

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

---

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



ПОБОЛЕЛОВА Юлия Илдаровна

**Колориметрические микрочипы для мультианализа  
генов карбапенемаз, обуславливающих устойчивость  
бактерий к бета-лактамым антибиотикам**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
академик РАН, д.б.н., профессор Егоров А.М.  
к.х.н., в.н.с. Рубцова М.Ю.

Москва – 2017

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
ГЛАВА 1. УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К КАРБАПЕНЕМАМ .....	9
1.1. Карбапенемы.....	9
1.2. Основные механизмы устойчивости микроорганизмов к карбапенемам.....	13
1.3. Классификация бета-лактамаз.....	15
1.4. Карбапенемазы различных молекулярных классов .....	19
1.4.1. Карбапенемазы молекулярного класса А.....	19
1.4.2. Карбапенемазы молекулярного класса В.....	22
1.4.3. Карбапенемазы молекулярного класса D.....	28
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К КАРБАПЕНЕМАМ И ТИПИРОВАНИЯ КАРБАПЕНЕМАЗ.....	32
2.1. Фенотипические методы определения устойчивости к карбапенемам.....	32
2.1.1. Определение антибиотикочувствительности бактерий по значению минимально подавляющей концентрации .....	32
2.1.2. Скрининговые методы выявления карбапенемаз.....	34
2.1.3. Биохимические и аналитические методы детекции продукции карбапенемаз .....	38
2.2. Генотипические методы идентификации карбапенемаз .....	45
2.2.1. Методы детекции карбапенемаз, основанные на амплификации ДНК.....	45
2.2.2. Секвенирование генов карбапенемаз .....	48
ГЛАВА 3. ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НА ДНК-МИКРОЧИПАХ .....	50
3.1. Гибридационный анализ с использованием меченой ДНК-мишени.....	51
3.2. Гибридационный анализ с использованием «сэндвич» схемы и немеченой ДНК- мишени .....	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	60
ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	60
4.1. Реагенты и оборудование .....	60
4.2. Методы исследований.....	61
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	69
ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КАРБАПЕНЕМАЗ И ИХ КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ.....	69
5.1. Сбор и выравнивание кодирующих последовательностей генов карбапенемаз.....	69
5.2. Деление карбапенемаз на подгруппы .....	70

ГЛАВА 6. АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ .....	72
6.1. Выбор праймеров.....	72
6.2. Оптимизация условий ПЦР .....	74
6.2.1. Оптимизация концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.....	74
6.2.2. Оптимизация концентрации ионов магния.....	75
6.2.3. Оптимизация температуры отжига праймеров.....	75
6.3. Мультиплексная ПЦР для одновременной амплификации генов восьми типов карбапенемаз в одной реакции.....	76
6.4. Введение биотина в качестве метки в гены амплифицируемых карбапенемаз в процессе мультиплексной ПЦР .....	82
ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ .....	84
7.1. Принцип проведения молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов и их тестирования .....	84
7.2. Подбор оптимальной длины спейсера олигонуклеотидных зондов.....	85
7.3. Подбор зондов для определения меченой ДНК .....	86
7.4. Выбор последовательностей «улавливающих» и «детектирующих» зондов для определения немеченой ДНК .....	93
7.4.1. Влияние взаимного расположения «улавливающего» и «детектирующего» олигонуклеотидных зондов .....	95
7.4.2. Зависимость эффективности гибридизационного анализа от типа «улавливаемой» цепи (прямая или обратная).....	101
7.4.3. Влияние положения «улавливающего» зонда на ДНК-мишени на специфичность и чувствительность определения генов.....	102
7.4.4. Влияние величины «свободного» участка ДНК-мишени на эффективность гибридизации ....	104
7.5 Разработка рекомендаций по проведению молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов.....	107
ГЛАВА 8. МЕТОД ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОЙ И НЕМЕЧЕНОЙ ДНК-МИШЕНИ...	109
8.1. Оптимизация условий проведения гибридизации с использованием меченой ДНК-мишени на олигонуклеотидных микрочипах .....	109
8.1.1. Выбор оптимальной температуры гибридизации .....	109
8.1.2. Выбор концентрации соли в гибридизационном буфере .....	110
8.1.3. Влияние фрагментации меченой ДНК на эффективность гибридизации.....	111
8.2. Оптимизация условий проведения сэндвич-гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах.....	113
8.2.1. Оптимизация условий гибридизации двухцепочечной ДНК-мишени .....	113

8.2.2. Влияние ионов магния в гибридизационном буфере на эффективность гибридизации ДНК-мишени .....	114
8.2.3. Оптимизация времени проведения стадии гибридизации.....	114
8.3. Сравнение двух методов гибридизационного анализа – с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени для идентификации генов карбапенемаз на олигонуклеотидных микрочипах.....	116
8.3.1. Исследование специфичности выявления генов карбапенемаз с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени .....	116
8.3.2. Сравнение чувствительности идентификации генов карбапенемаз с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени .....	117
<b>ГЛАВА 9. МИКРОЧИП ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОЙ ДНК-МИШЕНИ .....</b>	<b>119</b>
9.1. Дизайн олигонуклеотидного микрочипа для проведения сэндвич-гибридизации для идентификации генов карбапенемаз.....	119
9.2. Тестирование контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз .....	120
<b>ГЛАВА 10. ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ДНК-МИКРОЧИП ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАРБАПЕНЕМАЗ, БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА И ИНГИБИТОР-РЕЗИСТЕНТНЫХ БЕТА-ЛАКТАМАЗ.....</b>	<b>124</b>
10.1. Дизайн интегрированного олигонуклеотидного микрочипа для определения карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А .....	124
10.2. Тестирование образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз, БЛРС и ИРТ .....	125
10.3. Тестирование смесей генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А ...	129
10.4. Влияние состава ДНК-мишени на специфичность гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах .....	133
<b>ГЛАВА 11. АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРАММОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МИКРОЧИПАХ .....</b>	<b>135</b>
11.1. Апробация олигонуклеотидных микрочипов для идентификации генов карбапенемаз 8 типов методом гибридизационного анализа с использованием немеченой ДНК-мишени.....	135
11.2. Апробация интегрированного олигонуклеотидного микрочипа для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А с использованием меченой ДНК-мишени .....	136
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>139</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>140</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>141</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>158</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
SDS	Додецилсульфат натрия
БЛРС	Бета-лактамазы расширенного спектра
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ДС	Декстрансульфат натрия
ИРТ	Ингибитор-резистентный тип
КОЕ	Колониеобразующая единица
МПК	Минимальная подавляющая концентрация антибиотика
ОНП (SNP)	Однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
ПСБ	Пенициллинсвязывающий белок
ПХ	Пероксидаза хрена
ПЦР	Полимерзная цепная реакция
ПЦР РРВ	Полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»
ТМБ	3,3',5,5' – тетраметилбензидин
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ФСБТ	Фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,01 % твин-20
ЭДК	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Бета-лактамы антибиотики с момента их открытия и до наших дней являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами для лечения инфекционных заболеваний бактериальной природы. Однако появление бактерий, устойчивых к данной группе антибиотиков, существенно ограничивает возможности химиотерапии. Угрожающим в последние десятилетия является распространение резистентных возбудителей внутрибольничных инфекций. Основным механизмом устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к бета-лактамам является продукция бактериальных ферментов бета-лактамаз, гидролизующих бета-лактамовое кольцо антибиотиков. Карбапенемы - самые новые препараты из класса бета-лактамов, они используются в лечебных учреждениях для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных устойчивыми к действию других бета-лактамовых антибиотиков микроорганизмами. Однако за 20 лет их применения бактерии успели приспособиться и к этим антибиотикам вследствие продукции ферментов карбапенемаз, которые обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим все классы бета-лактамовых антибиотиков, в том числе и карбапенемы [1]. По своему строению карбапенемазы очень разнообразны и относятся к трем молекулярным классам А, В, D. По строению активного центра они разделяются на ферменты, содержащие серин в активном центре, и металло-бета-лактамазы, содержащие один или два иона цинка. Благодаря плазмидной локализации генов, распространение карбапенемаз среди возбудителей инфекционных заболеваний человека происходит достаточно быстро. В лечебных учреждениях РФ нечувствительными к действию карбапенемов являются около 14 % патогенных бактерий [2]. Среди бактерий *Pseudomonas aeruginosa* число резистентных штаммов составляет уже 75% [3]. Опасным является распространение бактерий, продуцирующих одновременно несколько ферментов: карбапенемазы совместно с сериновыми бета-лактамазами молекулярного класса А TEM, SHV и CTX-M типов. При терапии таких инфекций комбинацией антибиотиков с ингибиторами сериновых бета-лактамаз металло-бета-лактамазы остаются активными. При лечении азтреонамом, на который не действуют металло-бета-лактамазы, происходит его гидролиз под действием бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и, таким образом, терапия также становится неэффективной. Кроме того, мобильные элементы, на которых располагаются гены карбапенемаз, часто несут одновременно гены устойчивости к антибиотикам других классов – аминогликозидам, фторхинолонам и др. В результате совместной экспрессии таких генов получают панрезистентные бактерии, устойчивые ко всем известным антибиотикам.

Согласно данным, опубликованным Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ), смертность от внутрибольничной пневмонии, вызванной устойчивыми к карбапенемам штаммами *Klebsiella pneumoniae*, превышает 50 % [4].

В связи с многообразием и опасностью широкого распространения карбапенемаз актуальна задача поиска надёжных методов их определения, доступных для клинических лабораторий различного уровня. Также необходим метод одновременной идентификации всех карбапенемаз совместно с бета-лактамазами молекулярного класса А. Биохимические и иммунохимические методы определения ферментов не могут обеспечить необходимую мультиплексность и селективность определения при идентификации множества бета-лактамаз. В последнее время для этих целей активно развиваются методы молекулярно-генетического анализа. Перспективными для одновременного определения множества генов являются методы гибридизационного анализа ДНК на олигонуклеотидных микрочипах. Данная технология позволяет проводить мультианализ на основе принципа высокоспецифичного молекулярного распознавания последовательности ДНК-мишени иммобилизованными олигонуклеотидными зондами. Ранее в лаборатории была разработана технология колориметрических микрочипов с детекцией на основе пероксидазы хрена. В качестве метки ДНК-мишени используется биотин, который выявляется в дуплексах ДНК на носителе конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена. В результате ферментативной реакции образуется окрашенный нерастворимый продукт, адсорбирующийся на поверхности микрочипа в зоне реакции. Это существенно упрощает и удешевляет регистрацию результатов анализа с использованием оптических сканеров высокого разрешения [5].

**Цели и задачи исследования.** Целью исследования являлась разработка принципа и технологии гибридизационного анализа ДНК на колориметрических микрочипах для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D (по классификации Амблера [6]). Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- разработать метод одновременной амплификации всех генов карбапенемаз в одной реакции; а также метод совместной амплификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А;
- провести выбор структур олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз различных типов с дополнительным разделением на подгруппы;
- исследовать влияние взаимного расположения зондов на эффективность сэндвич-гибридизации;
- разработать метод гибридизационного мультианализа ДНК в двух вариантах: гибридизации меченной биотином ДНК-мишени с иммобилизованными олигонуклеотидными

зондами и сэндвич-гибридизации немеченой ДНК-мишени с двумя типами зондов; сравнить аналитических характеристик двух вариантов гибридационного анализа;

- разработать колориметрические микрочипы для одновременной идентификации генов карбапенемаз восьми типов с дополнительным типированием по подгруппам;
- разработать интегрированный микрочипа для одновременной идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов) с использованием набора зондов, ранее подобранных для идентификации бета-лактамаз молекулярного класса А и ключевых позиций однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), кодирующих функционально значимые мутации в ферментах.



# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## ГЛАВА 1. УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К КАРБАПЕНЕМАМ

### 1.1. Карбапенемы

Возможность использования бета-лактамовых антибиотиков появилась с открытия Alexandr Fleming в 1929 году пенициллина. Он выделил из плесневых грибов неустойчивую субстанцию, эффективную против стафилококка и стрептококков [7]. Позже биохимики Chain и Florey разработали технологию промышленного синтеза пенициллина, который стал активно использоваться во время Второй Мировой войны [8]. В 1945 году Флемингу, Флори и Чейну была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине «за открытие пенициллина и его целебного воздействия при различных инфекционных болезнях».

К середине 1970-х годов в медицинской практике имелось уже достаточно большое число полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов, спектр активности которых охватывал большинство клинически значимых грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Однако интенсивное использование этих препаратов привело к распространению различных механизмов устойчивости микроорганизмов к большинству представителей этих групп антибактериальных препаратов. Тенденция увеличения количества резистентных штаммов микроорганизмов способствовала постоянному поиску новых, более эффективных препаратов, результатом которого явилось создание новой группы бета-лактамов - карбапенемов.

Карбапенемы, как и все другие бета-лактамовые антибиотики, оказывают бактерицидное действие, нарушая синтез клеточной стенки бактерий путём формирования ковалентной связи с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) - транспептидазами – ферментами, которые участвуют в сшивке пептидогликанового слоя грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [9]. Механизм ингибирования реакции транспептидирования пептидогликана пенициллином был описан Tipper и Strominger в 1965 году [10]. Было отмечено структурное сходство пенициллина G с концевым дипептидом D-Ala-D-Ala формирующегося пептидогликана разделённых бактериальных клеток. Сейчас известен механизм, включающий связывание бета-лактама с серином в активном центре пенициллинсвязывающих белков [11]. Механизм действия транспептидаз (ПСБ) и ингибирования их бета-лактамовыми антибиотиками приведён на рисунках 1 и 2 [12]. Кроме того, в недавних работах сообщается о дополнительном связывании некоторых бета-лактамов с аллостерическими сайтами ПСБ, которое приводит к возрастанию эффективности антибиотиков [13; 14].

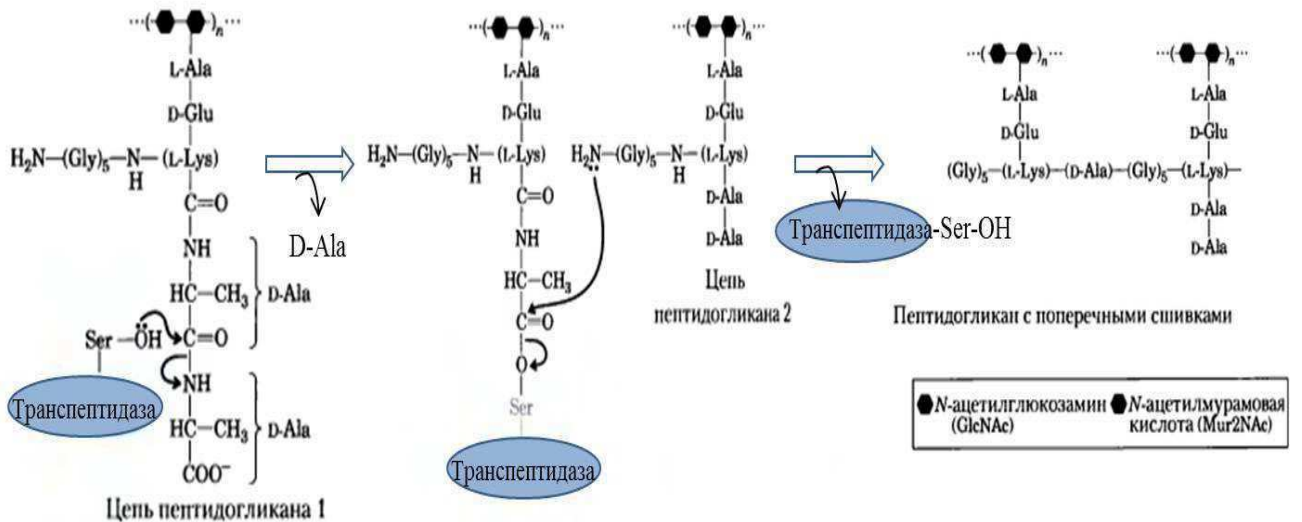


Рис. 1. Механизм действия транспептидаз (ПСБ) [12].

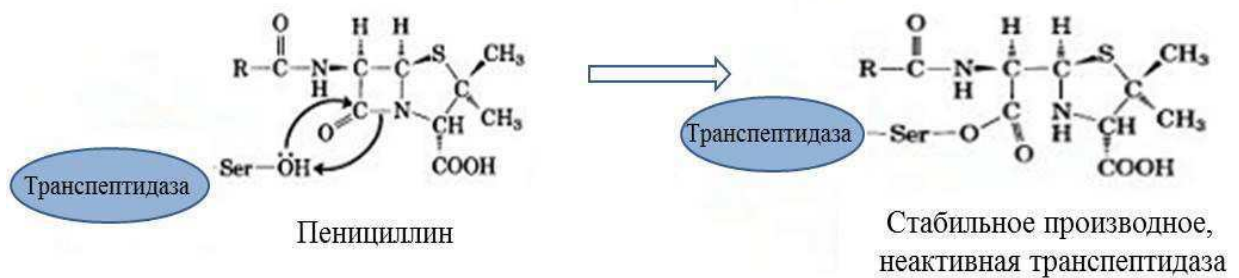


Рис. 2. Ингибирование транспептидаз (ПСБ) бета-лактамами антибиотиками [12].

Карбапенемы, во многом благодаря сочетанию широкого спектра активности, низкой токсичности, благоприятных фармакокинетических параметров, являются одной из наиболее удачных групп антибактериальных препаратов. Первый карбапенем – тиенамицин – вещество, продуцируемое почвенным микроорганизмом *Streptomyces cattleya*, был выявлен в середине 70-х гг. XX века [15]. Тиенамицин был крайне неустойчив, но работы по модификации его молекулы были завершены созданием нескольких производных, превосходящих его по основным параметрам [16]. В настоящее время разрешено клиническое использование четырех карбапенемов: имипенема, меропенема, эртапенема и дорипенема. Их структурные формулы представлены на рисунке 3. Все карбапенемы имеют в своей основе четырехчленное бета-лактаманное кольцо. Ультрширокий спектр активности карбапенемов обусловлен их устойчивостью к большинству бета-лактамаз вследствие наличия у них транс- $\alpha$ -1-гидроксиэтильного замещения в 6-й позиции, что отличает их молекулу от молекул пенициллинов и цефалоспоринов [17].

Имипенем является амидиновым производным тиенамицина, но в 5-10 раз более стабильным, чем исходное соединение. Он широко используется для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными, грамположительными, неферментирующими и анаэробными бактериями благодаря высокой активности против этих микроорганизмов, особенно в отношении не продуцирующих карбапенемазы энтеробактерий [18]. Так как имипенем расщепляется дегидропептидазой-1 (ДПП-1) – ферментом, присутствующим в проксимальных почечных канальцах млекопитающих, для применения в клинической практике его назначают в комбинации с циластатином, ингибитором ДПП-1 [15].

Меропенем отличается от имипенема наличием пирролидинил-замещающей группы во втором положении, что обуславливает отсутствие разрушения его молекулы ДПП-1 [19]. Меропенем в 2-4 раза эффективнее имипенема по отношению к энтеробактериям и *P. aeruginosa*. Однако, он менее активен против грамположительных микроорганизмов [9]. Меропенем - единственный из карбапенемов, одобренных для лечения менингита из-за его хорошей проникающей способности в мозговые оболочки [20].

Эртапенем по структуре похож на меропенем, единственным структурным различием между ними является наличие мета-замещенной группы бензойной кислоты во второй позиции [21]. Эта замена обуславливает увеличение молекулярной массы и липофильности молекулы эртапенема, что влияет на фармакокинетику и спектр активности [22]. Эффективность эртапенема против бактерий семейства *Enterobacteriaceae* аналогична меропенему и имипенему, однако эртапенем неактивен по отношению к *P. aeruginosa* из-за недостаточной проницаемости через клеточную мембрану и повышенной способности к эффлюксу [23]. Замена во втором положении также придает общий отрицательный заряд молекуле вследствие ионизации карбоксильной кислоты бензойного кольца при физиологическом значении pH [17], что приводит к большему связыванию эртапенема с белками плазмы и, следовательно, к увеличению периода полувыведения, что позволяет вводить его лишь один раз в день, в то время как другие карбапенемы требуют 2-3 кратного введения в течение дня [24].

Дорипенем – достаточно новый карбапенемный антибиотик, изменения в структуре его молекулы в сравнении с имипенемом и меропенемом были сделаны для увеличения его стабильности и активности в отношении неферментирующих грамотрицательных бактерий [25, 26].

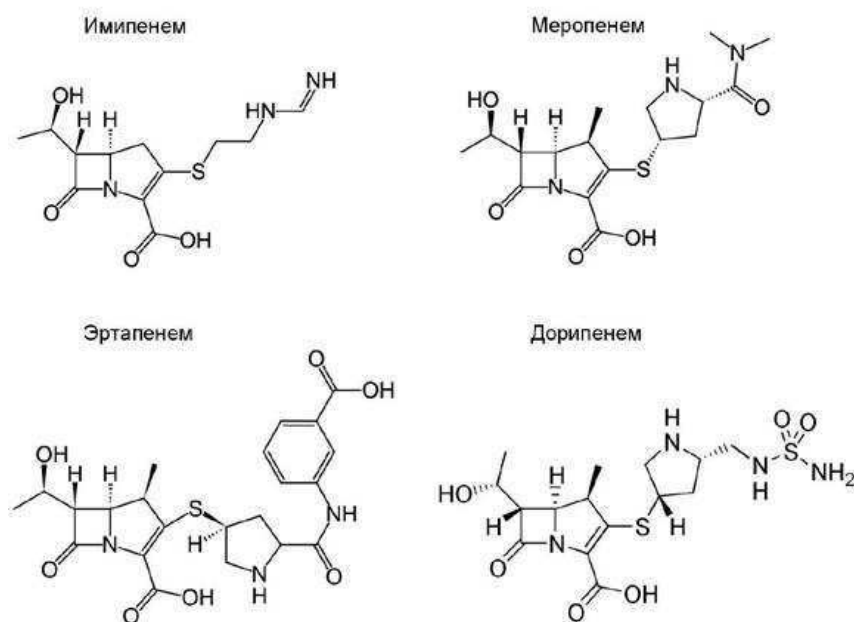


Рис. 3. Структуры молекул основных карбапенемов (имипенема, меропенема, эртапенема и дорипенема).

Недавно были разработаны два новых карбапенема – биапенем и тебипенем, однако их использование пока разрешено только на территории Японии [9]. Структуры этих антибиотиков приведены на рисунке 4. Спектр активности биапенема сходен со спектром меропенема и дорипенема [27], тебипенем неактивен в отношении псевдомонад [28]. Как и другие карбапенемы, они устойчивы к действию большинства сериновых бета-лактамаз, однако гидролизуются как сериновыми, так и металло-карбапенемазами [9]. Биапенем более устойчив (значения минимальной подавляющей концентрации меньше в 4 раза) к действию металло-бета-лактамаз (МБЛ) по сравнению с имипенемом и меропенемом [29].

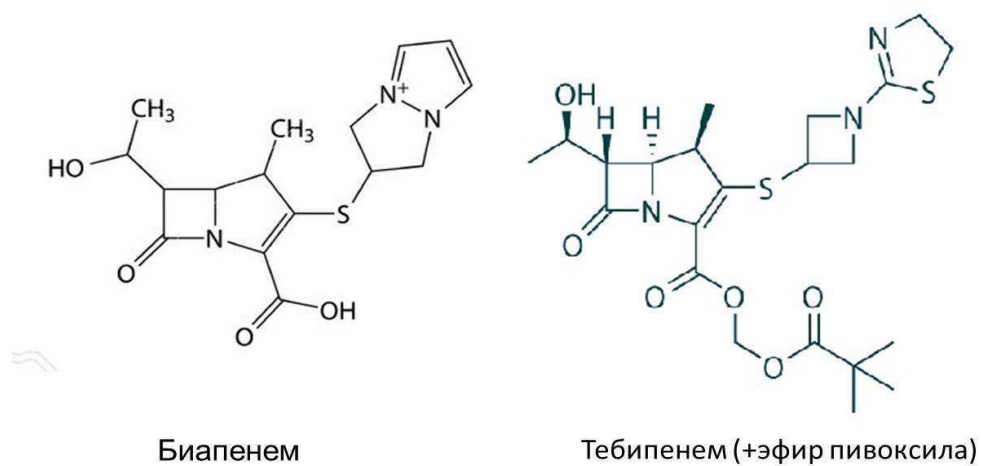


Рис. 4. Структурные формулы биапенема и тебипенема.

Карбапенемы имеют наиболее широкий спектр активности среди всех антибактериальных препаратов [15]. Они эффективны в отношении большого числа как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Среди грамположительных микроорганизмов к карбапенемам чувствительны стафилококки, стрептококки, в том числе *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, а среди грамотрицательных микроорганизмов - бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Morganella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*), неферментирующие бактерии *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, а также *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Neisseria meningitidis*. Не входят в спектр антибактериальной активности имипенема, меропенема, эртапенема и дорипенема бактерии *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Stenotrophomonas* и метициллинорезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*.

## 1.2. Основные механизмы устойчивости микроорганизмов к карбапенемам

К настоящему времени установлены несколько механизмов формирования устойчивости бактерий к действию карбапенемов.

*Ферментативная инактивация.* Наиболее распространенным механизмом резистентности грамотрицательных микроорганизмов к бета-лактамам является продукция бета-лактамаз. Бета-лактамазы представляют собой обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью гидролизовать бета-лактамные антибиотики, тем самым, обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. С момента открытия первой бета-лактамазы в 1940 г., когда E. Abraham и E. Chain описали процесс инактивации пенициллина в бесклеточном экстракте культуры кишечной палочки [30], были накоплены обширные данные о разнообразии механизмов ферментативного расщепления бета-лактамов у бактерий. Большинство известных бета-лактамаз проявляет выраженную структурную гомологию с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ), что свидетельствует об эволюционной взаимосвязи между ферментами этих групп [31]. Подобно ПСБ бета-лактамазы взаимодействуют с бета-лактамными антибиотиками с образованием эфирного комплекса. Однако в случае бета-лактамаз этот комплекс быстро расщепляется с высвобождением нативного фермента и инактивированной молекулы субстрата.

Из всего многообразия бета-лактамаз (по данным обзора [32] на данный момент известно более 2000 ферментов) карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающем практически все группы бета-лактамных антибиотиков, в том числе и карбапенемы.

*Дефекты пориновых каналов.* Для контакта с мишенью действия и проявления бактерицидного действия карбапенемы должны проникнуть через белковые каналы (порины) наружной мембраны грамотрицательной клетки. Например, через порины OprD, в норме осуществляющие трансмембранный транспорт основных аминокислот, проникают только карбапенемы, но не другие бета-лактамы. Установлено, что мутация поринового белка OprD, часто в сочетании с продукцией бета-лактамаз, частично гидролизующих и карбапенемы (например, AmpC цефаллоспориноаз [33]), обуславливает наличие резистентности у *P. aeruginosa* [34]. Дефекты пориновых каналов у *Klebsiella spp.* могут приводить к повышению МПК карбапенемов [35]. Мутации белков пориновых каналов являются хромосомно-кодируемыми, поэтому распространяется данный тип резистентности довольно медленно [33].

