2019; revised October 15, 2019; accepted November 1, 2019

Bacterial beta-lactamases and carbapenemases confer the resistance to beta-lactam antibiotics, including penicillins, cephalosporins, carbapenems and monobactams. Their wide distribution among bacteria that cause infectious diseases in humans and animals represent a global threat. We have developed a biochip with colorimetric detection based on horseradish peroxidase for the simultaneous identification of genes for all clinically relevant class A beta-lactamases and carbapenemases of classes A, B and D, including 24 single substitutions in the nucleotide sequence, encoding the key amino acid substitutions in class A beta-lactamases. The conditions for allele-specific hybridization of biotin-labeled target DNA with oligonucleotide probes immobilized on the surface of the biochip have been optimized. To obtain the target DNA, a method of multiplex amplification of all studied genes in one reaction with the simultaneous incorporation of biotin was developed. The biochip was validated using mixtures of beta-lactamase and carbapenemase genes, as well as 68 DNA samples isolated from clinical strains of Gram-negative bacteria. The high specificity of the identification of genes in mixtures was demonstrated, which can be used in investigation of multiresistant bacteria.

Keywords: biochip, beta-lactamases, carbapenemases, DNA hybridization analysis, multiplex PCR, peroxidase, colorimetric detection