*Активное выведение антибиотика из клетки (эффлюкс).* Такой механизм резистентности, как активное выведение антибиотика из клетки (эффлюкс), играет важную роль в проявлении природной и приобретенной резистентности *P. aeruginosa* к карбапенемам [36, 37]. Насосы системы эффлюкса используют энергию протон-движущей силы для выведения различных лекарственных препаратов и других веществ из бактериальной клетки [38]. Наличие у микроорганизма системы эффлюкса MexAB-OprM часто приводит к ассоциированной резистентности к другим классам антибактериальных препаратов – фторхинолонам, пенициллинам, цефалоспорином, макролидам [39].

*Изменение мишени действия.* Основным механизмом устойчивости грамположительных бактерий к карбапенемам и другим бета-лактамам является недостаточное связывание антибиотиков данного класса с ПСБ из-за мутационных изменений последних [38].

Основные механизмы устойчивости к карбапенемам наиболее распространённых бактериальных патогенов приведены в таблице 1.

**Механизмы устойчивости основных классов микроорганизмов к карбапенемам**

Тип микроорганизмов	Механизм устойчивости
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Действие карбапенем-гидролизующих ферментов (карбапенемаз класса А, металло-бета-лактамаз, карбапенемаз подгруппы ОХА-48)</li> <li>2. Нарушение проницаемости наружной мембраны бактерий вследствие нарушения пориновых каналов в сочетании с продукцией цефалоспоринов расширенного спектра</li> </ol>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Действие карбапенем-гидролизующих ферментов (в основном, металло-бета-лактамазы, редко карбапенемазы класса А)</li> <li>2. Нарушение проницаемости наружной мембраны бактерий вследствие утраты поринов</li> <li>3. Активное выделение антибиотика из микробной клетки (система эффлюкса)</li> </ol>
<i>Acinetobacter</i> spp.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Действие карбапенем-гидролизующих ферментов (карбапенемазы ОХА типа, металло-бета-лактамазы)</li> <li>2. Нарушение проницаемости наружной мембраны бактерий вследствие утраты поринов</li> </ol>
Грамположительные микроорганизмы	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Модификация мишени действия, т.е. изменение структуры ПСБ</li> </ol>

**1.3. Классификация бета-лактамаз**

Количество бета-лактамаз стремительно растёт с каждым годом. На сегодняшний день известно уже более 2000 различных представителей этого семейства ферментов [32]. Необходимость классификации бета-лактамаз была осознана учёными уже давно. Ещё Р.С. Fleming в 1963 году выделял пеницилиназы, расщепляющие преимущественно пенициллины и цефалоспорины, гидролизующие предпочтительно цефалоспорины. На настоящий момент активно используются две системы классификации бета-лактамаз: молекулярная и функциональная.

Молекулярная классификация предложена R. Ambler в 1980 году [6]. На основании гомологии аминокислотных последовательностей и структуры активного центра все бета-лактамазы были разделены на 4 молекулярных класса – А, В, С и D. Ферменты классов А, С и D содержат серин в активном центре и являются сериновыми протеиназами, бета-лактамазы класса В относятся к металлоферментам, в которых с активным центром связаны один или два атома цинка [6].

Функциональная классификация была предложена К. Bush в 1989 году [40]. На основании профилей субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам все бета-лактамазы подразделяют на 3 функциональные группы. В 2010 году данная система классификации была обновлена с учётом новых данных по ферментам [41] и в настоящее время она активно используется в сочетании с молекулярной классификацией. Принципы функциональной классификации представлены в таблице 2.

В первую группу входят цефалоспориназы (класс С по молекулярной классификации). Гены, кодирующие данные ферменты, располагаются, в основном, на хромосомах бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и некоторых других микроорганизмов. Бета-лактамазы группы 1 расщепляют цефалоспорины быстрее, чем бензилпенициллин и не ингибируются клавулановой кислотой [42].

Вторая группа - наиболее обширная и разнообразная по своему составу. В неё входят сериновые бета-лактамазы молекулярных классов А и D. Это, в основном, плазмидно-кодируемые ферменты, благодаря чему они очень быстро распространяются по всему миру. Подгруппа 2a содержит пенициллиназы грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp. и *Bacillus* spp с узким спектром субстратной специфичности, включающим только пенициллины. Представители подгруппы 2b (бета-лактамазы типов TEM, SHV) гидролизуют пенициллины и ранние цефалоспорины, ингибируются клавулановой кислотой и тазобактамом [41]. В подгруппу 2be входят бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), которые помимо пенициллинов и ранних цефалоспоринов способны расщеплять цефалоспорины III–IV поколений. Основными представителями этой функциональной подгруппы являются бета-лактамазы типов TEM и SHV, образовавшиеся в результате точечных мутаций TEM-1 и SHV-1 [43], а также широко распространённые БЛРС CTX-M типа. Отличительной особенностью данной функциональной группы является сильное ингибирование клавулановой кислотой. Бета-лактамазы CTX-M типа по сравнению с ферментами TEM и SHV типов ингибируются тазобактамом в большей степени, чем клавулановой кислотой. По этому признаку происходит их фенотипическое определение [42]. В группу 2br входят бета-лактамазы широкого спектра действия, устойчивые к действию клавулановой кислоты. К подгруппе 2c относятся пенициллиназы, способные гидролизовать карбенициллин и довольно редко встречающиеся в настоящее время. К группе 2d относятся бета-лактамазы молекулярного класса D, расщепляющие клоксациллин или оксациллин со скоростью, на 50% превышающей скорость расщепления бензилпенициллина, поэтому данные ферменты называются ОХА-бета-лактамазы [41]. Многие ферменты данного типа также легко разлагают карбенициллин. Многие члены данной группы, однако, отнесены к ней скорее на основании сходства аминокислотной



Таблица 2.

## Классификация бета-лактамаз

Группа по Bush	Молекулярный класс	Микроорганизмы – «хозяева»	Локализация гена	Предпочтительные субстраты	Действие ингибиторов		Основные представители
					Клавулановая к-та сульбактам тазобактам	ЭДТА	
1	C	Грамотрицательные бактерии (в основном семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )	хромосомы, редко плазмиды	цефалоспорины I—III поколений; в меньшей степени пенициллины	нет	нет	AmpC, ACT-1 CMY-2
1e	C	<i>E. cloacae</i> <i>P. aeruginosa</i>	хромосомы, редко плазмиды	цефалоспорины I—III поколений, преимущественно цефтазидим	нет	нет	GC1 CMY-37
2a	A	Грамположительные бактерии <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Bacillus</i> spp.	плазмиды	природные и полусинтетические пенициллины	да	нет	PC1
2b	A	Грамотрицательные бактерии (в основном семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )	плазмиды, редко хромосомы	пенициллины, включая ампициллин, амоксициллин, тикарциллин и карбенициллин, цефалоспорины I поколения и цефоперазон	да	нет	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Грамотрицательные бактерии (в основном семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )	плазмиды, редко хромосомы	цефалоспорины III–IV поколений и монобактамы наряду с ранними цефалоспоринами и пенициллинами	да	нет	TEM-3 SHV-2 CTX-M-15
2br	A	Грамотрицательные бактерии (в основном семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )	плазмиды	природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения	нет	нет	TEM-30 SHV-10
2ber	A	Грамотрицательные бактерии (в основном семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )	плазмиды	цефалоспорины III–IV поколений и монобактамы наряду с ранними цефалоспоринами и	нет	нет	TEM-50

				пенициллинами			
2c	A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , др. грамотрицательные бактерии	плазмиды	карбенициллин и тикарциллин	да	нет	PSE-1 CARB-3 BRO-1
2ce	A		плазмиды	карбенициллин и цефепим	да	нет	RTG-4
2d	D	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , реже другие грамотрицательные бактерии	плазмиды, редко хромосомы	клоксациллин и оксациллин	варьируется	нет	OXA-1 OXA-10
2de	D	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , реже другие грамотрицательные бактерии	плазмиды, редко хромосомы	цефалоспорины III–IV поколений	варьируется	нет	OXA-11 OXA-15
2df	D	<i>Acinetobacter baumannii</i> , реже другие грамотрицательные бактерии	плазмиды, редко хромосомы	карбапенемы	варьируется	нет	OXA-23 OXA-24 OXA-48
2e	A	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter diversus</i> , <i>S.maltophilia</i> , <i>Bacteroides</i> spp.	хромосомы	пенициллины, цефалоспорины I— III поколений (в различной степени)	да	нет	CepA
2f	A	Грамотрицательные бактерии	плазмиды	пенициллины, цефалоспорины (в различной степени), карбапенемы	варьируется	нет	KPC-1 IMI-1 SME-1
3a	B	Грамотрицательные бактерии	плазмиды, редко хромосомы	практически все бета-лактамы, включая карбапенемы, кроме монобактамов	нет	да	IMP-1 VIM-1 NDM-1
3b	B	Грамотрицательные бактерии <i>Aeromonas</i> spp.	плазмиды, редко хромосомы	карбапенемы	нет	да	CphA Sfh-1

последовательности, чем по субстратной специфичности. Представители подгруппы 2de являются БЛРС, 2df – карбапенемазами ОХА типа, способными расщеплять карбапенемы. В группу 2e входят хромосомно-кодируемые цефалоспорины. Группу 2f составляют сериновые карбапенемазы молекулярного класса А (KPC, SME, INI/NMC, GES типов).

В третью группу по функциональной классификации входят металло-бета-лактамазы, содержащие один или два атома цинка в активном центре (ферменты молекулярного класса В) [42]. Данные бета-лактамазы активно расщепляют пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, не гидролизуют азтреонам. Они ингибируются ЭДТА и дипиколиновой кислотой. В данной группе выделяют две подгруппы – 3a – ферменты данной подгруппы способны расщеплять все бета-лактамы, за исключением азтреонама (сюда входят широко распространённые металло-бета-лактамазы IMP, VIM, NDM типов) и 3b – данные бета-лактамазы являются исключительно карбапенемазами. Представители подгруппы 3b – хромосомно-кодируемые ферменты бактерий *Aeromonas* spp. [41].

#### 1.4. Карбапенемазы различных молекулярных классов

Карбапенемазной активностью обладают представители разных молекулярных классов бета-лактамаз:

**Класс А:** бета-лактамазы типов KPC, SME, INI/NMC, GES (функциональная группа 2f)

**Класс В:** бета-лактамазы типов IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM (функциональная гр. 3)

**Класс С:** бета-лактамазы типа CMY-10 (функциональная группа 1)

**Класс D:** бета-лактамазы подгрупп ОХА-23, ОХА-40, ОХА-48, ОХА-51, ОХА-58 (гр. 2df).

До начала 1990-х годов карбапенемазы описывались как видоспецифичные, хромосомно-кодируемые бета-лактамазы. Однако обнаружение плазмидно-кодируемых металло-бета-лактамаз у *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемаз ОХА-типа у *Acinetobacter baumannii* и ферментов группы KPC у *Klebsiella pneumonia* изменило представления о распространении карбапенемаз [44]. Далее будут более подробно рассмотрены наиболее распространенные и клинически важные карбапенемазы различных молекулярных классов.

##### 1.4.1. Карбапенемазы молекулярного класса А

Карбапенемазы молекулярного класса А по функциональной классификации относятся к подгруппе 2f. Как и все остальные сериновые бета-лактамазы этого класса они чувствительны к ингибированию клавулановой кислотой, тазобактамом и сульбактамом. Эти карбапенемазы представляют собой мономерные ферменты, содержащие от 265 до 269 аминокислотных остатков с молекулярной массой 25–32 кДа. Изоэлектрическая точка данных ферментов

варьируется от 5,8 до 9,7. Карбапенемазы класса А состоят из двух доменов, один - полностью  $\alpha$ -спиральный, а другой содержит пять бета-листов, окруженных  $\alpha$ -спиралями. Активный центр с каталитическим остатком Ser-70 располагается на перешейке между двумя доменами [45]. Как и другие сериновые бета-лактамазы, карбапенемазы класса А гидролизуют субстраты по трехстадийному механизму, включающему стадии ацилирования и деацилирования (рис. 5) [45]:



Рис. 5. Механизм расщепления бета-лактамных антибиотиков бета-лактамазами, содержащими серин в активном центре [45].

#### Карбапенемазы KPC типа

KPC (**K**lebsiella **p**neumoniae **c**arba**p**enemase) – наиболее распространенный тип сериновых карбапенемаз молекулярного класса А. Эта группа ферментов характеризуется активностью в отношении практически всех групп бета-лактамных антибиотиков: пенициллинов, цефалоспоринов, в том числе расширенного спектра действия, карбапенемов и азтреонама. У ферментов группы KPC, в отличие от других бета-лактамаз молекулярного класса А, остаток серина, отвечающий за каталитическую активность занимает более поверхностное положение в расщелине активного центра, что обеспечивает большую доступность каталитического центра для карбапенемов [46]. KPC-карбапенемазы слабо ингибируются клавуланатом [47].

Гены, кодирующие KPC бета-лактамазы, имеют плазмидную локализацию. Часто KPC-положительные образцы *Klebsiella pneumoniae* также несут плазмидные гены, кодирующие AmpC цефалоспорины, бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС, в основном СТХ-М типа) и металло-бета-лактамазы [48]. К тому же, продукция KPC часто сочетается с пониженной проницаемостью внешней мембраны, что связано с низким уровнем экспрессии пориновых белков OmpK35 и OmpK37 [49]. Кроме того, плазмиды, несущие гены KPC бета-лактамаз могут также содержать и детерминанты устойчивости к другим антибиотикам – фторхинолонам (*qnrA*, *qnrB*), аминогликозидам (*ArmA* и *RmtB*) [34, 46]. Неудивительно, что

КРС-продуцирующие грамотрицательные бактерии часто проявляют мультирезистентный фенотип, сильно ограничивая возможности антимикробной терапии [50].

Впервые фермент данного типа, а именно КРС-1, был описан у штамма *K. pneumoniae*, выделенного в Северной Каролине (США) в 1996 г. Остальные члены семейства КРС (КРС-2, КРС-3,...КРС-24) – продукты точечных мутаций, отличающиеся между собой на 1-2 аминокислоты, с незначительными вариациями в субстратной активности. В основном, эти ферменты продуцируются *Klebsiella pneumoniae*, но также они были обнаружены у *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.* [44], *Citobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia spp.* [51], *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* [52].

КРС-продуцирующие *Klebsiella pneumoniae* вызывают широкий спектр серьёзных инфекций, включая бактериемию, пневмонию и инфекции мочепускающего канала [50].

Гены, кодирующие КРС бета-лактамазы, имеют плазмидную локализацию. В основном, они входят в состав мобильных генетических элементов (транспозонов Tn4401-типа) [21]. В большинстве случаев для штаммов-продуцентов КРС характерно клональное распространение, горизонтальный перенос генов КРС в составе конъюгативных плазмид осуществляется как между штаммами одного вида, так и между разными видами. Помимо этого, перенос генов КРС может происходить и между плазмидами с помощью мобильных элементов.

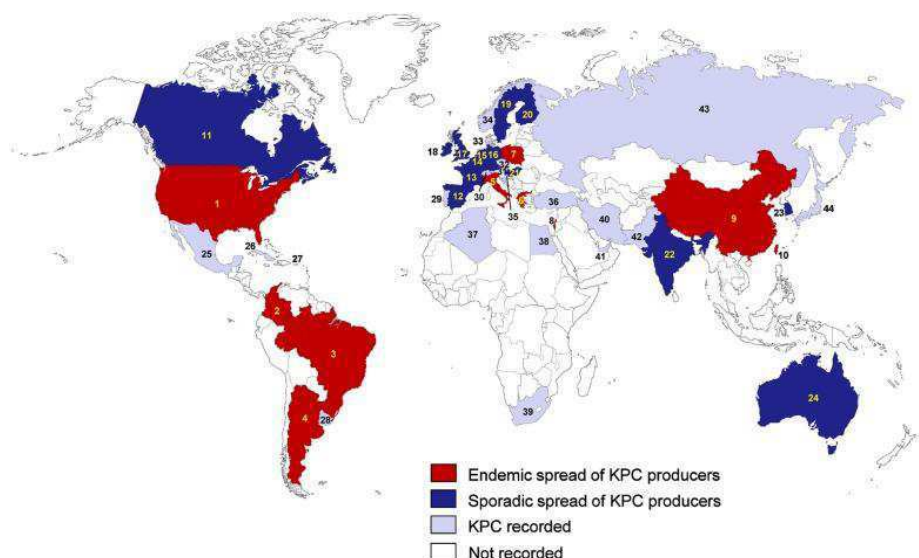


Рис. 6. Распространённость карбапенемаз типа КРС в мире [56].

До 2005 года географическое распространение КРС было ограничено пределами США [53-55]. К настоящему времени продукция этих карбапенемаз у нозокомиальных возбудителей была выявлена во многих странах мира: в Колумбии, Бразилии, Аргентине, Италии, Греции, Польше [56, 57], Израиле [58], Корее [59], Китае [60], Канаде [61], Тайване, Испании, Франции, Бельгии, Нидерландах, Германии, Великобритании, Швеции, Финляндии, Венгрии, Индии,

Австралии [46, 53, 56] (рис. 6 и 11). Также продуценты карбапенемаз КРС типа обнаружены в Российской Федерации [62]. Стоит отметить, что помимо КРС ферментов наблюдалась также ко-продукция БЛРС (ТЕМ, SHV и СТХ-М типов).

#### 1.4.2. Карбапенемазы молекулярного класса В

Молекулярный класс В объединяет все метало-зависимые бета-лактамазы (МБЛ), в активном центре которых присутствуют один или два иона  $Zn^{2+}$ . Опасность ферментов данного класса обусловлена их высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающем практически все бета-лактамы (исключением являются только монобактамы) [63]. Кроме того, МБЛ не чувствительны к классическим ингибиторам сериновых бета-лактамаз (клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму), а ингибируются только хелатирующими агентами, такими как ЭДТА и др.

Впервые металло-бета-лактамаза была обнаружена в 1966 году, когда Sabbath и Abraham показали, что цефаллоспориновая активность фермента, продуцируемого бактериями *Bacillus cereus*, ингибируется добавлением ЭДТА [64]. Впоследствии гены ферментов этого типа были также обнаружены в хромосомах *Bacteroides fragilis*, *Bacillus anthracis*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*. За исключением *Stenotrophomonas maltophilia*, эти бактерии нечасто связаны с какой-либо серьезной внутрибольничной инфекцией [44].

На основе аминокислотных последовательностей ферментов, все МБЛ разделяют на три субкласса – В1, В2 и В3. МБЛ, принадлежащие к субклассам В1 и В3, – ферменты широкого спектра действия и гидролизуют практически все бета-лактамы, включая карбапенемы, исключением является только монобактамы [64]. Ферменты всех субклассов имеют по два  $Zn^{2+}$ -связывающих сайта. У ферментов В1 сайт 1 представлен тремя остатками гистидина (His116, His 118 и His196), а сайт 2 состоит из His263, Cys221 и Asp120. Ферменты субкласса В3 отличаются от В1 лишь тем, что Cys221 в сайте 2 замещен на His. Ферменты группы В2 являются исключительно карбапенемазами. Они гидролизуют эффективно только карбапенемы и показывают низкую активность в отношении пенициллинов и цефаллоспоринов. Вероятно, это может быть связано с тем, что у представителей группы В2 остаток His116, консервативный для ферментов субклассов В1 и В3, заменен на аспарагин. Однако эта замена – не единственная причина столь узкого спектра активности ферментов субкласса В2: было показано, что у ферментов В2 с искусственной мутацией N116H активность к пенициллинам и цефаллоспорином хоть и возрастала по сравнению с дикой формой фермента, но оставалась достаточно низкой [64].

В 1998 году Воупага с сотр. предложили механизм каталитического расщепления бета-лактамов под действием моноцинковой формы фермента BcI субкласса B1 (рис. 7). Согласно этому механизму, ион цинка, который координирован с тремя остатками гистидина (His116, His118, His196) и молекулой воды, выступает в качестве кислоты Льюиса и понижает рК молекулы воды так, что она существует как гидроксид-ион при нейтральном рН. Этот гидроксид-ион осуществляет нуклеофильную атаку на атом углерода карбоксильной группы бета-лактамного кольца, что приводит к образованию тетраэдрического интермедиата, стабилизированного взаимодействием с ионом цинка. При этом Asp120 действует как общее основание, депротонируя ОН-группу, и генерирует второй тетраэдрический интермедиат, который также стабилизирован ионом цинка. На следующей стадии, Asp120 подаёт протон на азот бета-лактамного кольца, после чего происходит раскрытие последнего [64].

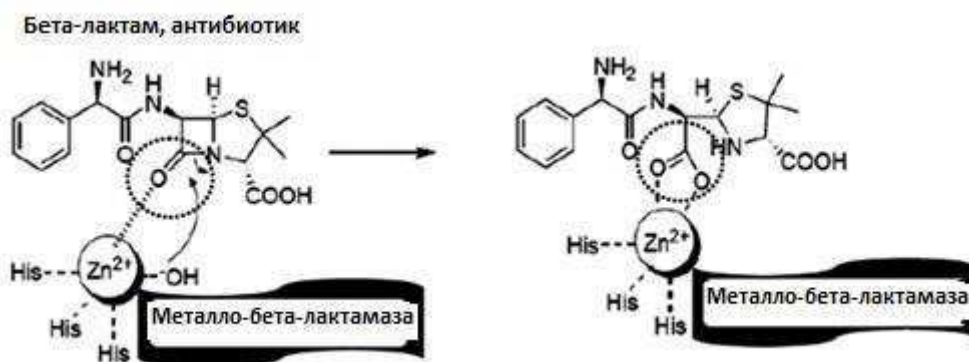


Рис. 7. Механизм расщепления бета-лактамных антибиотиков металло-бета-лактамазами.

Для ферментов субкласса B2 предложен другой механизм катализа. Нуклеофильный гидроксид-ион генерируется уже остатками Asp120 и His118. Нуклеофильная атака бета-лактамного карбонильного углерода, возможно активированного His196, даёт тетраэдрический интермедиат.

Наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция приобретенных МБЛ у грамотрицательных микроорганизмов, которые наиболее часто являются возбудителями госпитальных инфекций. Гены приобретенных МБЛ, за исключением SPM, обычно входят в состав интегронов. В свою очередь, плазмидная локализация многих интегронов, несущих гены МБЛ, обеспечивает возможность их быстрого распространения между различными видами микроорганизмов. Экспрессия приобретенных МБЛ встречается у целого ряда грамотрицательных микроорганизмов, в основном у представителей родов *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*) и *Acinetobacter* (*Acinetobacter baumannii*), реже у представителей *Enterobacteriaceae* [63].

За последнее десятилетие описано 5 основных генетических типов приобретенных МБЛ: IMP, VIM, SPM, SIM и GIM.

#### Карбапенемазы IMP типа

Впервые карбапенемаза IMP типа была обнаружена на конъюгативной плазмиде у *P. aeruginosa* в 1988 году в Японии [65]. В 2000 году была открыта бета-лактамаза IMP-2, ген которой входит в состав интегрона класса 1 [66]. Различные варианты ферментов данного типа впоследствии обнаружены у энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий по всему миру [46]. Эпицентрами вспышек бактериальных инфекций, связанных с продукцией карбапенемаз IMP типа, являются Тайвань [67] и Япония [68] (рис. 8).

#### Карбапенемазы VIM типа

Подобно генам *bla*<sub>IMP</sub>, гены, кодирующие карбапенемазы VIM типа у *K. pneumoniae*, входят в состав интегронов класса 1 на плаزمиде [69]. Однако, интегроны, несущие гены VIM также способны встраиваться в геном плазмид (или хромосом) других бактерий (особенно *Enterobacteriaceae* spp.) с очень высокой эффективностью, позволяя генам *bla*<sub>VIM</sub> быстро распространяться среди разных клонов одного вида грамотрицательных микроорганизмов, а также на другие виды бактерий [70]. Полагают, что разной способностью к конъюгации генов *bla*<sub>VIM</sub> и *bla*<sub>IMP</sub> можно объяснить значительно большее количество вспышек инфекций, обусловленных грамотрицательными бактериями, продуцирующими карбапенемазы VIM типа в мире. Кроме того, плазмиды, несущие гены *bla*<sub>VIM</sub>, часто несут гены *bla*<sub>KPC</sub> и БЛРС (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>), что приводит к формированию мультиустойчивого фенотипа [46].

Впервые карбапенемаза VIM-1 была обнаружена в Вероне (Италия) в *P. aeruginosa* в 1997 году [71]. Бета-лактамаза VIM-2 типа впервые выявлена также у *P. aeruginosa* во Франции в 1996 году [72]. Затем различные варианты карбапенемаз VIM типа были найдены у *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* spp. (главным образом у *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* и *Proteus mirabilis*), *Acinetobacter baumannii* в странах Европы (Италия, Испания, Греция, Франция, Португалия, Англия, Польша, Хорватия, Германия), в Азии (Япония, Китай, Корея, Гонг Конг, Сингапур, Тайвань, Тайланд) и в Латинской Америке (Бразилия, Венесуэлла) [46, 73]. Отдельные случаи продукции VIM и IMP карбапенемаз описаны в США, Канаде и многих других странах [69, 74].

В России число инфекционных заболеваний, вызванных VIM-продуцирующими бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, неуклонно растёт. По данным многоцентровых эпидемиологических исследований (результаты представлены на рис. 8), проведённых в 2002-2004 году на территории Российской Федерации, нечувствительными к карбапенемам было 60% анализируемых образцов возбудителей нозокомиальных инфекций (из них 7,4 %



содержали МБЛ), в 2006-2007 гг. 74 % штаммов были устойчивы к карбапенемам (27,3 % продуцировали МБЛ), в 2008-2010 гг резистентность к карбапенемам выявлена у 75 % образцов грамотрицательных бактерий (у 38,1 % штаммов устойчивость обусловлена продукцией МБЛ) [3]. Основной металло-бета-лактамазой, выявленной в процессе данных исследований, является VIM-2 (99,6 % среди МБЛ положительных образцов) [3]. Стоит также отметить, что большинство МБЛ-продуцирующих образцов проявляли мультиустойчивый фенотип (были устойчивы ко всем антибиотикам, кроме колистина), в 2010 году 5,9% исследуемых образцов были панрезистентными (устойчивы ко всем известным антибиотикам, включая колистин).



Рис. 8. Продукция металло-бета-лактамаз в городах России, Белоруссии и Казахстана по данным многоцентровых исследований [3].

### Карбапенемазы NDM типа

Впервые карбапенемаза NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) типа была обнаружена в Швеции в 2007 году у пациента, который до этого находился на лечении в Нью-Дели (Индия) [75]. Из посева мочи была выделена культура микроорганизмов, которые были устойчивы ко многим антибиотикам, включая карбапенемы (эртапенем, имипенем и меропенем). Тестирование этого штамма указало на наличие неизвестной металло-бета-лактамазы. Методом клонирования и секвенирования было установлено, что устойчивость к антибиотикам связана с новым типом фермента, который имеет очень мало общего с известными металло-бета-лактамазами; наиболее близким к нему можно было назвать VIM-1/2 (32% идентичности). Новая металло-бета-лактамаза была названа NDM-1, так как авторы доклада полагали, что резистентность, связанная с этим ферментом, возникла в Индии [75]. В 2008 NDM-1 была обнаружена у 29 пациентов в Великобритании и 143 пациентов в различных городах Индии [76].

Бета-лактамаза NDM-1 содержит 270 аминокислотных остатков в одной полипептидной цепи, которая уложена в обычную для металло-бета-лактамаз  $\alpha\beta/\beta\alpha$  сэндвич структуру – два скрученных  $\beta$ -листа упакованы в центр и окружены с двух сторон погружёнными в растворитель  $\alpha$ -спиралями [77, 78]. Кристаллическая структура фермента NDM-1 представлена на рисунке 9 [77]. Молекулярный вес пептида примерно 27,5 кДа. Зрелый пептид имеет теоретическую изоэлектрическую точку 6,9 [75].

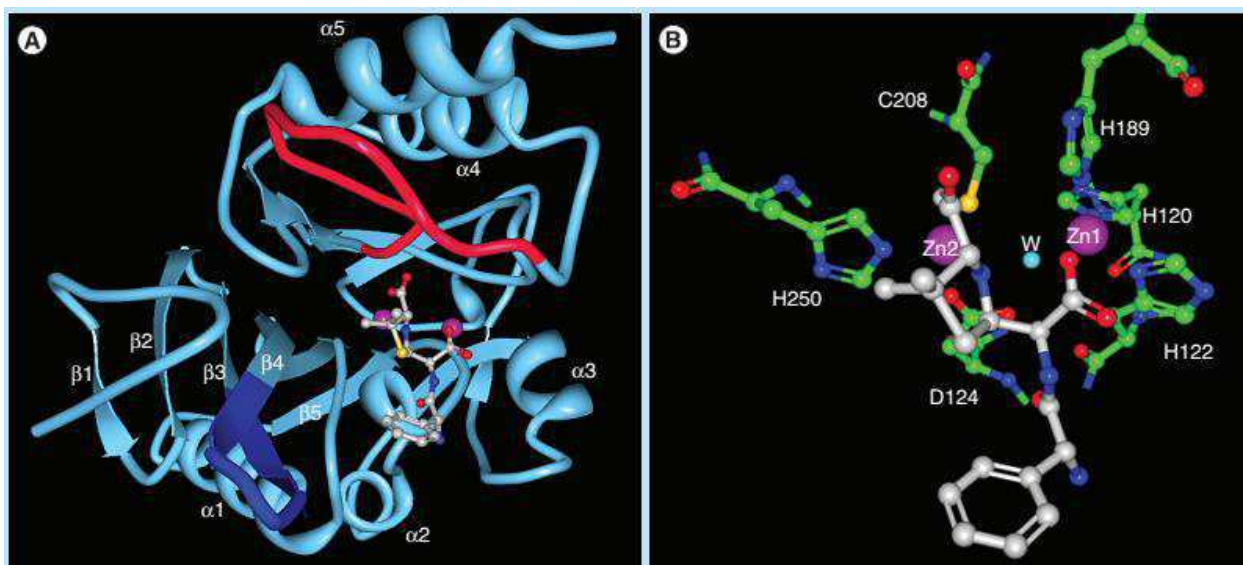


Рис.9. Структура NDM-1 в комплексе с гидролизованным ампициллином (PDB 3Q6X). А) Протеиновый скелет с  $\beta$ -складками и  $\alpha$ -спиралями показан голубым цветом. Ионы цинка обозначены в виде сиреневых шариков. В) Молекула воды/гидроксила в активном центре нарисована в виде бирюзового шара с буквой W, указаны все остатки, соединённые с атомами цинка Zn1 (H120, H122 и H189) и Zn2 (D124, C208 и H250) [77, 78].

NDM-1 относится к субклассу B1 металло-бета-лактамаз, она имеет два иона цинка, связанных с активным центром [78]. Как и другие представители субкласса B1 данная бета-лактамаза гидролизует все классы бета-лактамных антибиотиков за исключением монобактамов. Кроме того, на плаزمиде, несущей ген *bla*<sub>NDM</sub>, всегда располагается комплекс интегрона класса 1, содержащий другие детерминанты резистентности – устойчивости к карбапенемам (гены, кодирующие другие карбапенемазы - OXA-48, VIM, KPC типов), к другим бета-лактамам (гены, кодирующие БЛРС и AmpC цефаллоспорины), к макролидам (благодаря эритромицинестеразе), аминогликозидам (из-за 16S метилазы), хинолонам (Qnr-гены), тетрациклинам (из-за активного эффлюкса), сульфонидами (из-за изменения дигидроптероатсинтетазы), рифампициллину (присутствие рифампицин-модифицирующих ферментов) [78, 79]. Присутствие генов БЛРС и цефаллоспоринов обуславливают резистентность к азтреонаму, который не расщепляется ферментами NDM типа. Таким образом, NDM-продуцирующие бактерии устойчивы к действию АБП всех видов и чувствительны лишь к полимиксинам (колистину) и тигециклину [80]. Однако колистин не является идеальным

препаратом для борьбы с инфекционными заболеваниями вследствие его высокой нефро- и нейротоксичности [81]. К тигециклину проявляют природную устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и бактерии вида *Proteus*, однако профиль безопасности тигециклина более благоприятный, чем у полимиксина [82]. Тигециклин в настоящее время одобрен только для лечения кожных и сложных интра-абдоминальных инфекций и внебольничной пневмонии у взрослых. Однако в настоящее время проводятся многочисленные исследования по применению этого антибиотика при госпитальной пневмонии, инфекциях мочевыводящих путей, сепсисе, вызванном мультирезистентными бактериями [82].

Основными продуцентами карбапенемаз типа NDM являются *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *E coli*, реже продукция данных ферментов наблюдается у *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *S. aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. и *Providencia* spp. [83].

К карбапенемазам NDM типа риковано внимание учёных всего мира. Впервые обнаруженные в 2007 году, эти ферменты стремительно распространились по всему земному шару и уже к 2012 году были найдены на всех континентах, за исключением Антарктиды. Данные по распространённости бактерий, продуцирующих металло-бета-лактамазы NDM, приведены на рисунке 10 [79].

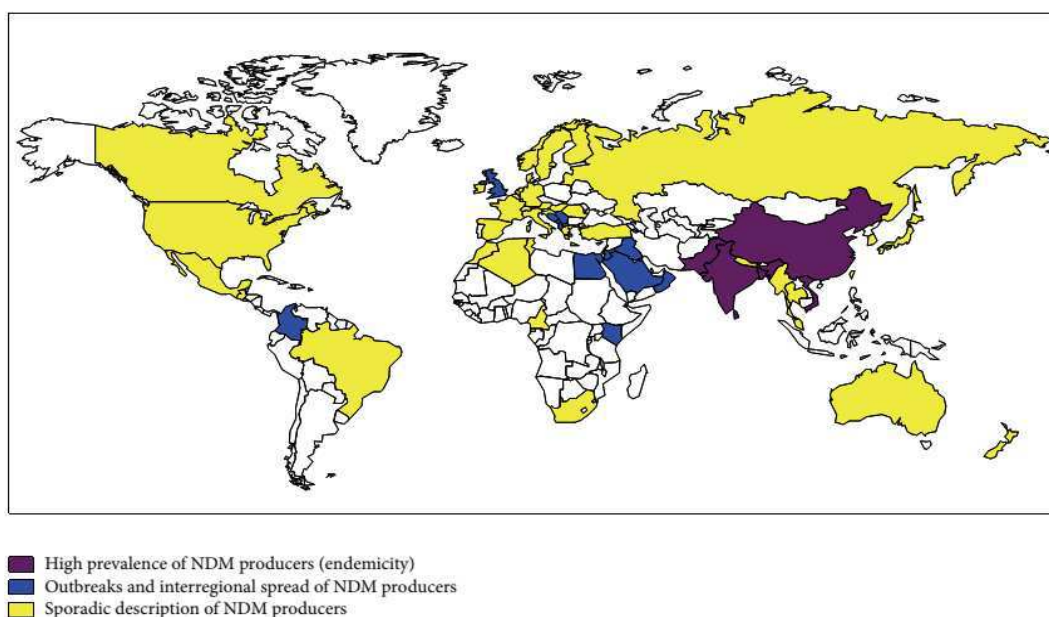


Рис. 10. Распространённость бактерий-продуцентов карбапенемаз NDM типа [79].

Основным очагом инфекций, вызванных NDM-продуцирующими бактериями, является Индийский субконтинент [83]. Продукция NDM наблюдается у 5-18,5% энтеробактерий [79]. Кроме того, гены *bla*<sub>NDM-1</sub> обнаружены в сточной и питьевой воде в Нью-Дели [84]. Вторым источником NDM-продуцирующих бактерий признаны Балканы [85]. NDM-продуцирующие

бактерии были также обнаружены во Вьетнаме, Сербии, Филиппинах, США, Канаде, Мексике, Гватемале, Бразилии, Великобритании, Нидерландах и Австралии [80]. На территории Российской Федерации продукция ферментов типа NDM выявлена в трёх лабораториях Санкт-Петербурга [62].

#### 1.4.3. Карбапенемазы молекулярного класса D

Бета-лактамазы молекулярного класса D называют оксацилиназами или ОХА-бета-лактамазами. Все они содержат остаток серина в активном центре и гидролизуют субстраты по трехстадийному механизму, включающему ацилирование и деацилирование (рисунок 5, раздел 1.4.1.). Большинство ферментов молекулярного класса D принадлежат к группе 2d функциональной классификации по Bush, которые определяют как ферменты, гидролизующие оксалицин с более высокой скоростью, чем бензилпенициллин [41]. Однако лишь ОХА-25, ОХА-26, ОХА-55 гидролизуют оксалицин с такой скоростью, так что данное определение функциональной группы 2d не совсем корректно [86]. Усовершенствованная классификация основывается на анализе профиля чувствительности к антибиотикам и устойчивости к ингибиторам (см. раздел 1.3. данной работы) [41].

Молекулярный класс D на сегодняшний день включает более 400 различных ферментов и является самым разнородным из четырех молекулярных классов бета-лактамаз как на генетическом, так и на биохимическом уровнях. Внутри данного класса выделяют 14 подгрупп ОХА-бета-лактамаз, степень гомологии между которыми составляет от 17 до 95% [87]. Данные ферменты могут обладать как узким, так и широким спектром действия. Бета-лактамазы класса D не ингибируются клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом, хотя их активность может быть ингибирована *in vitro* хлоридом натрия. Это свойство не распространено среди бета-лактамаз других классов, таким образом, оно является отличительной характеристикой для определения бета-лактамаз класса D *in vitro*. NaCl в концентрации 100 мМ полностью подавляет активность большинства бета-лактамаз класса D (кроме ОХА-24/40). Это свойство еще четко не объяснено, вероятно, оно связано с остатком Tyr144, который отсутствует у ОХА-24. Мутагенез *in vitro* показал, что замещение Tyr в положении 144 на Phe делает мутант устойчивым к действию NaCl [88].

До тех пор, пока не была открыта первая карбапенемаза, бета-лактамазы молекулярного типа D не рассматривали как клинически значимые [87]. Далее число карбапенем-гидролизующих бета-лактамаз класса D стремительно увеличивалось, и также они распространились среди некоторых наиболее сложных грамотрицательных патогенов, включая мультирезистентные *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. и *Enterobacteriaceae* spp. Эти

бактерии часто вызывают внутрибольничные инфекции с высокой смертностью [87]. Поскольку данные ферменты обычно ассоциируются с интегронами, последовательностями вставки и транспозонами, они легко распространяются между видами. Другие бета-лактамазы часто сосуществуют вместе с ОХА-ферментами на одной плазмиде, давая фенотипический спектр устойчивости, который превосходит устойчивость индивидуальных ферментов. Более того, их ассоциация с другими детерминантами устойчивости, такими как резистентность к фторхинолонам и аминогликозидам, приводит к мультиустойчивому фенотипу [87].

Среди ферментов молекулярного класса D выделяют 5 подгрупп карбапенемаз (по гомологии аминокислотных последовательностей ферментов): ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-48, ОХА-58. Большинство карбапенемаз класса D содержат от 243 до 260 аминокислотных остатков. Экспериментально определенные молекулярные массы варьируются в пределах 23÷35,5 кДа. Изоэлектрические точки этих ферментов лежат в интервале 5,1÷9,0. Субстратная специфичность карбапенемаз класса D сильно различается, но, в основном, эти ферменты гидролизуют карбапенемы, пенициллины, цефалоспорины узкого спектра (цефалотин, цефалоридин), в то время как бета-лактамы расширенного спектра (цефтазидим, цефотаксим) гидролизуются очень слабо или не расщепляются совсем [86].

Первой открытой бета-лактамазой класса D с карбапенемазной активностью была бета-лактамаза ОХА-23 (также известная как ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem*)), найденная у *Acinetobacter baumannii* в Шотландии в 1985 году [89]. Впоследствии она дала начало подгруппе карбапенемаз, объединяющей 17 ферментов. Ферменты данной группы имеют плазмидную локализацию гена. Они слабо похожи на других представителей класса D, имеют лишь 36% гомологии с ферментами ОХА-5 и ОХА-10. В настоящий момент представители подгруппы ОХА-23 распространены в Китае [90], Бразилии [91], Южной Великобритании [92], Болгарии [93], Тайвани [94], Саудовской Аравии [95]. Согласно данным исследования SENTRY на территории Азии, 41% образцов *Acinetobacter*, содержащих гены бета-лактамаз подгруппы ОХА-23, также несут гены карбапенемаз типа ОХА-58 [90].

Следующая подгруппа карбапенемаз класса D включает 12 ферментов, и называется подгруппой ОХА-24/40. Фермент ОХА-24/40, впервые выделенный в Испании, был сначала известен как хромосомно-кодируемый, обнаруживали его исключительно у *Acinetobacter baumannii* [96]. Сейчас доказано, что ген, кодирующий данный фермент, может иметь как хромосомную, так и плазмидную локализацию [97, 98]. Хотя бета-лактамазы подгруппы ОХА-24/40 продуцируются в основном *Acinetobacter baumannii*, они также встречаются у других представителей данного семейства бактерий - *Acinetobacter haemolyticus* [97], *Acinetobacter pittii*

[99], *Acinetobacter baylyi* [100], а также у *P. aeruginosa* [98]. В настоящее время они широко распространены в Испании, Бельгии [101, 46], Португалии [102] и США [103, 104].

Третья подгруппа карбапенемаз класса D (ОХА-58) представлена 4 ферментами. Первая ОХА-58 была найдена во Франции в 2003 году. Штаммы, продуцирующие данный фермент, были ответственны за вспышку внутрибольничной инфекции [105]. Фермент ОХА-58 характеризуется 35, 33 и 18% идентичности с ОХА-5, ОХА-10 и ОХА-1, соответственно [106]. Основным продуцентом карбапенемаз подгруппы ОХА-58 являются *Acinetobacter baumannii*, но их продукция была обнаружена также у *Acinetobacter nosocomialis* на территории Испании и Тайваня [107], *A. pittii* - в Шотландии, на Тайване и в Испании [108], *Acinetobacter haemolyticus* - в Китае [100] и *Acinetobacter junii* и *A. radioresistens* - в Индии [90]. В настоящее время ферменты подгруппы ОХА-58 распространены по всему миру [46, 87, 109].

Еще одна подгруппа бета-лактамаз, гидролизующих карбапенемы, представлена вариантами карбапенемазы ОХА-51. Это одна из наиболее многочисленных подгрупп. В нее входят 48 ферментов. Ферменты данной подгруппы имеют слабую активность по отношению к пенициллинам и карбапенемам, не способны расщеплять цефалоспорины, не ингибируются клавулановой кислотой и тазобактамом [87]. Карбапенемазы этой подгруппы имеют только хромосомную локализацию и продуцируются штаммами *Acinetobacter* spp в Аргентине, Франции, Кувейте и Южной Англии [110].

Бета-лактамазы ОХА-48 являются самыми распространёнными карбапенемазами класса D в семействе *Enterobacteriaceae* [87]. В бактериях *Acinetobacter* и *Pseudomonas* ферменты данной подгруппы до сих пор не были обнаружены. Гены ОХА-48 обеспечивают устойчивость к действию пенициллинов (за исключением пиперацина) и понижают чувствительность к карбапенемам, но не изменяют МПК цефалоспоринов расширенного спектра. ОХА-48 не ингибируются тазобактамом и клавулановой кислотой, однако ингибируются NaCl (IC<sub>50</sub> 7 мМ). 12 членов подгруппы разделяют на два субкластера (ОХА-48 и ОХА-54), в каждом из которых последовательности имеют степень гомологии более 95%. Карбапенемаза ОХА-54 отличается от ОХА-48 на 20 аминокислотных остатков, профиль чувствительности к антибиотикам аналогичен ОХА-48, за исключением пиперацина и цефалофина, для которых значения МПК ниже. Ген ОХА-54 имеет хромосомную локализацию, и пока её распространение среди возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных происходит медленно [87].

Гены, кодирующие карбапенемазы ОХА-48, располагаются на плазмидах. Грамотрицательные бактерии, несущие ген *bla*<sub>ОХА-48</sub>, часто также включают гены БЛРС (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>) или ферментов AmpC [111, 112]. Образцы *K. pneumoniae*, продуцирующие ферменты подгруппы ОХА-48, изначально были обнаружены в Турции [113], затем в ряде

стран Среднего Востока [111], Северной Африки [114] и Западной Европы (Великобритании, Бельгии, Франции, Германии, Нидерландах) [46, 115]. Карбапенемазы OXA-48 также выявлены и у других представителей семейства *Enterobacteriaceae* в Индии [103], Сенегале [112], Испании [115] и Аргентине [116]. Продукция ферментов данного типа сейчас распространена повсеместно [46]. На территории Российской Федерации продукция карбапенемаз OXA-типа обнаружена в образцах, полученных из различных городов; особенно часто встречается в настоящее время бета-лактамаза OXA-48 [62].

Данные по распространённости основных карбапенемаз в мире представлены на рисунке 11 [46].



Рис. 11. Распространенность карбапенемаз в мире (2015 год) [46].

Наиболее часто встречающимися на территории Российской Федерации являются карбапенемазы KPC-2, NDM-1, VIM-2, VIM-4 и OXA-48 [3, 62, 82].

## ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К КАРБАПЕНЕМАМ И ТИПИРОВАНИЯ КАРБАПЕНЕМАЗ

### 2.1. Фенотипические методы определения устойчивости к карбапенемам

2.1.1. Определение антибиотикочувствительности бактерий по значению минимально подавляющей концентрации

Первичная информация о продукции бактериями карбапенемаз может быть получена на основании анализа профилей чувствительности штаммов-продуцентов к индикаторным антибиотикам. В настоящее время все методы определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам можно разделить на методы серийных разведений и диффузионные.

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность антибактериального препарата – величины минимально подавляющей концентрации (МПК). МПК определяется как минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде [117].

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии антибиотика из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в зоне, где концентрация антибиотика выше значения МПК. При проведении анализа индикаторный антибиотик обычно наносят на поверхность бумажного диска, вокруг которого в результате диффузии антибиотика из носителя в питательную среду происходит подавление роста бактерий. Значение МПК обратно пропорционально величине диаметра зоны подавления роста [118].

В 2014 году Европейский Комитет тестирования антимикробной чувствительности (European Community on Antimicrobial Susceptibility – EUCAST) опубликовал рекомендации для детекции продуцентов карбапенемаз [119]. Скрининговые значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) были предложены для трех антибиотиков: меропенема, имипенема и эртапенема. Меропенем выбран в качестве индикаторного антибиотика, поскольку он характеризуется лучшим соотношением чувствительности и специфичности. Для возбудителей семейства *Enterobacteriaceae* критическим значением МПК имипенема и меропенема принято превышение 8 мг/л, в то время как для эртапенема - 1 мг/л [119]. Согласно руководству Института Клинических лабораторных стандартов США (Clinical Laboratory and Standards Institut – CLSI) значения МПК для имипенема и меропенема составляют более 4 мг/л и для



эртапенема - более 2 мг/л [120]. CLSI рекомендует для бактерий семейства *Enterobacteriaceae* использовать эртапенем в качестве индикаторного антибиотика, поскольку значения МПК эртапенема обычно выше МПК других карбапенемов.

Для возбудителей семейства *Pseudomonas* и *Acinetobacter* предложенные EUCAST значения МПК для имипенема и меропенема составляют более 8 мг/л, МПК дорипенема - более 2 мг/л [119].

Следует отметить, что метод детекции продуцентов карбапенемаз на основе значений МПК недостаточно чувствителен. Многие бактерии-продуценты карбапенемаз, в том числе некоторые чувствительные штаммы, характеризуются широким диапазоном значений МПК [121]. Поэтому кроме значений МПК карбапенема часто дополнительно определяют МПК дополнительного бета-лактаманного антибиотика. Показано, что продукция карбапенемаз уменьшает чувствительность к различным бета-лактаманным антибиотикам, независимо от уровня устойчивости к карбапенемам [44]. Все продуценты карбапенемаз устойчивы к действию пенициллинов и цефаллоспоринов первого поколения. Карбапенемазы молекулярных классов А и В могут быть устойчивы также к цефаллоспорином широкого спектра, таким как цефтазидим, цефтриаксон и цефотаксим, в то время как карбапенемазы молекулярного класса D не способны расщеплять данные антибиотики. Для детекции ОХА-48 в качестве индикаторного антибиотика используют темоциллин, поскольку продукцию данной карбапенемазы сложно обнаружить по анализу профиля чувствительности к карбапенемам [122].

Таким образом, поиск специфичного и чувствительного индикаторного антибиотика, подобного цефокситину для скрининга метициллин-устойчивых *Staphylococcus aureus*, является актуальной задачей для диагностики карбапенемаз-продуцирующих бактерий. Но из-за большого разнообразия карбапенемаз с различными биохимическими свойствами, решение этой проблемы фенотипическими методами является затруднительным [123]. Также существенным ограничением данных методов является невозможность идентификации карбапенемаз при наличии у штаммов нескольких бета-лактамаз или дополнительных механизмов устойчивости, таких, как снижение проницаемости наружной мембраны или эффлюкса. В связи с этим следует отметить, что экспрессия множественных факторов устойчивости к бета-лактаманным антибиотикам становится все более распространенной [33]. Среди вида *P. aeruginosa* с металло-бета-лактамазами VIM, IMP, GIM, SIM, и SPM МПК имипенема находятся в диапазоне от 4 до 128 мкг/мл. Однако, когда гены этих ферментов переносят в *E.coli*, наблюдаемая МПК имипенема обычно намного меньше, иногда составляет 0,5 мкг/мл. Это указывает на присутствие других механизмов, вносящих вклад в устойчивость к карбапенемам в *P. aeruginosa*. Такой эффект низкого уровня устойчивости при переносе генов

также наблюдался для штаммов *A. baumannii*, продуцирующих МБЛ или карбапенемазы класса D. Многие ОХА-карбапенемазы были найдены у *A.baumannii*, где МПК имипенема обычно выше 8 мкг/мл, но клетки *E. coli*, экспрессирующие данные ферменты, имеют МПК имипенема 2 мкг/мл [44].

Кроме того, обнаружено, что спектр устойчивости и МПК различных бета-лактамов могут изменяться в зависимости от посевной дозы возбудителя – это так называемый "эффект инокулюма", который заключается в резком повышении величины МПК антибиотика при увеличении концентрации клеток в культуре [23, 124].

Таким образом, определение значений МПК антибиотиков лишь позволяет предположить наличие карбапенемаз. Для точной детекции карбапенемаз необходимо дальнейшее подтверждение продукции данных ферментов другими методами.

#### 2.1.2. Скрининговые методы выявления карбапенемаз

##### Модифицированный Ходж-тест

Метод клеверного листа, или модифицированный ходж-тест (МХТ) - один из наиболее экономичных подходов для определения и подтверждения карбапенемазной активности. Этот тест является модификацией оригинального метода, описанного Ходжем в 1978 году [125]. Для проведения анализа на плашку высевают чувствительный штамм *S.aureus*, в центр плашки помещают диск с пенициллином (10 U) и наносят колонии тестируемых микроорганизмов в виде полос от центра чашки к ее краям. Продукцию бета-лактамаз оценивают по зоне ингибирования [125]. В 2001 году Lee с сотрудниками опубликовали модификацию Ходж-теста (МХТ) [126]. В данном методе пенициллин-чувствительный *S.aureus* заменён на *E.coli* ATCC 25922, а 10 U пенициллиновый диск на 10 мкг диск с имипенемом [126]. Рост чувствительного индикаторного организма вдоль полосы тестируемого микроорганизма в зоне диффузии антибиотика интерпретируется как положительный результат анализа на карбапенемазную продукцию анализируемого образца [126, 127]. Согласно большинству исследователей, имипенем считается наиболее чувствительным для этого теста, но его специфичность гораздо ниже в сравнении с меропенемом и эртапенемом [127].

Одним из основных преимуществ МХТ является высокая чувствительность детекции карбапенемаз молекулярных классов А и D, позволяющая детектировать ферменты с низкой карбапенемазной активностью (ОХА-23, GES-5 и GES-6) [128]. Однако Girlich с сотрудниками отмечают, что чувствительность детекции продукции NDM составляет всего 50% [129]. Число ложно-отрицательных результатов значительно снижалось при добавлении к Мюллер-Хилтон агару сульфата цинка (100 мг/мл), поскольку МБЛ являются цинк-зависимыми ферментами.

Эта модификация метода позволила увеличить чувствительность детекции МБЛ до 85,7%. Кроме этого, отмечены ложно-положительные результаты данного метода в случае продукции БЛРС (СТХ-М типа) или AmpC бета-лактамаз с дефектом пориновых каналов [130].

Другим недостатком метода является его длительность по времени, он требует 24-78 часов для получения первых результатов после выделения клеточного штамма. Также метод не даёт возможности дифференцировать карбапенемазы разных классов и типов, делая необходимым проведение дополнительных исследований.

### Метод «двойных дисков» с ЭДТА

Метод «двойных дисков» с ЭДТА представляет вариант классического диско-диффузионного метода определения чувствительности микроорганизмов, который основан на способности ЭДТА хелатировать ионы цинка из активного центра МБЛ и подавлять их гидролитическую активность в отношении бета-лактамных субстратов. Альтернативные варианты метода предполагают использование диликолиновой кислоты, 2-меркаптопропионовой кислоты, других тиолов, что увеличивает эффект ингибирования.

Существуют различные модификации в реализации этого метода. Первый вариант известен под названием метод объединённых дисков (combined disk test - CDT). Используется два диска с антибиотиком, на один из которых дополнительно наносится ингибитор и, таким образом, оценивается степень уменьшения зоны роста вокруг диска с ЭДТА по сравнению с диском, содержащим только антибиотик. Метод объединённых дисков с ЭДТА для определения продукции МБЛ был описан Yong и сотрудниками в 2002 году [131]. Для оценки результатов проводили сравнение зон ингибирования имипенема (10 мкг) и имипенема с ЭДТА (750lg). Метод позволил различить все МБЛ-продуцирующие *Pseudomonas*, чувствительность и специфичность для бактерий рода *Acinetobacter* была 95,7% и 91% соответственно [131]. На рисунке 12 представлен положительный результат метода объединённых дисков для обнаружения продукции карбапенемаз с дисками с имипенемом и имипенем+ЭДТА. Для диска имипенем+ЭДТА (справа) наблюдалось увеличение зоны подавления роста, по сравнению с диском, содержащим только антибиотик [132].

Недавно группа экспертов из EUCAST и Европейского сообщества по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ESCMID) опубликовала рекомендации по детекции бета-лактамаз молекулярных классов А и В у энтеробактерий. В рекомендуемых методиках подозрение на продукцию МБЛ возникает при различии зоны ингибирования между диском с меропенемом (10 мкг) и диском меропенем+ЭДТА (0,25М) более, чем на 5 мм [119].

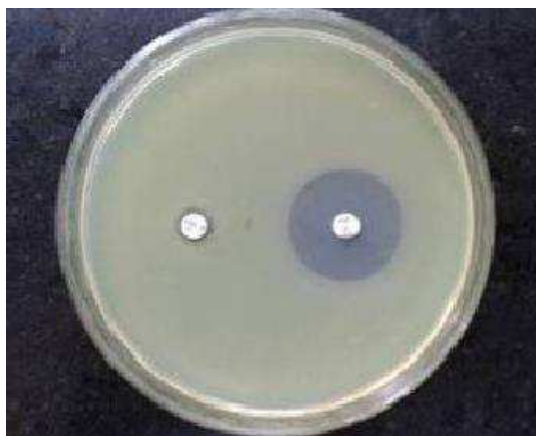


Рис. 12. Положительный результат метода объединённых дисков с использованием имипенема и имипенем+ЭДТА [132].

В другом варианте метода «двойных дисков», так называемом double disk synergy тесте (DDST), диски, содержащие только антибиотик и только ингибитор, помещаются на определённом расстоянии друг от друга. О продукции МБЛ судят по наличию расширенной зоны подавления роста культуры вокруг диска с бета-лактамом – имипенемом, меропенемом или цефтазидимом (синергизм отмечается в участке пересечения зон диффузии двух дисков) [133]. Результат выявления продукции МБЛ с использованием данного варианта метода «двойных дисков» показан на рисунке 13. Для проведения анализа использовали диски с имипенемом и ЭДТА [132].

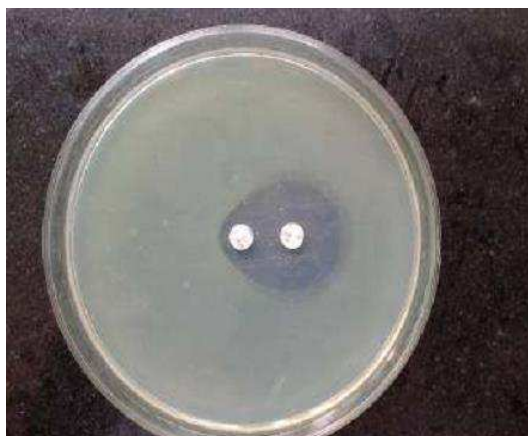


Рис. 13. Положительный результат метода «двойных дисков» в варианте DDST с использованием имипенема и ЭДТА [132].

Часто для повышения чувствительности метода используется комбинация из трёх или четырёх дисков, поскольку некоторые штаммы могут проявлять синергизм только с каким-нибудь одним из антибиотиков [127]. Образование расширенной зоны подавления роста между диском с ЭДТА и хотя бы одним из дисков, содержащих бета-лактамы антибиотики, указывает на продукцию МБЛ у тестируемого микроорганизма. Положительные результаты обнаружения продукции металло-бета-лактамаз этим методом изображен на рис 14 В, Г [133].

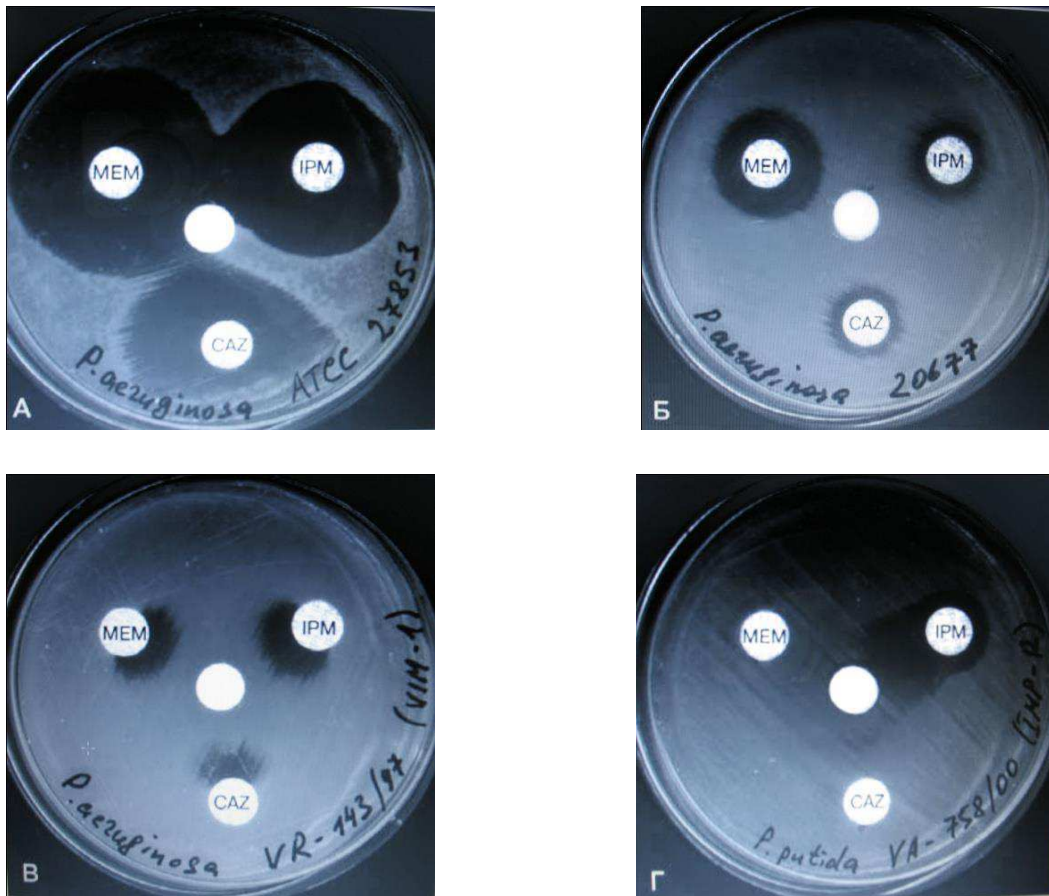


Рис. 14. Выявление продукции МБЛ с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА»: А и Б – отрицательные результаты (МБЛ-), В и Г – положительные результаты. Обозначения дисков: CAZ – цефтазидим (30 мкг); IPM – имипенем (10 мкг); MEM – меропенем (10 мкг); диск без маркировки – ЭДТА, 5 мкл 0,5 М раствора [133].

Оба метода показывают высокую чувствительность даже в случае бактерий с низким уровнем устойчивости к карбапенемам. Однако в случае метода двойных дисков интерпретация теста субъективна и не может быть оценена количественно [123].

Изучение комбинаций различных антибиотиков с ингибиторами разных типов показало, что комбинация имипенем-ЭДТА является наиболее чувствительной для детекции МБЛ, продуцируемых *Pseudomonas* и *A. baumannii*, в то время как цефтазидим-клавуланат с ЭДТА наиболее точен для *K. pneumoniae*, а цефепим-клавуланат с ЭДТА дают наилучшие результаты для определения МБЛ в *E. cloacae* и *C. freundii*. Общая чувствительность для этого метода составляет 86,7% [44]. Преимуществом данного теста является то, что он позволяет отличить МБЛ молекулярного класса В от карбапенемаз молекулярных классов А и D.

## **E-тест**

В E-тесте для определения МБЛ обычно используют имипенем и/или комбинацию имипенема с ЭДТА. Одна половина полоски пропитана имипенемом (градиент из семи различных разведений антибиотика), а вторая половина – имипенемом с добавлением постоянного количества ЭДТА. За положительный результат принимают понижение МПК имипенема в присутствии ЭДТА по крайней мере на три разведения. Пример анализа штамма *Acinetobacter baumannii*, продуцирующего бета-лактамазу VIM-2, на полоске E-теста приведен на рисунке 15 [69].

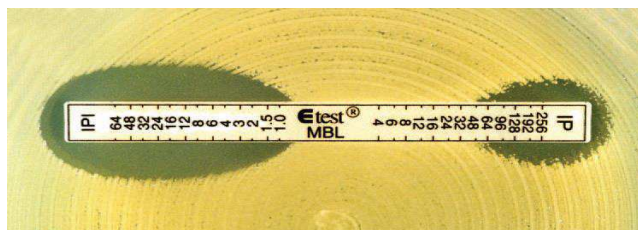


Рис. 15. E-тест полоска для определения МБЛ (AB BIODISK, Solna, Sweden); обозначения: IP-секция с имипенемом, IPI-секция с имипенемом и ингибитором.

Этот метод показал чувствительность 94% и специфичность 95% при анализе 138 охарактеризованных продуцентов МБЛ [44].

В 2013 году представлен новый вариант E-теста (AB bioMérieux, Париж, Франция), содержащий меропенем и меропенем+ЭДТА для детекции МБЛ и меропенем/меропенем+производные борной кислоты для выявления карбапенемаз группы КРС [134]. По результатам апробации метода, проведенной на 133 охарактеризованных образцах штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, чувствительность и специфичность определения карбапенемаз группы КРС составила 91,7% и 90,3% соответственно, для МБЛ чувствительность метода - 94,4%, специфичность - 81,5%. Одновременно были получены ложно-отрицательные результаты для 10 штаммов с МПК имипенема менее 4 мкг/мл [134]. Кроме того, было обнаружено, что ЭДТА сама оказывает некоторое ингибирующее действие на некоторые бактерии благодаря проникновению через внешнюю мембрану, таким образом приводя к ложно-положительным результатам. Имеются данные, что E-тесты могут показывать ложно-положительные результаты при наличии карбапенемазы OXA-23, продуцируемой *A. baumannii* [44].

### 2.1.3. Биохимические и аналитические методы детекции продукции карбапенемаз

#### **Изоэлектрическое фокусирование**

Метод изоэлектрического фокусирования, в котором белки разделяются в геле с градиентом pH в соответствии со значениями изоэлектрической точки, впервые был

использован для разделения бета-лактамаз в 1975 [135]. Локализация бета-лактамаз в геле определяется с использованием фильтровальной бумаги, пропитанной 0,7 мг/мл хромогенного цефаллоспорина нитроцефина, продукт гидролиза которого бета-лактамазами окрашен. Использование комбинации с субстрата с ингибиторами (ЭДТА, производные борной кислоты) даёт возможность различить методом данным методом продукцию карбапенемаз молекулярных классов А, В и D [23, 44].

Ещё один метод измерения активности карбапенемаз при помощи изоэлектрического фокусирования – использование двух последовательных наложений: Мюллер-Хилтон агара с имипенемом и слоя с чувствительными индикаторными микроорганизмами, например *E.coli* ATCC 25922. После инкубации в течение ночи рост колоний указывает на локализацию потенциальной карбапенемазы [136]. Такая процедура ранее использовалась для характеристики МБЛ AsbM1 из *Aeromonas sobria* - карбапенемазы, имеющей низкую скорость гидролиза хромогенного субстрата нитроцефина [137].

Изоэлектрическое фокусирование позволяет детектировать варианты КРС с различными параметрами гидролиза. Так, Wolter с сотрудниками охарактеризовали новую карбапенемазу КРС-5, изоэлектрическая точка которой подобна КРС-4, в то время как другой вариант фермента КРС-2 имеет иное значение изоэлектрической точки [138]. Дальнейшие анализы показали, что эти данные коррелируют с более высокой устойчивостью к имипенему, меньшим гидролизом цефтазида и меньшим потенциальным ингибированием клавулановой кислотой в образцах, продуцирующих КРС-2.

Изоэлектрическое фокусирование даёт достаточную информацию о значении изоэлектрической точки фермента и наличии ингибирования, что важно для разделения и обнаружения одновременной продукции бета-лактамаз в одном образце [44]. Этот метод позволяет проводить разделение на основании очень малых различий заряда без необходимости предварительной очистки грубого клеточного лизата. Однако, данным методом невозможно специфически идентифицировать и типировать карбапенемазы.

### **УФ спектрофотометрия**

Биохимический метод, основанный на спектрофотометрическом измерении скорости гидролиза карбапенема, предложен как эталонный метод для подтверждения активности карбапенемаз. Анализ включает в себя несколько стадий: наращивание культуры в течение 18 часов (в некоторых случаях время может быть снижено до 8 часов), затем добавление имипенема в конечной концентрации 150 мкмоль/л в клеточный экстракт или раствор выделенной бета-лактамазы. Гидролиз имипенема контролируют спектрофотометрически на длине волны 297 нм [23]. Как показано Vernabeu с соавторами, этот метод характеризуется

100% чувствительностью и 98,5% специфичностью детекции карбапенемаз [139]. Продуценты КРС показывают более высокую скорость гидролиза имипенема, чем бактерии, продуцирующие ОХА-48 и МБЛ. Использование спектрофотометрии позволяет эффективно детектировать продуценты SIM, IMP и VIM карбапенемаз, однако продуценты карбапенемаз класса D и NDM типа определить этим методом сложно [140].

Метод УФ спектрофотометрии позволяет различать продуценты карбапенемаз от бактерий, не продуцирующих карбапенемазы, имеющих сопряженные механизмы устойчивости (например, дефект проницаемости мембраны, экспрессия цефалоспориноз) и от штаммов, продуцирующих БЛРС и хромосомно- и плазмидно-кодируемые цефалоспоринозы. Данный метод не может различить тип карбапенемазы или детектировать карбапенемазы с очень низкой активностью, не используя при этом большое количество клеточного экстракта.

### Хромогенные тесты

Колориметрические анализы - простейшие и недорогие методы детекции бета-лактамаз, основанные на детекции гидролиза амидной связи модифицированных бета-лактамов по изменению окраски раствора. Специфические тесты используют хромогенный бета-лактамаз (например, нитроцефин), продукт гидролиза которого окрашен. Существуют тесты, основанные на неспецифических взаимодействиях гидролизованной молекулы бета-лактама, либо на изменении pH среды, например неспецифический йод-крахмальный тест. После гидролиза бета-лактама, цвет реакционной смеси или плашки вокруг колоний продуцентов бета-лактамаз изменяется с тёмно-синего на бесцветный. Для детекции *S.aereus*, *Haemophilus influenzae*, продуцирующих бета-лактамазы, был разработан метод, основанный на изменении окраски pH индикатора фенолового красного [123].

Недавно этот метод был модифицирован для детекции карбапенемаз в *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa*, и сейчас известен под названием Carbapenemase Nordmann-Poirel test (Carba NP тест). Он основан на биохимическом определении гидролиза молекулы карбапенема, сопровождающегося изменением окраски pH индикатора фенолового красного (с красного цвета на оранжевый) [140]. Для проведения теста бактериальную культуру смешивают с лизирующим раствором. После лизиса свободный от остатка клеток супернатант смешивают с раствором, содержащим феноловый красный, сульфат цинка и имипенем. В бактериях-продуцентах карбапенемаз окраска раствора изменяется с красной на желтую/оранжевую. Этот метод также позволяет предварительно идентифицировать карбапенемазы типов A, B и D, на основании профиля ингибирования тазобактамом или ЭДТА [123]. Специфичность и чувствительность теста составляет 100% и 94,4%, соответственно, для бактерий *Pseudomonas* и 100% для семейства *Enterobacteriaceae* [23, 121, 141]. Tijet с сотрудниками провели валидацию



метода с использованием коллекции из 244 образцов *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Тест показал 100% специфичность, однако чувствительность теста была ниже первоначально опубликованной [142]. Тест давал ложно-отрицательные результаты для некоторых образцов, особенно в случае энтеробактерий, продуцирующих ОХА-48 (определяется в одном случае из 17). Авторы предполагают, что это может объясняться низким уровнем экспрессии карбапенемаз. При увеличении концентрации бактерий в 2 раза чувствительность возросла до 80% [123]. Недавно Dortet с сотрудниками провели валидацию Carba NP теста для детекции продуцентов карбапенемаз из культур бактерий, выделенных из крови. Хотя в этом случае добавляется еще одна дополнительная 3х-часовая стадия инкубации сердечно-мозговой вытяжки, такая модификация может уменьшить время, необходимое для идентификации карбапенемаз, с 24 часов до 5 часов [123].

Принцип Carba NP теста также реализован в форме таблетки под названием Rapid CARB Screen Kit, содержащей рН индикатор (Rosco Diagnostica A/S, Тааструп, Дания) [140]. Все реагенты уже содержатся в наборе, в то время как на приготовление рабочих растворов для Carba NP теста уходит минимум 30 минут и хранятся они всего 72 часа [143]. При тестировании 66 образцов энтеробактерий, несущих гены карбапенемаз классов А, В или D, и 69 образцов бактерий, не продуцирующих карбапенемазы, чувствительность методов Carba NP и набора Rapid CARB Screen Kit была сравнима (97% против 98%), а специфичность коммерчески доступного набора оказалась ниже, чем у Carba NP (83% против 100%) [144].

Применение теста Carba NP для бактерий семейства *Acinetobacter* показало его эффективность для детекции металло-бета-лактамаз, но карбапенемазы других типов не были определены. Для решения этого ограничения разработан новый CarbAcineto NP тест (адаптированный из Carba NP) [140]. Он основан на том же принципе, что и оригинальный тест, но для CarbAcineto NP теста изменены условия лизиса (вместо лизирующего буфера используется NaCl) и увеличен размер инокулюма [23, 145]. Этот тест может определять все типы карбапенемаз за исключением некоторых продуцентов ферментов GES-типа со специфичностью 100% и чувствительностью 94,7% [140, 145]. Метод Carba NP II позволяет различить карбапенемазы классов А и В при использовании ЭДТА и тазобактама для ингибирования МБЛ и карбапенемаз А класса, соответственно. Положительные образцы, продуцирующие карбапенемазы, но не ингибируемые данными ингибиторами, идентифицируются как продуценты карбапенемаз класса D [141, 146]. На рис.16 представлены результаты проведения Carba NP II теста, полученные Dortet и сотрудниками [141].

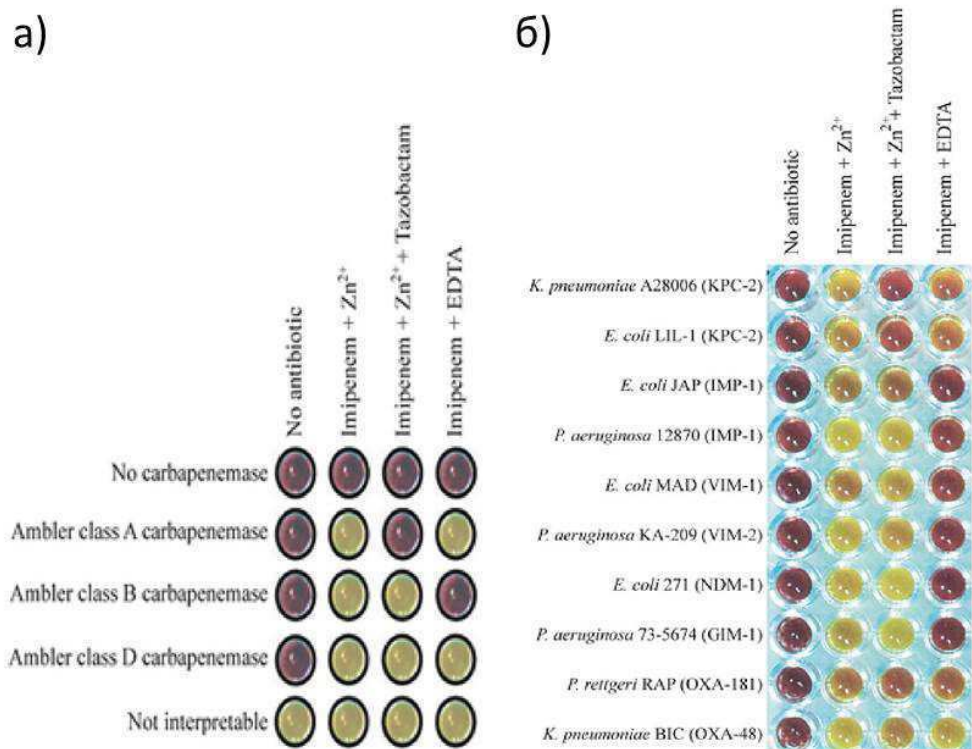


Рис. 16. Результаты Carba NP II теста.

(а) Схема интерпретации теста, (б) Результаты тестирования продуцентов карбапенемаз семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas* spp [141].

Ещё одна модификация Carba NP теста предложена группой Pires и называется Blue-Carba [147]. Целью его создания было упрощение и снижение стоимости анализа. Для этого метода используются целые клетки без экстракции фермента, более дешёвый препарат антибиотика имипенема и индикатор бромтимол, диапазон изменения окраски которого (рН 6,0-7,6) является оптимальным для большинства бета-лактамаз. Изменение окраски происходит в течение двух часов. Blue-Carba, как сообщается, детектирует карбапенемазы со 100% чувствительностью и специфичностью во всех грамотрицательных бактериях, продуцирующих карбапенемазы [146, 147].

Carba NP тест наряду с модифицированным Ходж-тестом является одним из официально рекомендуемых Институтом Клинических и Лабораторных стандартов (CLSI, 2015) и EUCAST тестов для подтверждения продукции карбапенемаз в чистых изолятах [146, 148, 149]. Основным недостатком метода является большое количество ложно-отрицательных результатов, особенно в случае продукции карбапенемазы OXA-48, широко распространённой по всему миру. Ещё одним существенным ограничением при применении теста является невозможность одновременного определения продукции карбапенемаз нескольких типов или карбапенемаз в смеси с другими бета-лактамазами.

### Масс-спектрометрия

При гидролизе антибиотиков бета-лактамазами изменение массы вследствие гидролиза бета-лактамного кольца может быть измерено методом масс-спектрометрии. В 2011 году опубликованы результаты детекции карбапенемаз с использованием времяпролётной масс-спектрометрии (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS) [150]. В процессе определения образец ионизируется в камере высокого давления и ускоряется электрическим полем. Для детекции карбапенемазной активности свежую ночную бактериальную культуру суспендируют в буфере, центрифугируют, и ресуспендируют в реакционную буферную смесь, содержащую молекулу карбапенема. После инкубации в течение 1-4 часов при 35<sup>0</sup>С, смесь центрифугируют и супернатант смешивают с подходящей матрицей и проводят измерения на масс-спектрометре и затем анализируют спектры интактной молекулы карбапенема и продукта его расщепления [23, 123]. MALDI-TOF MS был применен для исследования 124 образцов бактерий, не чувствительных к карбапенемам, из которых 30 были продуцентами карбапенемаз VIM-2 и IMP-7 у *P.aeruginosa*, VIM-1, KPC-2 и NDM-1 у представителей Enterobacteriaceae, чувствительность и специфичность метода составили более 95% [150]. Также была показана возможность определять IMP- и OXA-продуцирующие бактерии семейства *Acinetobacter* [23, 152]. Hrabac с соавторами уменьшили время инкубации путём добавления додецилсульфата к бактериальным клеткам перед инкубацией и использовали эту модификацию для детекции NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48 и OXA-162 в *Enterobacteriaceae* со 100% чувствительностью и специфичностью анализа [151]. Kempf использовал имипенем с этанолом, ацетоном и трифторуксусной кислотой в качестве матрицы в Ultraflex I масс-спектрометре для получения чистых спектров имипенема и продуктов его расщепления без фоновых пиков и шума для детекции карбапенемаз в *Ac. baumannii* [153]. Группа Hoys-Mallecot использовала культуры крови для определения карбапенемаз с помощью MALDI-TOF MS, инкубация длилась 4,5 часа, чувствительность анализа была равна 100%, специфичность 90% [154].

Сейчас метод МС часто используется обнаружения продукции карбапенемаз в развитых странах. Кроме MALDI-TOF MS к методам МС относится и высокоэффективная жидкостная хроматография-танDEM МС (ВЭЖХ-МС/МС). Методы ВЭЖХ-МС/МС выбираются для детекции большинства лекарств и определения их уровня, даже для антибиотиков, таких как эртапенем [140, 155]. Carvalhaes с сотрудниками использовали метод ЖХ-МС для детекции карбапенемов и продуктов их расщепления в бактериях, продуцирующих карбапенемазы IMP-, NDM-, VIM, KPC-, GES- и OXA-типов. При инкубации в течение 4 часов чувствительность и специфичность метода достигала 100%. Недавно аналогичные результаты были получены

группой Carricajo с использованием ВЭЖХ-МС/МС [156]. ЖХ-МС имеет ряд преимуществ перед MALDI-TOF MS. Этот метод удобно использовать для повседневных анализов в концентрационном диапазоне суб-микрограмм на миллилитр, что улучшает производительность. Также этот метод подходит для определения активности карбапенемаз в сложных биологических матрицах [140]. Однако данные методы имеют ограниченное использование вследствие высокой стоимости оборудования и высоким требованиям к квалификации персонала.

### Иммунохроматография

Метод иммунохроматографии основан на иммунологической реакции, проводимой в проточном режиме на поверхности пористых носителей с помощью капиллярных сил. При определении используются два типа специфических антител против антигена (в данном случае молекулы карбапенемазы). Один тип антител иммобилизован на носителе, другой помечен коллоидным золотом. Когда хроматографическая полоска опускается в исследуемый образец, меченные золотом антитела образуют иммунокомплекс с антигеном. Этот комплекс движется по мембране вместе с жидкостью, взаимодействует с иммобилизованными антителами, образуя специфический комплекс и давая окраску тестовой зоны полоски [157].

Одновременно две независимые группы в Японии протестировали коммерчески доступные наборы на основе иммунохроматографических полосок для детекции карбапенемаз. Kitao с сотрудниками использовали набор для детекции МБЛ IMP-типа в *P. aeruginosa*, результаты анализа полностью совпали с данными молекулярных тестов [23, 158]. Notake с коллегами определили разные варианты ферментов IMP-типа в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих грамотрицательных бактериях со 100% чувствительностью и специфичностью [23]. Было показано, что данная методика является надежной, чувствительной и удобной в использовании. Однако методом иммунохроматографии нельзя определить новые мутации в генах-мишенях [158]. Кроме того, система специфична к типу, но не субтипу карбапенемаз. Так, она может отличить ферменты типа IMP от NDM, но не может дифференцировать IMP-1 от IMP-2 или IMP-7.

Фенотипические методы являются простыми, недорогими и широко используются в микробиологических лабораториях. Однако они имеют ряд ограничений. Главным недостатком всех фенотипических методов является длительность анализа по времени (24-78 часов). Также результаты анализов часто сложно интерпретировать. Кроме того, данными методами не всегда возможно определить тип карбапенемазы, а также нельзя идентифицировать другие механизмы устойчивости к карбапенемам. Для более точной детекции карбапенемаз и при проведении

эпидемиологических исследований необходимо использовать молекулярно-генетические методы.

## **2.2. Генотипические методы идентификации карбапенемаз**

Несмотря на широкое разнообразие и бурное развитие фенотипических методов, молекулярно-генетические методы остаются золотым стандартом для точной идентификации генов карбапенемаз [123]. Основные молекулярно-генетические методы, используемые в настоящее время:

- амплификация нуклеиновых кислот (ПЦР, ПЦР в реальном времени, изотермическая амплификация посредством образования петель)
- определение нуклеотидной последовательности генов (полногеномное секвенирование методом секвенирования нового поколения)
- методы молекулярной гибридизации (ДНК-микрочипы)

### 2.2.1. Методы детекции карбапенемаз, основанные на амплификации ДНК

#### **Технологии ПЦР для определения карбапенемаз**

В настоящее время разработаны несколько вариантов специфических ПЦР для амплификации карбапенемаз одного типа, Queenan и Bush в своём обзоре собрали все предложенные последовательности праймеров для проведения специфических ПЦР для амплификации всех известных групп карбапенемаз [44]. Однако в связи с резким увеличением количества новых субтипов карбапенемаз необходимо было разработать метод мультиплексной (мультипраймерной) ПЦР – реакции совместной амплификации нескольких ДНК-матриц в одной реакционной среде с использованием нескольких пар праймеров. Для создания такой реакции необходимы высокоспецифичные праймеры, которые не реагируют друг с другом. Условия амплификации должны быть оптимальными для всех праймеров, а длины получаемых в процессе реакции ампликонов исследуемых генов должны различаться для проведения их лёгкой идентификации [159]. В 2007 году Ellington с сотрудниками разработали мультиплексную ПЦР для амплификации 5 групп металло-бета-лактамаз VIM, IMP, SPM, GIM и SIM в одной реакции. Далее Poirel усовершенствовал анализ, создав три мультиплексных ПЦР, которые дополнительно детектируют KPC, NDM-1 и OXA-48. Затем набор из шести мультиплексных и одной специфической ПЦР был разработан группой Dallenne из Франции для определения OXA-1, БЛРС, плазмидно расположенных Amp C бета-лактамаз, карбапенемаз классов А, В и D [160]. Однако метод не был апробирован на клинических образцах. [123]. В 2011 году этот метод был усовершенствован Voets и коллегами, представившими 7

мультиплексных ПЦР для детекции Amp C бета-лактамаз, МБЛ (GIM, NDM, SIM, SPM), сериновых карбапенемаз (IMI, SME, NMC-A), ОХА-карбапенемаз (23,24,48,1,2,51,4 и 58), используя в данном анализе 4 мультиплексных ПЦР, опубликованных ранее Dallenne [161].

#### *ПЦР в режиме реального времени*

Обычная ПЦР с последующим гель-электрофорезом постепенно уступает дорогу активно развивающейся в настоящее время технологии ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РРВ). Данный метод позволяет не только детектировать, но и проводить количественное определение генов устойчивости с использованием флуоресцентных зондов или красителей. Распознавание генов проводится на основе анализа кривых плавления - зависимостей интенсивности флуоресценции от температуры плавления. Каждый ген имеет свою уникальную кривую плавления, генотипирование проводится на основе характеристических пиков плавления ампликонов.

В 2007 году Mendes и др. описали первую мультиплексную ПЦР РРВ такого типа для детекции генов МБЛ (IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1) [162]. Позднее группа Monteiro разработала мультиплексную ПЦР РРВ для идентификации наиболее часто встречающихся в настоящее время сериновых карбапенемаз (KPC, GES и ОХА-48) и МБЛ (IMP, VIM, NDM), получив кривые плавления с высоким разрешением [163].

Другой вариант метода ПЦР РРВ – метод примыкающих проб, основанный на использовании двух олигонуклеотидных зондов, гибридизующихся с ДНК-мишенью в непосредственной близости друг от друга. В один зонд вводится флуорофор-донор, в другой – флуорофор-акцептор. Гибридизация зондов с матрицей ведет к сближению флуорофоров и переносу энергии с донора на акцептор (флуоресцентно-резонансный перенос энергии). Этот подход часто применяется для детекции однонуклеотидного полиморфизма (ОНП). В 2011 году Chen с сотрудниками разработали мультиплексную ПЦР РРВ с использованием технологии примыкающих молекулярных зондов для определения генов KPC [164]. Хотя стоимость молекулярных зондов достаточно высока, она окупается выигрышем во времени и возможностью использовать небольшой реакционный объём.

Также при проведении ПЦР РРВ часто используют технологию Taqman, основанную на методе разрушаемых зондов. Олигонуклеотид модифицируется флуорофором и тушителем флуоресценции. В отсутствие мишени флуорофор и тушитель сближены, и флуоресценция подавлена. При наличии специфической матрицы зонд гибридизуется на ампликон, и вследствие 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы (способности гидролизовать последовательность ДНК в направлении 5'-3') это ведет к его разрушению и появлению

флуоресцентного сигнала. Использование данного подхода описано для идентификации субкластера МБЛ, сериновых карбапенемаз и генов БЛРС [165].

Проведена валидация разработанных ПЦР РРВ в мультицентровых исследованиях [166]. Все описанные выше мультиплексные ПЦР РРВ характеризуются 100% чувствительностью и специфичностью. Результаты исследования показывают, что ПЦР РРВ - надежный и быстрый метод генотипирования карбапенемаз [123].

Недавно разработана коммерческая система GenExpert (Cepheid, Sunnyvale, CA) с картриджами для быстрой детекции клинических штаммов, несущих гены bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>VIM</sub>, bla<sub>NDM</sub> и bla<sub>OXA-48</sub>. Однако Decousser с сотрудниками сообщают о том, что им не удалось детектировать гены bla<sub>OXA-48</sub> в *Escherichia coli* при помощи системы GenExpert и картриджа Xpert Carb-R, в то время как результаты Carba NP теста были положительными [146]. Другой коммерческой системой на основе ПЦР РРВ является Check-MDR Carba (Check-Points). Она была успешно протестирована на клинических образцах для детекции KPC, NDM, OXA-48, VIM, IMP [167-169]. Недавно представлена Check-Direct CPE (Check-Points) - новая версия этой системы, созданная теми же разработчиками. Однако она плохо различает гены бета-лактамаз NDM и VIM и может детектировать не все варианты карбапенемаз, поэтому необходима её дальнейшая доработка [170]. Для идентификации генов KPC создана коммерческая система ПЦР РРВ QKPC (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Франция) [171].

### **Альтернативные методы амплификации ДНК**

ПЦР-самый распространенный, но далеко не единственный способ амплификации нуклеиновых кислот. Известны также лигазная цепная реакция, амплификация со смещением цепи, QR-репликационная амплификация. Наиболее активно развивающимся в настоящее время методом амплификации нуклеиновых кислот является изотермическая амплификация посредством образования петель.

#### *Изотермическая амплификация посредством образованием петель*

Для преодоления таких недостатков ПЦР, как дорогостоящее оборудование и инактивация Taq-полимеразы ингибиторами в биологических образцах (например, гепарином, клеточной сывороткой), разработана изотермическая амплификация посредством образования петель (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), которой требуется только температурно-контролируемая водяная баня для соблюдения изотемпературных условий [172, 173]. Она работает по принципу амплификации со смещением цепи. Несколько праймеров узнают нужный участок, Bst ДНК-полимераза осуществляет их удлинение при постоянной температуре. В итоге получают перевернутые повторяющиеся последовательности цепи-

мишени, соединённые между собой петлями одноцепочечной ДНК. За процессом амплификации можно наблюдать путём измерения мутности реакционного раствора на спектрофотометре или с использованием флуоресцентно меченных реагентов [172, 173]. По сравнению с ПЦР РРВ, метод LAMP характеризуется меньшим временем на разработку новых вариантов при появлении новых генов [169].

Solanki с сотрудниками разработали две реакции изотермической амплификации посредством образования петель для идентификации карбапенемаз NDM-1 и KPC [174]. Для амплификации каждого гена использовалось по 3 пары праймеров, на разные участки цепи – с краю, по центру и ещё на один дополнительный участок. Реакция проводилась при 60°C в течение 45 минут, для остановки реакции, использовали нагрев до 80°C (5 минут). Продукты амплификации детектировали с использованием флуоресцентных красителей. Метод был апробирован на 60 клинических образцах *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* и показал лучшую чувствительность и специфичность по сравнению с ПЦР и фенотипическими методами (МХТ и диско-диффузионным тестом) [174]. В 2015 году Nakano с сотрудниками разработана еще одна реакция изотермической амплификации посредством образования петель для KPC карбапенемаз [173]. Реакция проводится при 68°C в течение 50 минут с использованием 5 праймеров (2х внешних, 2х внутренних и одного дополнительного). Метод позволяет проводить анализ клинических образцов мочи, крови, кала с высокой чувствительностью (10<sup>0</sup> КОЕ/мл) [173].

На основе технологии изотермической амплификации посредством образования петель создана коммерческая система Superbug complete A kit (Amplex, Gieben, Германия), апробированная на 450 клинических образцах грамотрицательных бактерий, способная детектировать гены NDM, KPC, VIM со 100% чувствительностью и специфичностью, однако чувствительность определения OXA-48 всего 83%, а гены IMP и OXA-181 с её помощью определить невозможно [169].

### 2.2.2. Секвенирование генов карбапенемаз

Метод ДНК-секвенирования считается наиболее точным и надежным методом для определения бета-лактамаз, в том числе карбапенемаз. Ещё несколько лет назад определение полной нуклеотидной последовательности гена считалось трудоемким и дорогостоящим. Однако на смену секвенированию по Сэнгеру, для которого необходимо более 20000 клонов больших бактериальных хромосом для построения библиотеки, пришла технология секвенирования нового поколения (СНП) или next generation sequencing (NGS), позволяющая секвенировать полный геном быстро и с меньшими финансовыми затратами [175]. Принцип



секвенирования нового поколения основан на одновременном параллельном секвенировании миллионов коротких фрагментов ДНК с последующей «сборкой» генома. Секвенирование производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках, которые выполняют роль матрицы. Нуклеотиды встраиваются в новую цепь в определенном порядке, соответствующем матричной цепи, который записывается в цифровом виде. После включения в цепь каждого последующего нуклеотида прибор регистрирует сигнал. Данные далее обрабатываются с помощью специального программного обеспечения. [176].

Для определения последовательности генов СНП использует платформ-специфические библиотеки, которые амплифицируются изотермически перед секвенированием, либо проводят секвенирование напрямую без предварительной амплификации в течение нескольких часов [177]. Для проведения СНП используют такие приборы, как 454 GS Junior (Roche, Базель, Швейцария), MiSeq (Illumina, Сан-Диего, США) и Ion Torrent PGM (Life Technologies, Grand Island, США) [178]. При проведении сравнения этих систем MiSeq (Illumina) показал наилучшие результаты и по скорости считывания и по частоте ошибок (0,4% против 1,78% Ion Torrent), в то время как обе другие системы давали гомополимер-ассоциированные ошибки вставки/делеции последовательности ДНК [178, 179]. Технологию СНП применили для идентификации и типирования генов устойчивости, кодирующих БЛРС ( $bla_{CTX-M}$ ,  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$ ), плазмидно-ассоциированные AmpC (CMY) и карбапенемазы ( $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$ ) [159].

Технология секвенирования нового поколения представляет собой надёжный инструмент секвенирования ДНК из единственной клетки или ДНК некультивируемых бактерий без стадии выращивания культуры [146]. Секвенирование полного генома с использованием СНП даёт возможность провести идентификацию всех типов карбапенемаз, известных и неизвестных, в течение 8 часов со 100% чувствительностью и специфичностью [169]. Основным недостатком СНП является отсутствие универсальной платформы анализа для удобной обработки и сравнения данных, полученных в разных лабораториях. Необходимо разработать общую центральную базу данных, а также стандартный биоинформационный пакет обобщения и анализа всех имеющихся на настоящий момент данных СНП с результатами, полученными методом секвенирования [146, 177]. По описанным выше причинам технологию СНП пока сложно использовать в микробиологических лабораториях, кроме того стоимость анализа пока остаётся достаточно высокой.

### ГЛАВА 3. ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НА ДНК-МИКРОЧИПАХ

Гибридационный анализ на ДНК-микрочипах является одним из интенсивно развивающихся в последнее время методов для идентификации нуклеотидных последовательностей. Эд Саузерн в 1975 году использовал меченую ДНК для обнаружения специфической последовательности среди фрагментов ДНК, закреплённых на твёрдом носителе. Саузерн блот, по сути, был первым ДНК-чипом [180]. Далее технология ДНК-чипов активно развивалась, позволяя анализировать всё большее количество последовательностей нуклеиновых кислот, размер самого чипа при этом уменьшался. Первые микрочипы появились в конце 80-х годов. В 1995 году опубликованы первые результаты использования ДНК-микрочипов для определения уровня экспрессии генов [181].

ДНК-микрочип представляет собой пластину из стекла или полимерного носителя с небольшой площадью (1-10 см<sup>2</sup>), на которой в определенном порядке размещены фрагменты ДНК или одноцепочечные олигонуклеотиды с определённой последовательностью оснований. Количество различных нуклеотидных зондов, иммобилизованных на чипе, может достигать 1 миллиона на 1 см<sup>2</sup> носителя, их длина лежит в диапазоне от 10 до 1000 нуклеотидов. Метод анализа на ДНК-микрочипах основан на амплификации необходимого участка нуклеиновой кислоты с одновременным введением метки и последующей гибридизацией на поверхности микрочипа исследуемой ДНК-мишени с иммобилизованными на микрочипе олигонуклеотидами. В результате гибридизации ДНК с зондами, основанной на принципе комплементарности оснований, образуются новые дуплексы ДНК, которые регистрируются по активности метки в соответствующих зонах микрочипа [182].

За прошедшие годы технология микрочипов значительно развилась и находит всё новые области своего применения. Развитие технологии происходит как в направлении поиска альтернативных флуоресцентной методов детекции, так и в адаптации технологии для внедрения ее в практику. Последние годы наиболее активный интерес вызывает технология ДНК-микрочипов низкой плотности с использованием от десятков до нескольких сотен олигонуклеотидных зондов. Примером такой технологии может служить технология гелевых микрочипов, разработанная в Институте молекулярной биологии им. Энгельгарта под руководством А.Д. Мирзабекова [183]. Эта технология была успешно реализована при создании микрочипа для идентификации генетических детерминант устойчивости микобактерий туберкулеза [184].

В настоящее время применяется две основных схемы проведения гибридационного анализа на ДНК-микрочипах. Первая, так называемая, прямая схема, основана на гибридизации

заранее меченой ДНК-мишени с олигонуклеотидными зондами, закреплёнными на поверхности носителя. Метка в анализируемую ДНК обычно вводится в процессе её амплификации с помощью ПЦР, но может быть введена и в готовый ПЦР-продукт. Вторая схема часто встречается в литературе под названием «сэндвич»-гибридизации. В этом случае используется немеченая ДНК-мишень, которая связывается с олигонуклеотидами ДНК-микрочипа, а для выявления полученных ДНК-дуплексов используется второй «детектирующий» зонд, несущий метку. Далее оба способа гибридации будут подробно рассмотрены.

### 3.1. Гибридационный анализ с использованием меченой ДНК-мишени

Для проведения идентификации генов с помощью этого метода необходимо предварительно ввести метку в анализируемую ДНК. Наиболее часто используемыми способами введения метки являются: включение метки во время амплификации гена с помощью полимеразной цепной реакции, удлинение случайных олигонуклеотидных затравок (рендом праймирования) и ник-трансляция.

*Введение метки в процессе ПЦР.* Часто метку встраивают в анализируемую ДНК непосредственно во время амплификации генов. Для этого при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основном, используют дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, несущие метку. Для включения флуоресцентной метки в синтезируемую цепь ДНК в реакцию вводят дезоксицитозинтрифосфат dCTP, ковалентно связанный с флуоресцентным красителем, обычно Cy3-dCTP [185-187] или Cy5-dCTP [188-190]. Однако существует проблема плохого распознавания меченых дезоксирибонуклеотидтрифосфатов ДНК-полимеразой. Решением данной проблемы может быть использование дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и меток меньшего размера. Так, например, для введения биотиновой метки в ДНК, вместо дезокситимидинтрифосфата (dTTP) применяют меченный биотином дезоксиуридинтрифосфат (Biotin-dUTP) [191-193]. Следует отметить, однако, что полная замена дезоксирибонуклеотидтрифосфатов на их меченые аналоги критически снижает выход ПЦР-продуктов. По мнению многих авторов, соотношение свободных и меченых дезоксирибонуклеотидтрифосфатов имеет важное значение при проведении амплификации генов с одновременным включением метки и должно подбираться эмпирически для каждой реакции. В технологии ДНК-микрочипов для получения меченой ДНК в процессе ПЦР в основном используется соотношение свободных и меченых дезоксирибонуклеотидтрифосфатов 3:2 [185-188, 194], но применяются также соотношения 2:1 [195, 196] и 1:1, соответственно [190].

Другим подходом для введения метки во время амплификации генов в процессе ПЦР является использование меченых праймеров [197-199]. Этот способ получения меченого ПЦР-продукта открывает большой простор для используемых меток – метками могут служить не только флуоресцентные красители, радионуклиды и биотин, но также более крупные молекулы – частицы коллоидного золота или ферменты. Однако синтезируемая цепь ДНК-мишени содержит только одну молекулу метки, что может отразиться на чувствительности гибридационного анализа.

*Удлинение случайных олигонуклеотидных затравок (рендом праймирование).* Метод введения метки путём удлинения случайных олигонуклеотидных затравок основан на методике, предложенной Feinberg и Vogelstein в 1983 году для встраивания радиоактивных нуклеотидов в цепь ДНК [200]. Проводится денатурация фрагментов ДНК на кипящей водяной бане. Затем на обоих цепях ДНК отжигаются олигонуклеотиды со случайной последовательностью оснований. Для удлинения олигонуклеотидных затравок используется фрагмент Клёнова (фрагмент ДНК-полимеразы I, лишенный 5'→3' экзонуклеазной активности для исключения разрушения полимеразой синтезируемой цепи ДНК) и смесь дезоксирибонуклеотидов – трёх «холодных» (без метки) и одного «горячего» (содержащего радиоактивную метку) [201]. Каждый набор случайных олигонуклеотидов содержит все возможные последовательности (для гексамеров, которые обычно используются в методе рендом праймирования должно быть 4096 различных олигонуклеотидов), и таким образом обеспечивает удлинение любой ДНК-мишени [202].

Стратегия создания одноцепочечной ДНК путём рендом праймирования часто используется для случайной амплификации ДНК и синтеза кДНК на матрице РНК [203]. Также разработаны методы амплификации следовых количеств неизвестной ДНК или РНК с помощью метода удлинения случайных олигонуклеотидных затравок [202].

Основным недостатком метода рендом праймирования являются высокие требования к чистоте образца ДНК-мишени. В случае недостаточной чистоты образца специфичность удлинения и качество получаемых продуктов может быть невысоким. ДНК предварительно можно очистить методом гель-электрофореза.

*Ник-трансляция.* Название этого способа введения метки образовано от слова nick, в перероде с английского обозначающего разрез. Принцип метода основан на образовании одноцепочечных разрывов двухцепочечной ДНК с использованием ДНКазы I и синтетической активности фрагмента Клёнова ДНК-полимеразы I, который в присутствии меченых дезоксирибонуклеотидтрифосфатов удлиняет цепь в местах разрыва с одновременным включением в цепь меченых нуклеотидов. Наиболее распространённой меткой, вводимой с использованием ник-трансляции является биотин [201]. Для его включения в цепь используют

меченые дезоксиуридинтрифосфаты (Biotin-dUTP) или дезоксиаденинтрифосфаты (Biotin-dATP).

Далее проводится гибридизация полученной меченой анализируемой ДНК-мишени с олигонуклеотидными зондами, расположенными в определенном порядке на поверхности носителя и детекция гибридизационных дуплексов ДНК по активности метки в соответствующих ячейках микрочипа. Такой способ гибридизации с использованием меченой ДНК-мишени и прямой схемы анализа широко применяется для проведения мультианализа с помощью ДНК-микрочипов. Все разработанные на сегодняшний день микрочипы для идентификации бактериальной устойчивости к антибиотикам основаны на прямой схеме проведения гибридизации [185-188, 194]. Разработан ДНК-микрочип в пробирке с использованием меченой ДНК-мишени и колориметрической детекции (ESBL/AmpC/carbapenemase DNA analysis, Alere Technologies, Jena, Germany) [204]. Микрочипы для идентификации генов карбапенемаз (Check-Points ESBL/KPC, Verigene blood culture gram-negative тест), которые будут подробно описаны в разделе 3.3 данной работы, также созданы по принципу определения меченой ДНК-мишени.

### 3.2. Гибридизационный анализ с использованием «сэндвич» схемы и немеченой ДНК-мишени

Метод «сэндвич»-гибридизации основан на детекции взаимодействия между двумя олигонуклеотидными зондами и анализируемой ДНК без метки. Его принцип впервые был описан в работе Dunn и Hassel в 1977 году. Один зонд, немеченный, иммобилизован на поверхности носителя и используется для улавливания анализируемой ДНК из раствора, поэтому в литературе часто обозначается как «улавливающий» зонд. Другой зонд, так называемый «детектирующий», содержит метку и служит для обнаружения образующихся при гибридизации ДНК-дуплексов. Схема метода приведена на рисунке 17.

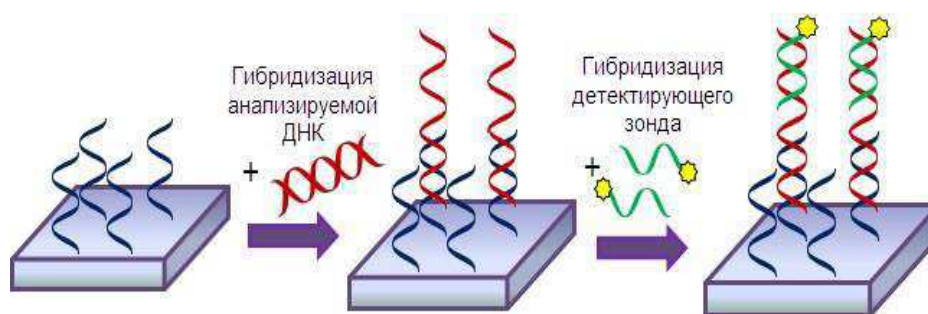


Рис. 17. Принцип «сэндвич»-гибридизации на ДНК-микрочипе.

«Сэндвич»-гибридизация широко используется в клинической диагностике для детекции РНК бактерий [205-209], дрожжей [210], морского планктона [211] и водорослей [212, 213]. Использование «сэндвич» метода для анализа малоустойчивых цепей РНК обусловлено повышением стабильности образующихся при гибридизации дуплексов.

Для анализа мРНК в работе, опубликованной Varken с сотрудниками, помимо второго зонда вводятся ещё 4 «вспомогательных» зонда. Матричная РНК одновременно гибридизуется с «улавливающими» зондами, иммобилизованными на поверхности магнитных частиц, и «детектирующими» зондами, содержащими метку. На анализируемой мРНК с двух сторон от «улавливающего» и «детектирующего» зонда в позициях, соседних к сайту их связывания, дополнительно гибридизуются так называемые «вспомогательные» зонды – короткие олигонуклеотиды. Сообщается, что эффективность гибридизации при этом значительно возрастает. Авторы предполагают, что основное влияние «вспомогательных» зондов состоит в снижении структурных и стерических проблем вблизи поверхности магнитной частицы [205].

В 2014 году Ueno с сотрудниками описали новый вариант микрочипа «сэндвич» формата для определения микро-РНК с использованием T4 ДНК-лигазы, так называемый *ligase-assisted sandwich hybridization (LASH)* анализ [214]. Стандартный «сэндвич» анализ трудно применить к микроРНК из-за её малых размеров (длина 22 нп). Поэтому в данной работе применяется «сэндвич» ДНК-микрочип совместно с лигазной реакцией. «Улавливающий» зонд, комплементарный части микроРНК, иммобилизован на поверхности стеклянного носителя, «детектирующий» зонд содержит шпильку, которая несет флуоресцентную метку, и комплементарен 3'концу микроРНК. Анализируемая микроРНК гибридизуется с обоими зондами, образуя двойную спираль с разрывами. Оба зонда содержат фосфатную группу на 5'конце и гидроксил на 3'конце. Это позволяет T4 ДНК-лигазе сшить 5'конец «улавливающего» зонда с 3'концом «детектирующего» зонда, а также 5'конец «детектирующего» зонда с 3'концом микроРНК. Как сообщается авторами, использование T4 ДНК-лигазы увеличивает выход реакции гибридизации в 50000 раз, позволяя определять микроРНК в концентрации 30 фМ – 30 пМ [214]. Данная технология простого определения может широко применяться на практике, например, для создания микрофлюидного ДНК-чипа для определения микроРНК, которую сложно пометить флуоресцентным красителем и затем провести очистку. Lizuka с сотрудниками отметили, что использование «детектирующих» зондов, меченных различными флуоресцентными красителями, позволяет детектировать отдельно гомологичные микроРНК [215]. Весь «сэндвич» анализ можно провести за 3 часа, в то время как анализ микроРНК на ДНК-микрочипах с использованием прямой схемы определения занимает весь день (24 часа).

Также имеются данные о применении метода гибридизационного анализа в «сэндвич» варианте для прямого анализа необработанных клеточных лизатов [210]. Дуплекс, полученный после гибридизации молекулы РНК-мишени с «улавливающим» и «детектирующим» зондами, привязывается к парамагнитным частицам, покрытым стрептавидином через меченные биотином «улавливающие» зонды. Детекция гибридизационного комплекса осуществляется с использованием конъюгата антител с щелочной фосфатазой, который взаимодействует с «детектирующим» зондом, меченым диглоксегином [208, 210].

«Сэндвич»-гибридизацию часто применяют и для анализа ДНК. Введение второго зонда, комплементарного другому участку анализируемой нуклеотидной последовательности, способствует повышению специфичности выявления генов. Объекты применения гибридизационного анализа ДНК в «сэндвич» варианте также разнообразны. Данный метод применяется для определения ДНК бактерий [216, 217], вирусов [218, 219] и геномной ДНК человека [220-222]. Также Liu и сотрудники отмечают, что использование метода «сэндвич»-гибридизации приводит к увеличению аналитического сигнала, а, следовательно, и повышению чувствительности анализа [223]. В ряде случаев введение второго зонда позволяет проводить анализ без предварительной амплификации определяемой ДНК [218-222].

Метод «сэндвич» гибридизационного анализа открывает простор для большого количества вариантов проведения анализа с использованием магнитных частиц с последующей электрохимической [205, 224], флуоресцентной [208, 210], хемилюминисцентной [218] или колориметрической детекцией.

Pioch и сотрудники в своей работе использовали биотинилированный «улавливающий» зонд, который далее связывался с магнитными частицами, покрытыми стрептавидином, и два «детектирующих» зонда. Авторы работы отмечают, что введение второго «детектирующего» зонда дополнительно увеличивает гибридизационный сигнал и сокращает время проведения детекции [209].

Также описано использование «сэндвич» гибридизации совместно с липазами [224]. Магнитные частицы использовались для пре-концентрирования и разделения реагентов. «Улавливающие» зонды на поверхности магнитных частиц фиксировали ДНК-мишень, а вместе с ней и меченный биотином «детектирующий» зонд на поверхности частицы. Далее в данный комплекс через стрептавидиновый линкер вводилась липазная метка. Липазы применяют для создания самоорганизующегося монослоя алкилтиолов на золотом электроде, содержащем внутреннюю эфирную группу и концевой ферроцен в качестве окислительно-восстановительной метки для электрохимической детекции ДНК-дуплекса. Липаза, присутствующая на поверхности самоорганизующегося монослоя каталитически расщепляла

эфир, высвобождая ферроцен, что приводило к понижению измеряемого электрохимического сигнала. Совмещение стратегии ферментативной амплификации с электрохимической детекцией позволило проводить определение ДНК на уровне 20 аттомоль [224].

### **3.3. Методы молекулярной гибридизации на ДНК-микрочипах для определения генов карбапенемаз**

В 2010 году компанией Check-Points разработан ДНК-микрочип под названием Check-Points ESBL/KPC (Check-Points, Wageningen, Нидерланды) для определения БЛРС (TEM, SHV, CTX-M) и карбапенемаз группы KPC [225]. В данной технологии используется метод мультиплексной лигазной реакции (multiplex ligation detection reaction). Используют два зонда – один короткий – содержит мишень-специфическую последовательность и праймер для ПЦР; второй – длинный – состоит из другой мишень-специфической последовательности, второго праймера и так называемого ZIP-кода (последовательности, комплементарной уникальному олигонуклеотиду на поверхности ДНК-микрочипа). Два зонда лигируют друг с другом при гибридизации с ДНК-мишенью. При наличии неспаренных оснований лигазной реакции не происходит, зонды остаются несвязанными. Далее проводится амплификация генов бета-лактамаз с использованием ПЦР с одной парой праймеров (35 циклов, удлинение при 55°C) и гибридизация со специфическими олигонуклеотидами микрочипа. Детекция дуплексов производится при помощи биотиновой метки на 5'конце одного из праймеров [225]. Метод позволил выявить гены 4 исследуемых типов карбапенемаз в 119 образцах из 125. Однако этот микрочип позволяет проводить идентификацию только одного типа карбапенемаз (KPC), и не включает зонды для металло-бета-лактамаз и карбапенемаз молекулярного класса D. В 2011 году теми же разработчиками представлен коммерческий Check-MDR CT102 ДНК-микрочип (Check-Points Health B.V., Wageningen, Нидерланды), который позволяет определять гены БЛРС (SHV, TEM, CTX-M) и большинство распространенных карбапенемаз (IMP, VIM, KPC, NDM, OXA-48) [226, 227]. Проведена оценка эффективности ДНК-микрочипа Check-MDR CT102 с использованием 144 клинических образцов культур крови [226, 227]. Метод, как сообщается, имеет 100% чувствительность и специфичность для большинства исследуемых генов и позволяет проводить точную идентификацию карбапенемаз и БЛРС при экстракции ДНК из энтеробактерий, бактерий семейства *Pseudomonas* и неферментирующих бактерий. Однако представленный ДНК-микрочип больше подходит для членов семейства *Enterobacteriaceae*, поскольку много важных генов бета-лактамаз, продуцируемых неферментирующими бактериями, таких как кластеры OXA-23, OXA-24 и OXA-58, не идентифицируется [140]. Также встречаются ошибки в определении генов карбапенемаз OXA-48 и KPC [228]. Более



поздняя версия Check-MDR CT102, Check-MDR CT103 включает зонды для генотипирования карбапенемаз IMP, VIM, KPC, NDM, GIM, SPM, OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-48, различных БЛРС и генов AmpC и апробирован на 188 охарактеризованных образцах грам-отрицательных бактерий (149 *Enterobacteriaceae*, 28 *Pseudomonas spp.*, 8 *Acinetobacter spp.* и 2 *Aeromonas spp.*). Метод показал хорошую эффективность и надежность в определении этих ферментов [168]. Последняя версия данного микрочипа Check-MDR CT103 XL (добавлены зонды для определения генов БЛРС bla<sub>VBL</sub>, bla<sub>PER</sub>, bla<sub>VEB</sub> и карбапенемазы bla<sub>GES</sub>) протестирована с использованием 223 охарактеризованных образцов грамотрицательных бактерий. Особо отмечена сложность определения генов метало-бета-лактамаз группы IMP (в 6 из 10 случаев наблюдался сигнал, на уровне критического для детекции с использованием программного обеспечения) [229].

В 2014 году представлен и апробирован коммерческий микрочип Verigene blood culture gram-negative тест (BC-GN) (Nanosphere, Northbrook, IL) [230]. Он способен определять резистентность у различных грамотрицательных бактериальных штаммов (*Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*), включая 6 детерминант устойчивости (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA) напрямую из положительных культур крови. Чувствительность и специфичность определения генов устойчивости составила 96,7% и 100% соответственно. Однако идентификация генов в смеси различных бактерий была неэффективной [146].

В 2012 году группа Peter разработала ДНК-микрочип на стекле с флуоресцентной меткой для типирования карбапенемаз группы KPC в моче пациентов [231]. Тестирование микрочипа проводили на модельных образцах мочи, в которые искусственно вводили клетки устойчивых *K. pneumoniae*. В 2013 году Dally с сотрудниками создали ДНК-микрочип для определения детерминант устойчивости в *Acinetobacter baumannii* [232]. Амплификация ДНК проводилась в процессе 3 мультиплексных ПЦР с одновременным введением флуоресцентной метки. ДНК-микрочип состоял из 322 зондов, нанесенных на поверхность стеклянного носителя. Гибридизацию проводили в течение 1 часа при 58°C, для обнаружения дуплексов использовали флуоресцентный сканер. Авторы сообщают о полном соответствии результатов, полученных с использованием ДНК-микрочипа, данным фенотипических тестов и специфической ПЦР.

## Заключение

В связи со стремительным глобальным распространением карбапенемаз, их способностью расщеплять все бета-лактамы антибиотики, а также частой совместной экспрессией с генами БЛРС и генами устойчивости к другим АБП, чрезвычайно необходим точный, быстрый и эффективный метод выявления продукции ферментов данного типа. Разнообразие карбапенемаз обуславливает перспективность применения методов мультианализа, позволяющих определять одновременно несколько соединений в одном анализе. Молекулярно-генетические методы позволяют получить информацию о наличии генов за короткое время (6-8 часов против 24-72 часов в случае применения фенотипических методов). Чувствительность и специфичность практически всех генотипических тестов равна 100%, в то время как для фенотипических эти значения лежат в диапазоне 70-100%.

Необходимую мультиплексность и специфичность определения генов карбапенемаз может обеспечить метод молекулярно-генетического анализа на микрочипах, поскольку он позволяет проводить одновременное определение большого количества генов за короткое время. Стоимость проведения анализа на ДНК-микрочипах при этом более низкая по сравнению с высокопроцессивным секвенированием нового поколения. Время планирования данной работы в 2009-2010 гг. совпало с интересом во всем мире к технологиям мультианализа на микрочипах низкой плотности. Количество карбапенемаз, которые необходимо было идентифицировать для определения устойчивых к антибиотикам бактерий, удовлетворяло возможностям технологии таких микрочипов. Метода мультианализа на микрочипах для идентификации генов карбапенемаз к этому времени разработано не было.

В нашей лаборатории был разработан принцип колориметрической детекции для микрочипов с использованием пероксидазы хрена и продемонстрирована его высокая чувствительность при определении генов бета-лактамаз молекулярного класса А. К достоинствам данного метода детекции можно отнести и существенно более низкую стоимость регистрирующего оборудования по сравнению с флуоресцентной детекцией.

Учитывая важность определения карбапенемаз у возбудителей инфекционных заболеваний, целью настоящего исследования явилась разработка принципа и технологии гибридизационного мультианализа на микрочипах с колориметрической детекцией для одновременной идентификации карбапенемаз молекулярных классов А, В и D.

Основными задачами работы являлись:

- разработка методов одновременной амплификации генов карбапенемаз без метки, а также с одновременным включением биотина в качестве метки;

- разработка мультиплексной ПЦР для совместной амплификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов);
- разработка двух вариантов гибридизационного анализа: прямой схемы и сэндвич-гибридизации;
- разработка микрочипов для идентификации генов карбапенемаз отдельно и совместно с наиболее клинически значимыми бета-лактамазами молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов).

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

## ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Реагенты и оборудование

#### *Реагенты*

В работе были использованы следующие реактивы: дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, Taq ДНК полимеразы, ДНК маркеры с длиной 50-1031 п.н., ДНКазы I, dUTP-16-биотин (ДНК-синтез, Россия); ДНК-полимеразы КАРА2G Fast или КАРА2G Fast HotStart (КАРА Biosystems, США), пероксидаза корней хрена (ПХ), R<sub>Z</sub>=3,0 (Яринвест, Россия); рекомбинантный стрептавидин («Имтек», Россия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК), N-гидроксисукцинимид (NHS), агароза, этаноламин, бычий сывороточный альбумин, казеин, декстрансульфат натрия (M<sub>r</sub> = 8000), цитрат натрия, цитрат калия («Sigma», США); Твин 20 ("Ferak Berlin", Германия); додецилсульфат натрия (SDS) («Serva», Германия); тритон X-100, ("Pharmacia", Швеция), гидроокись натрия, неорганические соли натрия и калия, трис(гидроксиметил)-аминометан, ЭДТА, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), бромистый этидий (Хеликон, Россия), пероксид водорода 30% ("Chemapol", Чехословакия); лимонная кислота моногидрат ("Lachema", Чехословакия); уксусная кислота (ледяная), концентрированная соляная и серная кислоты ("Химмед" Россия), этанол ("Мосреактив", Россия).

Мембранные носители «BioTrace NT» (нитроцеллюлоза) («Pall Corporation», США). 24- и 384-луночные полистироловые планшеты (Greiner bio-one, Германия).

Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР и аминоксидированные олигонуклеотидные зонды, контрольные и «детектирующие» зонды, меченные биотином, были синтезированы фирмой Синтол (Москва, Россия).

Образцы ДНК, выделенной из культур контрольных штаммов микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, KPC-1, NDM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-48, OXA-51 и клинических образцов возбудителей внутрибольничных инфекций, были предоставлены сотрудниками НИИ Антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (г. Смоленск, Россия) и НИИ нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко (г. Москва, Россия). Список штаммов представлен в таблице 21 (раздел 8.3. данной работы). Идентификация вида микроорганизмов и их фенотипическая характеристика была проведена с использованием метода «двойных дисков»

(диски с имипенемом (30 мкг) цефтазидимом (30 мкг), цефотаксимом (30 мкг), цефепимом (30 мкг) и амоксициллином/клавулановой кислотой (20/10 мкг)).

#### *Оборудование*

Навески реагентов взвешивали на электронных весах «Mettler Toledo» (Швейцария) с точностью до 0,1 мг. Измерение pH проводили на pH-метре «Mettler Toledo» (Швейцария) с точностью до 0,02 ед. pH. Центрифугирование проводили на центрифугах miniSpin и 5810R («Eppendorf», США). Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре UV-1602 («Shimadzu», Япония).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient («Eppendorf», Германия). Для визуализации продуктов амплификации ДНК в агарозном геле использовали комплект оборудования для горизонтального гель-электрофореза фирмы Bio-Rad (США).

Печать ДНК-микрочипов осуществлялась на роботе XactII™ Microarray System (LabNEXT, США) с использованием игл 300 мкм.

Гибридизацию ДНК-микрочипов проводили в термомиксере Thermomixer Comfort («Eppendorf», Германия).

Мембранные ДНК-микрочипы сканировали на пленочном сканере высокого разрешения Epson Perfection V750 pro при разрешении 4800 dpi. Полученное изображение микрочипа (в tiff формате) обрабатывали количественно с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0).

## **4.2. Методы исследований**

### 4.2.1. Приготовление рабочих растворов

#### *Буферные растворы*

Для приготовления буферных растворов навеску кристаллического компонента буфера растворяли в соответствующем объеме дистиллированной воды до получения необходимой молярной концентрации. Затем для достижения нужного pH добавляли по каплям соответственно 30% HCl, 30% KOH или 30% NaOH. Использовали следующие буферные растворы :

- 0,1 М К-фосфатный, pH=7,0;
- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, pH=7,0 (ФСБ);
- 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,05% твин 20, pH=7,0 (ФСБТ);
- 0,1 М Na-ацетатный, pH=5,5;

- 0,1 М К-цитратный, pH=4,7;
- 0,05 М Na-карбонатный, pH=8,6;
- 0,1 М Трис-HCl, 0,15 М NaCl, 0,001 М MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0 (ТСБ).
- 0,04 М Трис-HCl, 0,01 М MgSO<sub>4</sub>, 0,001 М CaCl<sub>2</sub>, pH=8,0;
- 0,01 М Трис-HCl, 0,05 М KCl, 2,5 мМ ацетата магния, pH=8,3;
- 0,01 М Трис-HCl, 0,001 М ЭДТА, pH=7,5 (ТЕ-буфер);
- солевой буфер для иммобилизации: 160 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 3,0 М NaCl 0,2 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02 М ЭДТА, pH =7,4 (20×SSPE).

#### 4.2.2. Синтез конъюгата пероксидазы хрена со стрептавидином

Конъюгат стрептавидина с ПХ получали по методу Накане [233]. 2 мг ПХ растворяли в 300 мкл дистиллированной воды, добавляли 80 мкл 0,1 М раствора NaIO<sub>4</sub> и инкубировали 20 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После этого раствор окисленной ПХ диализовали против 1 мМ Na-ацетатного буфера, pH 4,5. После диализа pH раствора ПХ доводили до 9,5 добавлением 50 мкл 0,2 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, затем добавляли к нему 500 мкл раствора стрептавидина (2 мг/мл) в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,5 и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После этого к раствору конъюгата добавляли 100 мкл раствора NaBH<sub>4</sub> (4 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Раствор конъюгата диализовали против буфера PBS в течение ночи при 4°C. Очистку проводили методом гель-фильтрации на носителе Toyopearl HW-50 ("Toyo Soda", Япония). Концентрацию ПХ в полученном конъюгате определяли спектрофотометрически, измеряя оптическое поглощение при  $\lambda=403$  нм ( $\epsilon = 102000$  М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>).

#### 4.2.3. Активация мембран 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом

Для осуществления ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на мембранных носителях поверхность мембран была предварительно модифицирована 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом (ЭДК). Для этого мембраны на 10 мин помещали в 0,1 М раствор HCl, а затем инкубировали в растворе ЭДК (10 мг/мл) в дистиллированной воде с добавлением N-гидроксисукцинимидом NHS (2 мг/мл) в течение 30 минут при 45°C при постоянном перемешивании. После этого мембраны отмывали дистиллированной водой в течение 1 мин при комнатной температуре и сушили на воздухе.

#### 4.2.4. Выравнивание кодирующих последовательностей карбапенемаз

Список карбапенемаз был получен из базы данных бета-лактамаз клиники Lahey ([www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/)). Аминокислотные последовательности ферментов и последовательности кодирующих их генов были собраны из Международного банка данных GenBank. Выравнивание кодирующих последовательностей генов карбапенемаз осуществлялся при помощи программы Clustal W, размещенной на сайте Rhône-Alpes Bioinformatics Center Института Биологии и Химии белка ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_server.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html)).

#### 4.2.5. Выделение бактериальной ДНК

Выделение бактериальной ДНК из контрольных образцов было проведено сотрудниками НИИ Антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (Смоленск) с использованием коммерческого набора InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad, США). Выделение бактериальной ДНК из клинических образцов проводилось методом температурного лизиса клеток в ТЕ-буфере. Использовали подрощенную суточную культуру. С помощью иглы в эппендорф отбирали 500 мкл образца. Клетки осаждались центрифугированием в течение 1 минуты при 13400 g. Супернатант удаляли, добавляли 100 мкл ТЕ-буфера и ресуспендировали осадок при помощи шейкера. Пробирки инкубировали в термостате 20 минут при 99°C. Затем образцы центрифугировали в течение 1 минуты при 13400 g. Супернатант переносили в новые пробирки и использовали для ПЦР (по 2 мкл на одну реакцию).

#### 4.2.6. Амплификация генов карбапенемаз методом ПЦР со специфическими праймерами

Полимеразную цепную реакцию проводили в общем объеме 25 мкл в 0,2 мл тонкостенных пробирках, содержащих 10 mM Трис-HCl (pH 8.3 при 25°C), 2,5 mM ацетата магния, 50 mM KCl, 2,5 ед. Taq ДНК полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера для данной группы бета-лактамаз (структуры праймеров приведены в таблице 7 раздела 6.1. данной работы) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), затем 25 циклов амплификации (20 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин).

Горизонтальный гель-электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1%-м агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера. В гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной

концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

4.2.7. Амплификация генов карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР с одновременным введением биотина в качестве метки

Мультиплексную полимеразную цепную реакцию проводили в общем объеме 25 мкл в 0,2 мл тонкостенных пробирках, содержащих 10 mM Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C), 2,5 mM ацетата магния, 50 mM КСl, 2,5 ед. Таq ДНК полимеразы, 100 мкМ dАТР, dGТР, dСТР, 60 мкМ dТТР, 40 мкМ dУТР-11-биотин, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера (структуры праймеров приведены в таблице 7 раздела 6.1. данной работы) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе по протоколу, указанному в п. 4.2.6.

4.2.8. Совместная амплификация генов карбапенемаз и генов бета-лактамаз молекулярного класса А методом мультиплексной ПЦР

Мультиплексная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл 5×КАРА2G буфера М, 2 mM хлорида магния, ДНК-полимераза КАРА2G Fast или КАРА2G Fast HotStart, 100 мкМ dАТР, dGТР, dСТР, dТТР, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров для каждой группы карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А ТЕМ, SHV и СТХ-М типов (структуры праймеров приведены в таблицах 7 и 8 разделов 6.1 и 6.3. данной работы) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 20-30 циклов амплификации (10-20 с – денатурация при 94°C, 20-30 с – отжиг праймеров при 65°C, 5 с -1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (2 -6 мин).

4.2.9. Совместная амплификация генов карбапенемаз и генов бета-лактамаз молекулярного класса А методом мультиплексной ПЦР с одновременным включением биотина в качестве метки

Мультиплексная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл 5×КАРА2G буфера М, 2 mM хлорида магния, ДНК-полимераза КАРА2G Fast или КАРА2G Fast HotStart, 100 мкМ dАТР, dGТР, dСТР, 60 мкМ dТТР, dУТР-11-биотин, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров для каждой группы карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А ТЕМ, SHV и СТХ-М типов (структуры праймеров приведены в таблицах 7 и 8 разделов 6.1 и 6.3. данной работы) и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе по протоколу, описанному в п.4.2.8 данного раздела.



#### 4.2.10. Иммуобилизация олигонуклеотидных зондов на поверхность мембранных носителей для изготовления ДНК-микрочипов

Все олигонуклеотиды, включая зонды для идентификации генов карбапенемаз, контроль иммуобилизации, положительный и отрицательный контроли гибридизации растворяли в солевом буфере (160 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 130 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) до концентрации 20 пкмоль/мкл (в случае зондов) или 5 пкмоль/мкл (в случае контроля иммуобилизации) и затем наносили с помощью робота, используя иглы диаметром 300 мкм, на поверхность нитроцеллюлозных мембран, предварительно модифицированных ЭДК; каждый олигонуклеотид – в 3х повторях. После этого мембраны инкубировали при 60°C в течение 30 мин. Перед проведением гибридизации ДНК-микрочип с нанесенными на них в определенном порядке олигонуклеотидами отмывали (ФСБТ – 2 раза по 10 мин) и блокировали в 25% растворе этаноламина в Na-карбонатном буфере при 45°C в течение 15 минут. Для блокирования свободных центров связывания белков проводили инкубацию мембран в растворе 1% БСА и 1% казеина в PBST в течение 30 мин при 37°C.

#### 4.2.11. Гибридизационный анализ на ДНК-микрочипах (прямая схема)

Необходимые количества меченой биотином в процессе ПЦР ДНК растворяли в буфере для гибридизации (2xSSPE, 0,2% SDS), содержащем 1,6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченого биотином (положительный контроль гибридизации). ДНК-микрочип помещали в реакционную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 1.5 часов при 45°C в термомиксере при перемешивании 700 оборотов/минуту. Затем мембраны отмывали ФСБТ – 2 раза по 10 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании.

#### 4.2.12. Гибридизационный анализ на ДНК-микрочипах в сэндвич-варианте

Перед гибридизацией ДНК в сэндвич-варианте проводили разъединение цепей ДНК. Необходимые количества амплифицированной в процессе ПЦР ДНК помещали в 0,5 мл пробирку, которую нагревали на водной бане при температуре 99°C в течение 3,5 минут и далее инкубировали во льду в течение 20 минут. Затем ДНК растворяли в буфере для гибридизации (2xSSPE, 0,2% SDS, 12 мМ MgCl<sub>2</sub>), содержащем 1,6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченого биотином (положительный контроль гибридизации) и по 10 пмоль/л меченных биотином «детектирующих» зондов для определения каждой группы/подгруппы карбапенемаз. ДНК-микрочип помещали в реакционную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 1.5 часов при 45°C в термомиксере при перемешивании 700 оборотов/минуту. Затем

мембраны отмывали ФСБТ – 2 раза по 10 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании.

#### 4.2.13. Детекция результатов гибридизации

Мембраны инкубировали в растворе конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (1 мкг/мл) в ФСБТ, содержащем 1% БСА, в течение 30 мин при 37°C. Далее осуществлялась отмывка (2 раза ФСБТ - по 10 мин и 1 раз ФСБ – 5 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании). Затем мембраны помещали в субстратный раствор на основе ТМБ и ДС на 10 мин при комнатной температуре, после чего их промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе. Мембранные микрочипы сканировали на пленочном сканере Epson Perfection V750 pro при разрешении 4800 dpi. Полученное изображение (в tiff формате, 16 bit) обрабатывали с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0).

#### 4.2.14. Количественная обработка результатов гибридизационного анализа

Принцип количественной обработки результатов анализа приведён на рисунке 18.

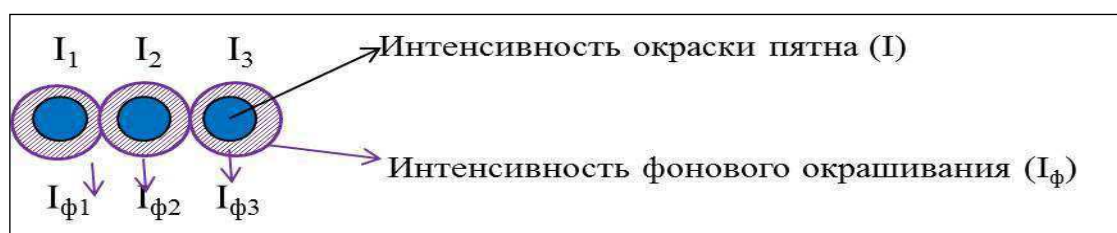


Рис. 18. Принцип количественной обработки результатов гибридизационного анализа.

Программное обеспечение позволяет наложить решетку с заданным расположением зон микрочипа на изображение сканированного результата анализа. Далее рассчитывалось значение интенсивности сигнала для каждого пятна и вокруг пятна (фоновое значение). Значение абсолютной интенсивности гибридизационного сигнала для каждого зонда вычислялось как среднее арифметическое от значений интенсивностей сигналов 3-х повторов за вычетом локальных фоновых значений:

$$I_{\text{ср}} = \frac{\sum(I_i - I_{\phi i})}{n} \quad (1),$$

где  $I_i$ -интенсивность аналитического сигнала  $i$ -го повтора,  $I_{\phi i}$ -интенсивность фонового окрашивания вокруг  $i$ -го пятна,  $n$ -общее количество повторов ( $n=3$ , зонды на микрочип наносили в 3 повторах).

При сравнительном изучении эффективности гибридизации различных зондов, иммобилизованных на поверхности одного микрочипа, значение абсолютной интенсивности аналитического сигнала нормировали на интенсивность фонового сигнала. Среднее

арифметическое значений интенсивности аналитического сигнала всех повторов делили на среднее арифметическое интенсивности фонового окрашивания всех повторов:

$$\frac{I}{I_{\phi}} = \frac{I_{\text{ср}}}{I_{\phi\text{ср}}} = \frac{\sum_n I_i}{\sum_n I_{\phi i}} \quad (2),$$

где  $I_i$ -интенсивность аналитического сигнала  $i$ -го повтора,  $I_{\phi i}$ -интенсивность фонового окрашивания вокруг  $i$ -го пятна,  $n$ -общее количество повторов ( $n=3$ , зонды на микрочип наносили в 3 повторах)

Сравнение результатов, полученных на различных микрочипах в разных опытах, проводили с использованием относительных значений интенсивности аналитических сигналов. Для этого рассчитывали относительную интенсивность сигналов, нормируя среднее значение интенсивности сигнала на усредненную интенсивность сигнала положительного контроля гибридизации. Принцип количественной обработки результатов анализа, полученных на разных микрочипах, изображен на рисунке 19.



Рис. 19. Количественная обработка результатов с использованием нормировки на положительный контроль гибридизации.

Среднее арифметическое значений абсолютной интенсивности аналитического сигнала за вычетом фона вычисляется по формуле (1), аналогично вычисляется среднее арифметическое абсолютной интенсивности сигнала положительного контроля. Затем рассчитывается значение относительной интенсивности гибридизационных сигналов по формуле:

$$I_{\text{отн}} = \frac{I_{\text{ср}}}{I_{\text{пк}}} \quad (3),$$

где  $I_{\text{ср}}$ -среднее арифметическое значений интенсивности гибридизационных сигналов зондов за вычетом фона,  $I_{\text{пк}}$ -среднее арифметическое значений интенсивности сигнала положительного контроля гибридизации за вычетом фоновых значений.

#### 4.2.15. Расчёт аналитических характеристик гибридизационного анализа на микрочипах

Для оценки чувствительности метода гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах был рассчитан предел обнаружения. На основании среднего арифметического

значения интенсивности сигналов, получаемых после гибридизации микрочипов с образцами, не содержащими ни одного из генов карбапенемаз (холостой опыт), было рассчитано среднее значение аналитического сигнала и его стандартное отклонение по формуле:

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum (I_i - I_{cp})^2}{(n-1)}} \quad (4)$$

Пределы обнаружения рассчитывались по формуле:

$$ПО = I_0 + 3\sigma \quad (5)$$

Для оценки воспроизводимости метода для калибровочных проб был рассчитан коэффициент вариации (К.В.) на основании отношения стандартного отклонения к средней величине аналитического сигнала, выраженного в процентах, по формуле:

$$К.В. = \frac{\sqrt{S_0}}{I_{cp}} \times 100\% \quad (6),$$

где  $S_0$  – стандартное отклонение сигнала калибровочных проб, рассчитанное по формуле (4),  $I_{cp}$  – средняя интенсивность аналитического сигнала, рассчитанная по формуле (1).

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КАРБАПЕНЕМАЗ И ИХ КОДИРУЮЩИХ ГЕНОВ

### 5.1. Сбор и выравнивание кодирующих последовательностей генов карбапенемаз

Согласно базе данных бета-лактамаз клиники Lahey ([www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/)) выделены и описаны следующие гены карбапенемаз: KPC тип - 24 гена, IMP тип - 53 гена, VIM тип - 46 генов, NDM тип - 16 генов, GIM тип - 2 гена, OXA тип - 498 генов, из которых 69 являются карбапенемазами, по одному гену карбапенемаз типов SPM, SIM.

Поиск последовательностей генов, кодирующих различные карбапенемазы, осуществлялся на сайте Европейского Института Биоинформатики ([www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)). Выравнивание кодирующих последовательностей генов карбапенемаз осуществлялся при помощи программы Clustal W, размещенной на сайте Rhône-Alpes Bioinformatics Center Института Биологии и Химии белка (Франция) ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_server.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html)). На основании выравнивания была определена степень гомологии генов и белковых последовательностей внутри каждого типа. Результаты определения степени гомологии приведены в таблице 3.

Таблица 3

Степень гомологии генов карбапенемаз внутри различных типов

Молекулярный класс бета-лактамаз	Тип карбапенемаз	Количество ферментов данного типа	Степень гомологии, %
A	KPC	24	98,5
B	VIM	46	65,7
	IMP	53	60,0
	NDM	16	98,4
	SPM	1	100,0
	SIM	1	99,9
	GIM	2	100,0
D	OXA	498	3,0
	OXA-карбапенемазы	69	11,5

Группа бета-лактамаз ОХА является самой обширной и гетерогенной группой ферментов. На сегодняшний день известно около 500 её представителей. У ферментов данного типа наблюдается самая низкая степень гомологии (3%). Консервативными являются только 10 аминокислотных остатков. Однако не все ОХА бета-лактамазы являются карбапенемазами. Отдельно проведено выравнивание 69 представителей ОХА типа, обладающих карбапенемазной активностью, степень гомологии составила 11,5 %. Типы карбапенемаз SIM, SPM и GIM пока содержат только по одному ферменту, поэтому степень гомологии была принята равной 100%.

## 5.2. Деление карбапенемаз на подгруппы

Наиболее гетерогенные по строению генов группы карбапенемаз, которые характеризовались степенью гомологии менее 70%, были дополнительно поделены на подгруппы.

### *Карбапенемазы молекулярного класса А*

Выравнивание генов карбапенемаз группы КРС показало достаточно высокую степень гомологии (98,5%), поэтому далее их рассматривали как одну группу без деления на подгруппы.

### *Карбапенемазы молекулярного класса В (металло-бета-лактамазы (МБЛ))*

На основании выравнивания кодирующих последовательностей генов металло-бета-лактамаз были выделены несколько подгрупп внутри типов VIM и IMP. В группе VIM со степенью гомологии последовательностей 65,7% было выделено 3 подгруппы (VIM-1, VIM-2 и VIM-7), в группе IMP (степень гомологии 60%) – 5 подгрупп (IMP-1, IMP-5, IMP-2, IMP-11, IMP-12). Ферменты-представители каждой подгруппы указаны в табл. 4, 5. Ферменты группы NDM со степенью гомологии 98,4 % на подгруппы не делились.

### *Карбапенемазы молекулярного класса D*

В бета-лактамазах ОХА типа можно выделить около 15 различных подгрупп, различающихся структурой ферментов. Способностью расщеплять карбапенемы обладают лишь некоторые из них. Представители наиболее часто встречающихся карбапенемаз группы ОХА приведены в таблице 6.

Для идентификации на ДНК-микрочипах были выбраны наиболее распространенные группы карбапенемаз: МБЛ VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM (молекулярный класс В по Амблеру), карбапенемазы ОХА-типа ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58, ОХА-48 (молекулярный класс D по Амблеру) и бета-лактамазы группы КРС (молекулярный класс А по Амблеру). Более подробные сведения о представителях каждой группы и подгруппы

карбапенемаз, выбранных для генотипирования на ДНК-микрочипе (номер в GenBank, первый микроорганизм-продуцент, данные о локализации гена и ссылка на литературу) приведены в таблицах приложений 1-3.

Таблица 4

Деление на подгруппы бета-лактамаз VIM типа

Подгруппа	Ферменты - представители
VIM-1	VIM-1, VIM-4, VIM-5, VIM-12÷14, VIM-19, VIM-25÷29, VIM-32÷35, VIM-37÷39, VIM-42, VIM-43.
VIM-2	VIM-2, VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9÷11, VIM-15÷18, VIM-23, VIM-24, VIM-30, VIM-31, VIM-36.
VIM-7	VIM-7.

Таблица 5

Деление на подгруппы бета-лактамаз IMP типа

Подгруппа	Ферменты - представители
IMP-1	IMP-1, IMP-3, IMP-4, IMP-6, IMP-10, IMP-26, IMP-30, IMP-38, IMP-40, IMP-42, IMP-52.
IMP-2	IMP-2, IMP-8, IMP-13, IMP-19, IMP-20, IMP-24, IMP-33, IMP-37, IMP-47.
IMP-5	IMP-5, IMP-7, IMP-9, IMP-15, IMP-25, IMP-28, IMP-29, IMP-43, IMP-45, IMP-51.
IMP-11	IMP-11, IMP-16, IMP-21, IMP-22, IMP-41, IMP-44.
IMP-12	IMP-12, IMP-14, IMP-18, IMP-27, IMP-31, IMP-32, IMP-34, IMP-35, IMP-48, IMP-49.

Таблица 6

Деление на подгруппы бета-лактамаз OXA-типа, обладающих карбапенемазной активностью

Подгруппа	Ферменты-представители
OXA-23	OXA-23, OXA-27, OXA-49, OXA-73, OXA-102, OXA-103, OXA-105, OXA-133, OXA-146, OXA-165, OXA-166, OXA-167, OXA-168, OXA-169, OXA-170, OXA-171, OXA-225, OXA-239.
OXA-40	OXA-24 (40), OXA-25, OXA-26, OXA-72, OXA-139, OXA-143, OXA-160, OXA-182, OXA-207, OXA-231, OXA-253, OXA-255.
OXA-51	OXA-51, OXA-64 OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-89, OXA-90, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-98, OXA-99, OXA-104, OXA-106, OXA-107, OXA-108, OXA-109, OXA-110, OXA-111, OXA-112, OXA-113, OXA-115, OXA-128, OXA-130, OXA-131, OXA-132, OXA-138, OXA-144, OXA-148, OXA-149, OXA-150.
OXA-58	OXA-58, OXA-96, OXA-97, OXA-164.
OXA-48	OXA-48, OXA-54, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247, OXA-370.

## **ГЛАВА 6. АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Целью данной работы является разработка метода гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах с использованием ДНК, которая представляет собой полную или фрагмент последовательности специфического гена. Для амплификации ДНК, выделенной из клеток бактерий-продуцентов карбапенемаз, обычно применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Для одновременного определения множества генов на микрочипах желательно использовать мультиплексную ПЦР. Основной задачей данного этапа работы являлась разработка метода мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации генов карбапенемаз 8 типов (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM и OXA) в одной реакции без метки и с одновременным включением биотина в качестве метки. Для решения этой задачи необходимо было подобрать последовательности праймеров и оптимизировать условия проведения ПЦР таким образом, чтобы все гены карбапенемаз при этом амплифицировались специфично и с достаточным для проведения последующей гибридизации выходом.

### **6.1. Выбор праймеров**

Для выбора праймеров было проведено выравнивание кодирующих последовательностей генов бета-лактамаз, включающих карбапенемазы KPC-типа, металло-бета-лактамазы (МБЛ) и карбапенемазы OXA-типа. В качестве праймеров выбирались консервативные участки последовательностей генов соответствующих типов карбапенемаз. Для амплификации полноразмерных генов выбирали участки, расположенные по концам генов. Длина праймеров подбиралась таким образом, чтобы температура плавления была близка к 70<sup>0</sup>С для возможности последующего объединения реакции амплификации карбапенемаз с реакцией амплификации полноразмерных генов бета-лактамаз молекулярного класса А, разработанной ранее [5]. При выборе структур праймеров учитывали G/C состав и отбирали структуры, для которых содержание дезоксицитозинтрифосфата и дезоксигуанинтрифосфата находилось в диапазоне 35 – 70%. Также оценивали вероятность образования димеров и вторичных структур и выбирали последовательности, для которых такая вероятность была минимальна. Структура выбранных последовательностей праймеров приведена в таблице 7.



Таблица 7

Последовательности праймеров для одновременной амплификации генов карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР

Тип карбапенемазы	Последовательность праймера, 5'→3'		Длина праймера, нукл.	GC, %	T пл., °C	Длина ампликона, п.н.
	прямой	обратный				
IMP	прямой	GAAGG(C/T)GTTTATGTTTCATAC(T/A)TCG	24	41,7	63,0	586
	обратный	GTA(A/C)G(T/C)TTCAAGAG(T/C)GA(T/C)GC(G/A)TC	23	52,2	65,8	
VIM	прямой	GATGGTGTGGTTCGCATATCGC	23	52,2	66,5	505
	обратный	CATTC(A/T)GCCAGATCGGCATCG	21	57,1	66,0	
SPM	прямой	CGTTTTGTTTGTGCTCGTTGCG	23	47,8	66,6	643
	обратный	CACATTGGCATCTCCCAGATAACC	24	50	65,8	
SIM	прямой	GTTTGC GGAAGAAGCCCAGCCAG	23	60,9	70,1	588
	обратный	GTCTCCGATTTCACTGTGGCTTGGG	25	56,0	69,1	
GIM	прямой	CTTG TAGCGTTGCCAGCTTTAGCTCG	26	53,8	69,4	614
	обратный	CTGAACTTCCAAC TTTGCCATGCCCC	26	53,8	70,0	
NDM	прямой	CTTCSTATCTCGACATGC	18	50	57,8	503
	обратный	CGTAGTGCTCAGTGTCG	17	58,8	60,1	
KPC	прямой	TTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGG	23	47,8	64,9	801
	обратный	CCTCGCTGTGCTTGTTCATCC	20	60,0	65,8	
OXA-23	прямой	GAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAG	25	48,0	66,0	689
	обратный	GGCATTTCTGACCGCATTTCC	21	52,4	65,1	
OXA-40	прямой	GTTTCTCTCAGTGCATGTTTCATC	23	43,5	62,7	713
	обратный	CATTTCTAAGTTGAGCGAAAAGGGG	25	44,0	64,9	
OXA-51	прямой	CGAAGCACACACTACGGGTG	19	60,0	65,6	648
	обратный	CTCTTTTCGAACAGAGCTAGGTATTC	26	42,3	63,7	
OXA-58	прямой	CTTG TGCTGAGCATAGTATGAGTC	24	45,8	63,6	684
	обратный	CCACTTGCCCATCTGCCTTTTC	22	54,5	66,7	
OXA-48	прямой	GCGTGTATTAGCCTTATCGGC	21	52,4	63,8	672
	обратный	CCACACATTATCATCAAGTTCAACC	25	40,0	63,3	

В случае карбапенемаз типов KPC, SPM, SIM, GIM и NDM в качестве праймеров были выбраны консервативные для каждого типа участки последовательностей, расположенные на концах генов. Металло-бета-лактамазы VIM и IMP типов имели низкую степень гомологии (см. раздел 5.2. данной работы), поэтому подобные участки найти не удалось. Для амплификации этих типов ферментов были выбраны праймеры, вырожденные по нескольким позициям. Из-за сильной разнородности карбапенемаз OXA-типа (степень гомологии между отдельными подгруппами не превышает 11,5 %), праймеры выбирались отдельно для амплификации генов каждой подгруппы карбапенемаз (OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58).

## 6.2. Оптимизация условий ПЦР

Для проведения реакции амплификации готовили реакционную смесь, состоящую из следующих компонентов: ДНК-матрица, прямой и обратный праймеры, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, фермент Taq-полимераза, буферный раствор, содержащий ионы магния  $Mg^{2+}$ . Для получения достаточного количества копий необходимого гена бета-лактамазы каждая ПЦР состояла из 30 циклов. Первым этапом каждого цикла был нагрев до  $94^{\circ}C$ , который предназначался для денатурации цепей ДНК (как исходных, так и вновь синтезированных). Во время следующего этапа происходил отжиг олигонуклеотидных праймеров на одноцепочечных ДНК. Далее следовало повышение температуры до  $72^{\circ}C$  – температуры, оптимальной для проявления ферментативной активности используемой термостабильной ДНК-полимеразы. Во время этого этапа происходил синтез новых комплементарных цепей ДНК. Для визуализации результатов амплификации использовали метод горизонтального гель-электрофореза, в котором молекулы ДНК разделялись в соответствии с их длиной. При этом более короткие фрагменты ДНК двигались быстрее, чем длинные.

### 6.2.1. Оптимизация концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов

В процессе работы нами была проведена оптимизация концентрации дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) в реакционной смеси. Наиболее часто используемой для амплификации генов концентрацией каждого нуклеотидтрифосфата является значение 200 мкМ [234]. С целью сокращения количества используемых реагентов исследовали концентрации дНТФ от 50 до 200 мкМ. Результаты анализа продуктов реакции амплификации гена металло-бета-лактамазы SPM-1 методом электрофореза представлены на рис. 20. При уменьшении концентрации дНТФ последовательно уменьшался и выход реакции. В качестве оптимальной для дальнейшей работы была выбрана концентрация дезоксинуклеотидтрифосфатов 100 мкМ,

так как при использовании этой концентрации выход ПЦР был сравним с выходом, получаемым при [дНТФ]=200 мкМ.

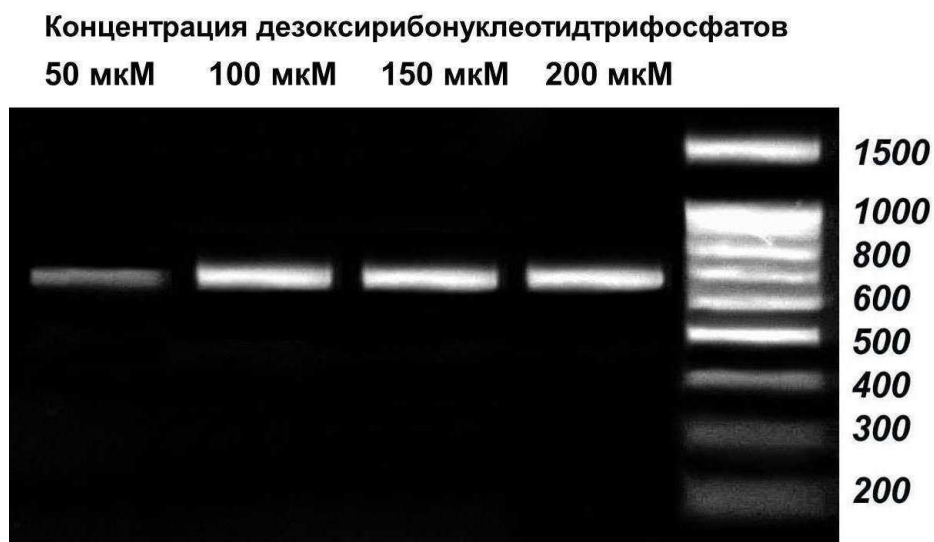


Рис. 20. Оптимизация концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в ПЦР на примере амплификации гена МБЛ SPM-1.

#### 6.2.2. Оптимизация концентрации ионов магния

На выход и специфичность полимеразной цепной реакции влияет концентрация ионов магния, которые образуют комплексы с праймерами, цепями ДНК и дезоксирибонуклеотидтрифосфатами, и эти комплексы являются субстратами для Taq полимеразы. Диапазон рабочих концентраций ионов магния в смеси для ПЦР составлял 0.5-5.0 мМ. Результаты амплификации анализировали методом электрофореза в агарозном геле. На рис. 21 представлены результаты амплификации гена IMP-2 при различной концентрации ионов магния. При повышении концентрации  $Mg^{2+}$  выход продукта реакции существенно увеличивался, однако при этом уменьшалась специфичность реакции. В качестве оптимальной была выбрана концентрация  $Mg^{2+}$  2 мМ. Аналогичные результаты были получены при амплификации других типов карбапенемаз.

#### 6.2.3. Оптимизация температуры отжига праймеров

В процессе работы нами была проведена оптимизация температуры отжига праймеров, так как проведение ПЦР при оптимальной температуре обеспечивает как специфичность, так и эффективность процесса синтеза ампликонов. Повышение температуры отжига, с одной стороны, увеличивает вероятность отжига праймеров на полностью комплементарных им сайтах, что повышает специфичность процесса, а с другой стороны, уменьшает выход целевого продукта. Превышение критического температурного предела -  $T_m$  праймеров приводит к невозможности отжига праймеров, а, соответственно, и проведения самой ПЦР. Поскольку для

нескольких групп МБЛ были подобраны вырожденные по 3-5 позициям праймеры, выбор оптимальной температуры отжига был особенно важен. Результаты оптимизации температуры

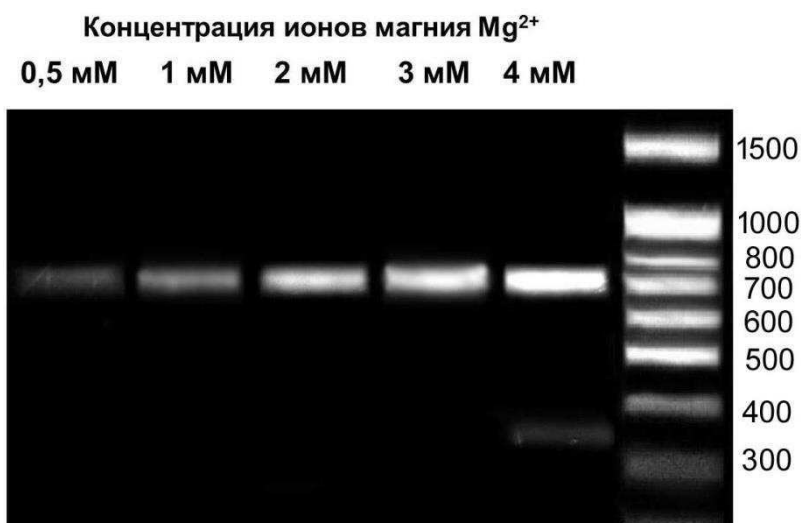


Рис. 21. Оптимизация концентрации магния в реакции амплификации гена карбапенемазы IMP-2. Концентрация дезоксирибонуклеотидтрифосфатов 100 мкМ.

отжига праймеров при амплификации различных карбапенемаз представлены на рисунке 22. При проведении стадии отжига при 72 градусах наблюдали резкое уменьшение концентрации ампликона. Амплификация при пониженных температурах отжига (ниже 60 °С) способствовала отжигу праймеров при наличии одного-двух или даже нескольких неспаренных азотистых оснований. При температуре отжига 55<sup>0</sup>С увеличивался выход амплифицируемых фрагментов ДНК, но наблюдалась потеря специфичности. Дальнейшее снижение температуры было невозможно вследствие высокой вероятности образования вторичных структур самих праймеров и их исключения из реакции. Анализируя результаты амплификации разных групп МБЛ, было установлено, что оптимальным являлся диапазон температур отжига 62-67<sup>0</sup>С. Для ОХА-карбапенемаз и бета-лактамазы КРС образования неспецифических продуктов не наблюдалось, но при температуре 67-70<sup>0</sup>С происходило резкое снижение выхода целевого продукта реакции. Для дальнейшей работы была выбрана температура отжига праймеров 62<sup>0</sup>С.

### 6.3. Мультиплексная ПЦР для одновременной амплификации генов восьми типов карбапенемаз в одной реакции

Для одновременной амплификации всех генов исследуемых карбапенемаз в одной реакции была оптимизирована ПЦР с использованием смеси специфических праймеров, ранее выбранных для амплификации МБЛ, ОХА-карбапенемаз и бета-лактамаз типа КРС.

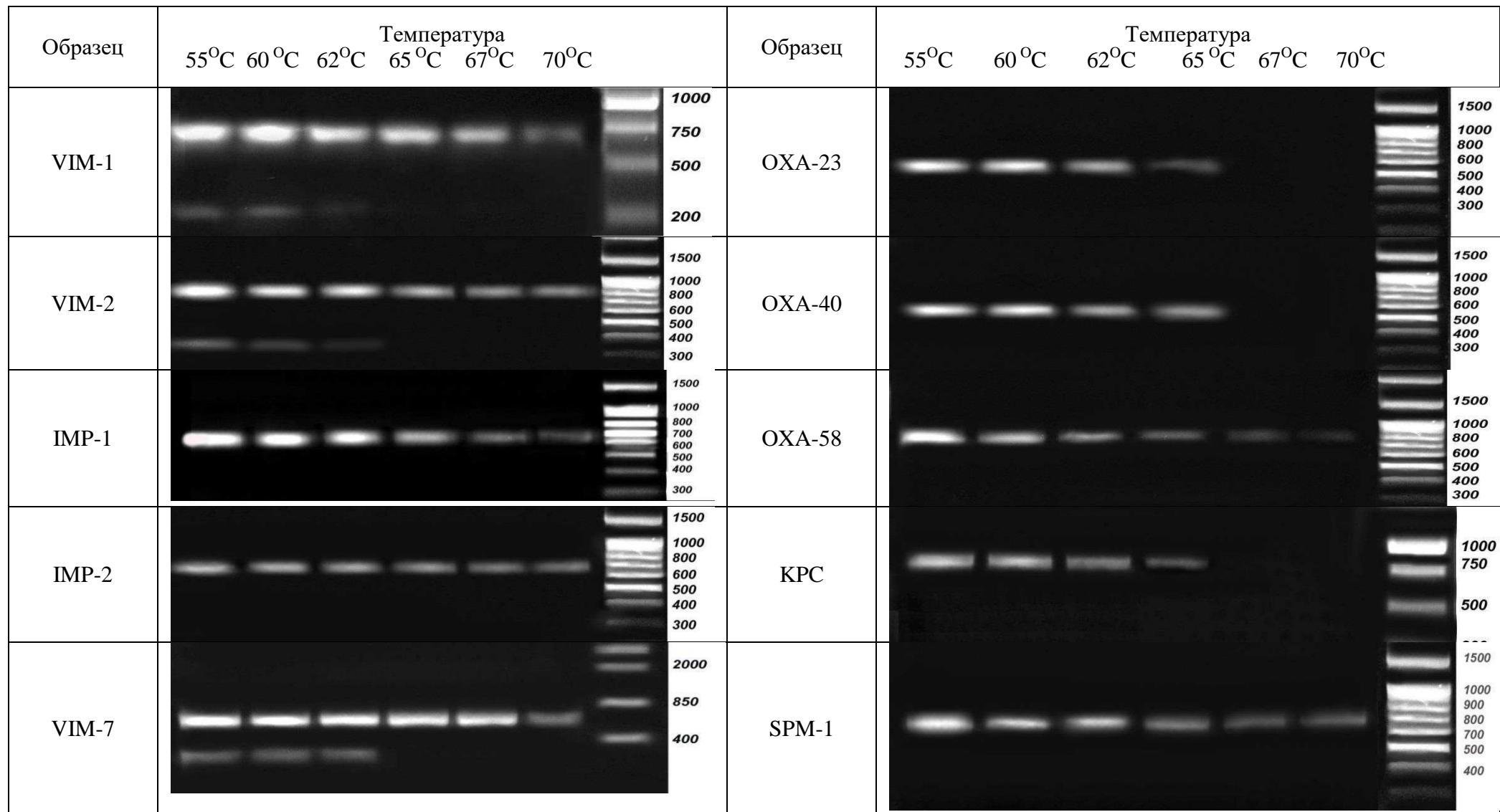


Рис. 22. Оптимизация температуры отжига праймеров при амплификации генов металло-бета-лактамаз методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразную цепную реакцию проводили при температуре 62<sup>0</sup>С, концентрации ионов магния 2 мМ и концентрации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов 100 мкМ. Результаты электрофореза продуктов мультиплексной ПЦР представлены на рис. 23. Из-за сильной разнородности генов карбапенемаз, их одновременная амплификация в процессе одной мультиплексной ПЦР проходила с очень низким выходом (особенно для некоторых МБЛ).

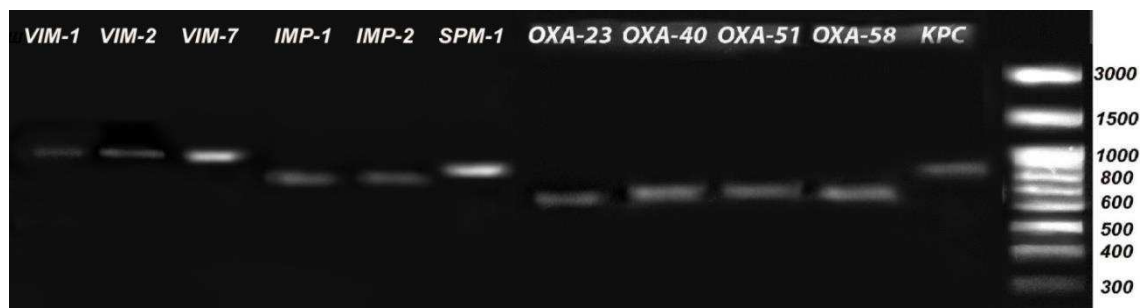


Рис. 23. Результаты мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации генов МБЛ, ОХА и КРС-карбапенемаз.

Поэтому далее проводили оптимизацию двух отдельных мультиплексных ПЦР для амплификации генов карбапенемаз: одной - со смесью праймеров для МБЛ и второй - со смесью праймеров для ОХА-карбапенемаз и бета-лактамаз типа КРС. В данном случае выход в мультиплексной ПЦР для совместной амплификации генов ОХА-карбапенемаз и бета-лактамаз группы КРС значительно увеличился, но результат амплификации генов МБЛ остался прежним.

Для исследования возможности одновременной амплификации различных типов генов карбапенемаз в одной мультиплексной реакции исследовали ДНК-полимеразу КАРА2G Fast. Данная полимеразы представляет собой генно-инженерную модификацию Таq полимеразы, которая характеризуется высокой процессивностью, повышенной скоростью наращивания цепи и хорошим выходом продуктов ПЦР. Как сообщается компанией-производителем, это позволяет сократить время реакции амплификации на 30-70%. Улучшенная процессивность и удельная активность КАРА2G Fast полимеразы позволяют повысить скорость амплификации с помощью ускорения стадии элонгации, а не за счёт искусственного сокращения протокола реакции. Амплификацию полноразмерных генов карбапенемаз исследуемых типов проводили по тому же протоколу с использованием 12 пар праймеров. В данных условиях для всех типов генов были получены ПЦР-продукты ожидаемой длины, однако для VIM-1, VIM-2, IMP-1 и IMP-2 на электрофореграмме отмечены дополнительные полосы, соответствующие неспецифическим продуктам реакции (рис. 24).

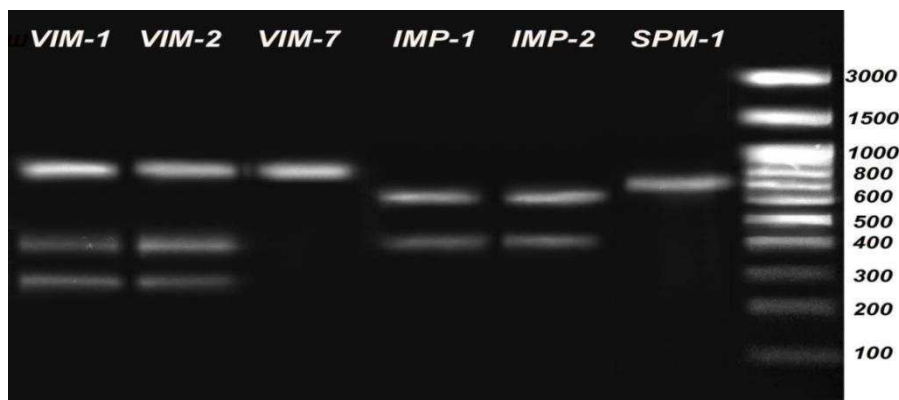


Рис. 24. Результаты электрофореза на агарозном геле продуктов мультиплексной ПЦР для амплификации генов металло-бета-лактамаз (МБЛ) шести типов.

Известно, что добавление ДМСО в реакционную смесь ПЦР позволяет уменьшить неспецифическое связывание нуклеиновых кислот, особенно при наличии устойчивых элементов вторичной структуры ДНК-матрицы или праймеров (шпилек, которые не расплетаются при тепловой денатурации и препятствуют отжигу праймеров на матрице). Однако добавление ДМСО в концентрациях 1% и 5% в смесь для мультиплексной ПЦР не дало ожидаемого улучшения специфичности амплификации.

Далее для повышения специфичности реакции мы исследовали использование методики «горячего старта» (hot start), которая позволяет избежать образования неспецифических димеров «праймер-матрица» на стадии подготовки смеси реагентов. Эти димеры затем могут амплифицироваться как побочные продукты. Существует несколько методов осуществления «горячего старта» для временной инактивации ДНК-полимеразы: физическая модификация (например, с помощью прослойки парафина) [235], связывание с аптамером [236] или специфическими антителами [237], а также использование дополнительных термолабильных веществ, блокирующих дезоксирибо-нуклеотидтрифосфаты [238] или праймеры [239, 240].

Для проведения мультиплексной ПЦР с «горячим стартом» был использован набор реагентов KAPA2G Fast HotStart, в котором используются антитела, инактивирующие ДНК-полимеразу. На начальном этапе ПЦР эти антитела денатурируют в течение первых 30 секунд при температуре 95<sup>0</sup>С. На рисунке 25 приведены результаты амплификации генов МБЛ типов VIM и IMP с использованием ДНК-полимераз KAPA2G Fast и KAPA2G Fast HotStart. Использование технологии «горячего старта» позволило значительно увеличить специфичность амплификации, синтез неспецифических ПЦР-продуктов практически не наблюдался.

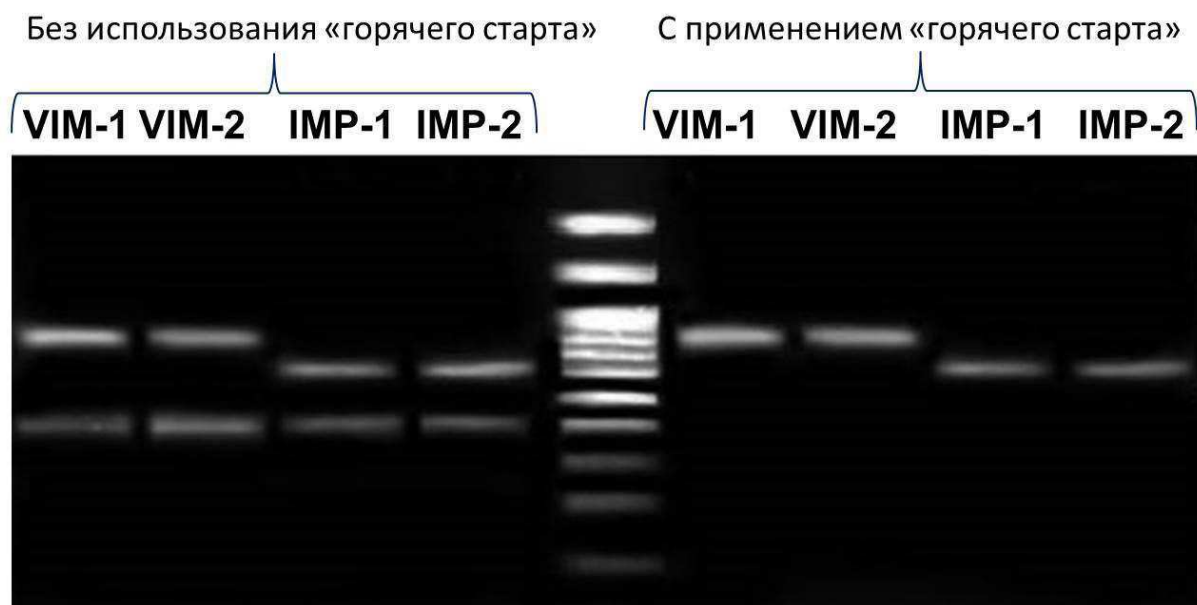


Рис. 25. Электрофореграмма продуктов амплификации генов МБЛ без использования технологии «горячего старта» (слева) и с использованием технологии «горячего старта» (справа).

Совместная амплификация генов карбапенемаз восьми типов и генов БЛРС

Разрабатываемый олигонуклеотидный микрочип для идентификации карбапенемаз планируется совместить с разработанным ранее микрочипом для идентификации бета-лактамаз TEM, SHV, CTX-M типов, относящихся к молекулярному классу А [241]. Для этого необходимо было исследовать возможность проведения одновременной амплификации трех типов генов бета-лактамаз молекулярного класса А и генов карбапенемаз молекулярных классов А, В, и D в одной мультиплексной ПЦР. В данном случае для реакции амплификации было использовано 18 пар праймеров. Структура и параметры праймеров для бета-лактамаз TEM, SHV, CTX-M типов приведены в таблице 8.

Результаты электрофореза продуктов ПЦР на 1% агарозном геле показаны на рис. 26. Гены исследуемых типов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А удалось амплифицировать с достаточным для дальнейшей гибридизации выходом (не менее 60 нг ДНК/мкл). При амплификации наблюдали образование неспецифических продуктов для некоторых типов генов, что связано с гетерогенностью использованных структур праймеров и нуклеиновых кислот. Исследование влияния неспецифических продуктов на специфичность гибридизационного анализа описано в разделе 10.4 данной работы.



Последовательности праймеров для амплификации генов бета-лактамаз TEM, SHV, CTX-M типов в одной мультиплексной ПЦР

Тип β-лактамазы	Последовательность праймера, 5'→3'		Длина праймера, нукл.	GC, %	T пл., °C	Длина ампликона, п.н.
	прямой	обратный				
TEM	прямой	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTC	24	37,5	63,0	851
	обратный	TTAATCAGTGAGGCACSTATCTC	23	43,5	63,1	
SHV	прямой	TTATATTCGCCTGTGTATTATCTC	24	33,3	60,0	855
	обратный	GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG	20	60,0	67,2	
CTX-M-1	прямой	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAG	24	41,7	66,0	869
	обратный	CCGTCGGTGACGATTTTAGCCG	22	59,1	68,4	
CTX-M-2	прямой	ATGATGACTCAGAGCATTCGCC	22	50,0	66,1	869
	обратный	CCGTGGGTACGATTTTCGCCG	22	59,1	68,9	
CTX-M-8	прямой	ATGATGAGACATCGCGTTAAGC	22	45,5	64,5	869
	обратный	CCGTCGGTGACGATTTTCGCG	21	61,9	68,4	
CTX-M-9	прямой	GGTGACAAAGAGAGTGCAACGG	22	54,5	66,8	868
	обратный	CCCTTCGGCGATGATTCTCGC	21	61,9	68,5	

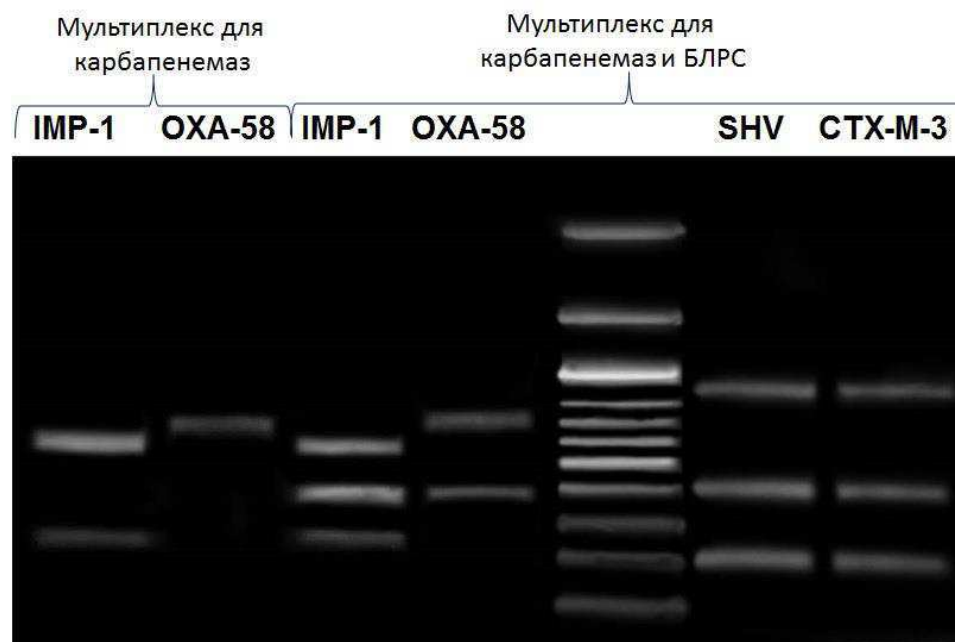


Рис. 26. Электрофореграмма продуктов амплификации двух генов карбапенемаз (IMP-1 и OXA-58), а также двух бета-лактамаз молекулярного класса А (SHV-5 и CTX-M-3) в процессе мультиплексной ПЦР.

#### 6.4. Введение биотина в качестве метки в гены амплифицируемых карбапенемаз в процессе мультиплексной ПЦР

Для введения биотиновой метки в анализируемую ДНК в процессе ПЦР использовали меченный биотином дезоксирибоуритрифосфат (dUTP), который должен включаться в цепь вместе с немечеными дезоксинуклеотидтрифосфатами. Мы использовали соотношение немеченого dTTP к меченному биотином dUTP 3:2 согласно [193]. На рисунке 27 представлены результаты амплификации генов металло-бета-лактамаз (а) и карбапенемаз группы ОХА и КРС (б) в присутствии dUTP-биотин. В целом, выход продукта при введении метки - биотина уменьшался, но был достаточен для проведения дальнейших исследований. В некоторых случаях не удалось избежать образования неспецифических продуктов реакции.

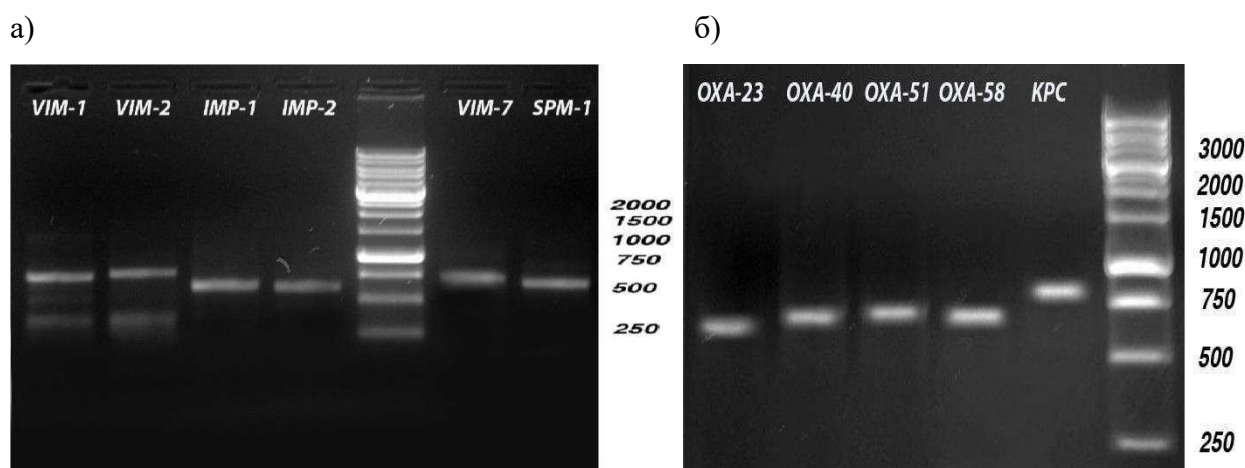


Рис. 27. Результат электрофореза продуктов амплификации генов МБЛ (а) и ОХА и КРС (б) методом мультиплексной ПЦР с включением метки - биотина.

#### 6.5. Оптимизация времени проведения мультиплексной ПЦР

Одной из важнейших задач при разработке методов экспресс-диагностики является сокращение общего времени анализа. Для этого была исследована возможность уменьшения длительности основных стадий мультиплексной ПЦР. Также определялось минимальное количество циклов, которое необходимо для получения количества меченой ДНК, достаточного для последующего гибридизационного анализа на микрочипе. На данном этапе считали, что для достоверной идентификации генов карбапенемаз будет необходимо 300 нг меченой ДНК. Так как реакция амплификации проводится в объеме 25 мкл, то концентрация получаемого ПЦР-продукта должна составлять не менее 20 нг/мкл. В процессе работы мы оптимизировали время стадий отжига праймеров и их элонгации, а также количество циклов амплификации.

В результате выполненной оптимизации необходимая концентрация меченой ДНК в ПЦР-смеси была достигнута при проведении амплификации по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 20 циклов амплификации (10 с – денатурация при

94°C, 20 с – отжиг праймеров при 65°C, 5 с – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (2 мин). При этом общая продолжительность мультиплексной ПЦР составила 40 минут.

Таким образом, в результате оптимизации условий реакции удалось добиться быстрой и специфичной амплификации восьми типов генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D и трех типов генов наиболее распространенных бета-лактамаз молекулярного класса А в одной мультиплексной ПЦР без метки, а также с одновременным включением биотина в качестве метки. Для генов всех протестированных ферментов (KPC-3, VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, TEM-1, SHV-5, CTX-M-3) воспроизводимо синтезируются специфические ПЦР-продукты с выходом не менее 40 – 80 нг/мкл, достаточным для осуществления последующего гибридизационного анализа.

Следует отметить, что из-за сильной разнородности карбапенемаз добиться достаточно высокого выхода меченых ампликонов для всех анализируемых генов в одной мультиплексной ПЦР удалось только с использованием высокопроцессивной ДНК-полимеразы KAPA 2G Fast, стоимость которой увеличивает стоимость проведения анализа. Эффективной амплификации генов всех карбапенемаз с использованием Taq ДНК-полимеразы удалось добиться при разделении ее на две отдельные мультиплексные реакции: в одной амплифицировали гены МБЛ и во второй – гены карбапенемаз OXA и KPC типов. Однако даже в этом случае при введении метки наблюдалось резкое снижение выхода продуктов реакции.

Далее в работе оптимизировали метод идентификации генов карбапенемаз на колориметрических микрочипах с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени.

## ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ

Одной из основных задач при разработке олигонуклеотидных микрочипов для идентификации генов является проведение молекулярного дизайна зондов. Сложность подобного дизайна состоит в необходимости подбора структур олигонуклеотидных зондов, которые будут эффективно и специфично гибридизоваться с ДНК-мишенью в одинаковых условиях (при одной температуре и в буфере фиксированного состава). В случае карбапенемаз выбор зондов для их идентификации осложняется низкой степенью гомологии нуклеотидных последовательностей внутри некоторых типов карбапенемаз.

### 7.1. Принцип проведения молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов и их тестирования

Задача идентификации генов всех карбапенемаз состоит в необходимости одновременного распознавания как разнородных генов (разных типов), так и близкородственных генов (разных подгрупп). Были выбраны последовательности зондов для идентификации восьми типов генов карбапенемаз (VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, SIM, KPC, OXA), наиболее гетерогенные типы дополнительно делили на подгруппы. Выбор зондов осложнялся низкой степенью гомологии нуклеотидных последовательностей внутри некоторых типов карбапенемаз. В качестве тип-специфических олигонуклеотидных зондов выбирали участки нуклеотидной последовательности, комплементарные гомологичным консервативным участкам генов данного типа. Принцип выбора тип-специфических последовательностей изображен на рисунке 28.

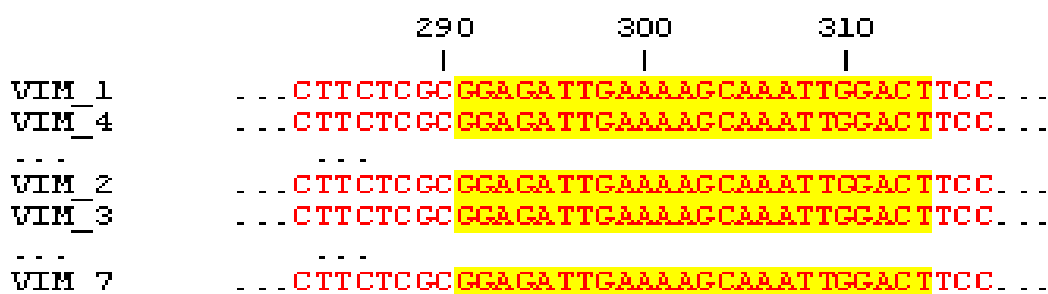


Рис. 28. Принцип молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз одного типа на примере карбапенемаз VIM типа.

Для распознавания подгрупп генов использовали участки нуклеотидных последовательностей, не содержащие мутаций внутри подгруппы и при этом наиболее сильно отличающие представителей данной подгруппы от других подгрупп и карбапенемаз других типов. Для идентификации подгрупп генов подбирали структуры зондов, соответствующие

нескольким участкам нуклеотидных последовательностей. Принцип выбора последовательностей для подгрупп-специфической идентификации показан на рисунке 29.

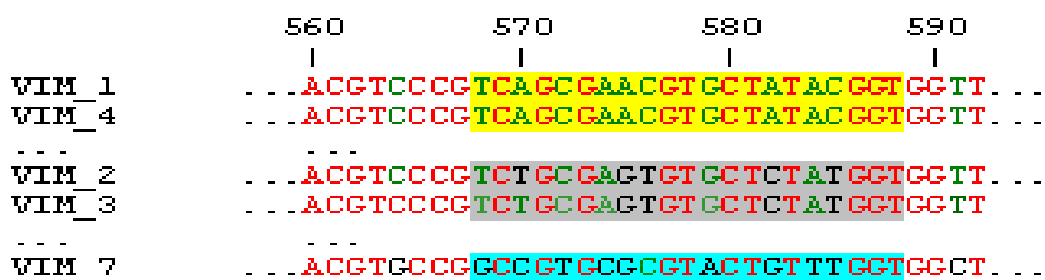


Рис. 29. Принцип молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов для идентификации различных подгрупп на примере карбапенемаз VIM типа.

Олигонуклеотидные зонды для идентификации групп и подгрупп карбапенемаз подбирали таким образом, чтобы они удовлетворяли следующим параметрам:

- Длина олигонуклеотидного зонда 17-27 нуклеотидных оснований
- Различие в температурах плавления для разных зондов - не более 5-10<sup>0</sup>С (температуры плавления подбирались в диапазоне 60-70<sup>0</sup>С)
- GC-состав 35-70%
- Минимальная вероятность образования вторичных структур («шпилек», димеров), которые затрудняют доступность зонда для ДНК-мишени, снижая тем самым эффективность гибридизации

Параметры олигонуклеотидов оценивали с помощью программы Oligo Analyzer 3.1, размещенной на сайте Integrated DNA Technologies. Оптимальным способом расчета температур плавления специфических олигонуклеотидных зондов считается использование метода с учетом «ближайшего нуклеотидного окружения» [242], а также концентрации ионов Na<sup>+</sup> в гибридизационном буфере. Расчеты проводили при следующих условиях: концентрация ионов Na<sup>+</sup> 50 мМ, концентрация олигонуклеотида 0.25 мкМ, температура, для которой рассчитывалась ΔG<sub>h</sub> реакции образования димеров и «шпилек» составляла 45<sup>0</sup>С (температура, при которой впоследствии проводилась гибридизация).

## 7.2. Подбор оптимальной длины спейсера олигонуклеотидных зондов

Для увеличения доступности иммобилизованного на носителе зонда для гибридизации с ДНК-мишенью обычно используют спейсер, который удлиняет зонды и снижает стерические затруднения при гибридизации. В работе была проведена оптимизация длины спейсера олигонуклеотидов. Результаты гибридизационного анализа карбапенемазы VIM-1 с использованием олигонуклеотидных зондов со спейсерами из остатков тимидина (от 0 до 24 оснований) представлены на рисунке 30.

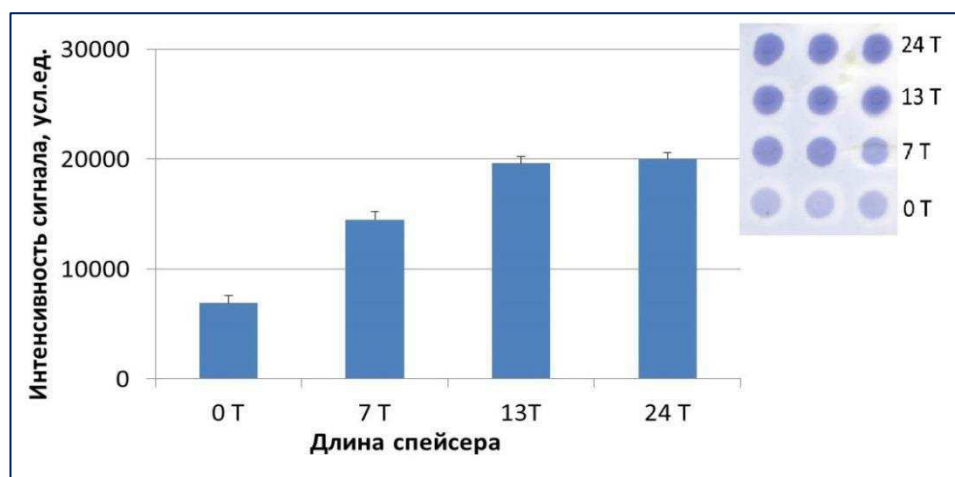


Рис. 30. Влияние длины спейсера на эффективность гибридизации ДНК-мишени с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами на примере гена карбапенемазы VIM-1.

Анализ результатов показал, что увеличение длины спейсера приводит к возрастанию интенсивности сигнала, однако использование ножки длиннее 13 олигонуклеотидов нецелесообразно, так как значительного увеличения сигнала при этом не происходит.

### 7.3. Подбор зондов для определения меченой ДНК

Для анализа меченой ДНК-мишени было выбрано по два тип-специфических зонда для каждого типа генов, комплементарных прямой и обратной цепи. Для идентификации каждой подгруппы карбапенемаз было выбрано по 2-4 варианта олигонуклеотидных зондов, различающихся по своим термодинамическим параметрам. В таблицах 9, 10 приведены последовательности подобранных контрольных олигонуклеотидов и олигонуклеотидных зондов для идентификации каждого типа и каждой подгруппы карбапенемаз.

Далее проводили исследование поведения выбранных олигонуклеотидных зондов в гибридизационном анализе с целью отбора зондов, обеспечивающих более высокий гибридизационный сигнал и низкий сигнал неспецифической гибридизации. Схема метода гибридизационного анализа на микрочипах представлена на рис. 31. На микрочип в определенном порядке иммобилизовались одноцепочечные олигонуклеотиды с уникальной последовательностью оснований, специфичной к различным участкам карбапенемаз каждого типа. ДНК-мишень получали амплификацией гена бета-лактамазы с одновременным введением метки-биотина, ее затем гибридизовали со специфическими олигонуклеотидами на поверхности микрочипа. Биотин выявляли конъюгатом стрептавидин-пероксидазы и колориметрической детекцией активности пероксидазы. Методика колориметрической детекции на основе пероксидазы хрена для ДНК-микрочипов на стекле и мембранных носителях была ранее разработана в нашей лаборатории [241]. Она основана на использовании хромогенных

субстратов и обеспечении условий, при которых окрашенный продукт ферментативной реакции адсорбируется на поверхности носителя в зоне реакции. В качестве субстрата использовали ТМБ в комбинации с декстран сульфатом (ДС), который обеспечивал адсорбцию окрашенного продукта окисления на поверхности мембранных носителей.

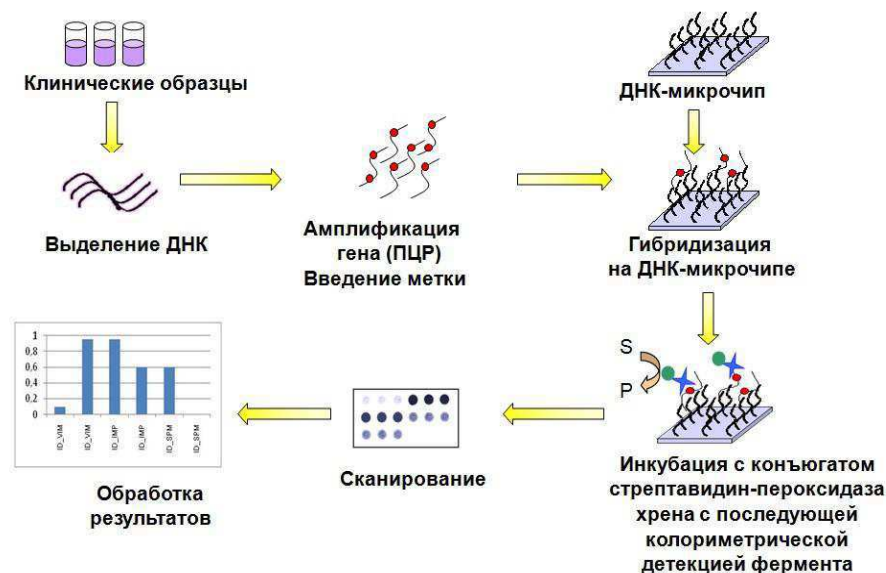


Рис. 31. Схема проведения гибридационного анализа меченой ДНК-мишени на олигонуклеотидных микрочипах.

Таблица 9

Последовательности контрольных олигонуклеотидов и олигонуклеотидных зондов для идентификации типов карбапенемаз

Название зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл	T пл., °C
Контроль иммобилизации	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA-Biotin	18	52
Пол. Контроль гибридизации	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGATTGGACGAGTCAGGAGC	19	60
Отр. Контроль гибридизации	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTAGACAGCCACTCATA	18	52
Зонд для типа VIM_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGAGATTGAAAAGCAAATTGGACT	24	67
Зонд для типа VIM_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTAGTCCAATTGCTTTTCAATCTCC	24	67
Зонд для типа IMP_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCG	23	65
Зонд для типа IMP_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCGAGAATTAAGCCACTCTATTCC	23	65
Зонд для типа NDM_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTGATCAAGGACAGCAAGG	20	67
Зонд для типа NDM_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTTGCTGTCCCTGATCAGG	20	67
Зонд для типа SPM_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGATGGGACCGTTGTCATTG	19	65
Зонд для типа SPM_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCAATGACAACGGTCCCATC	19	65
Зонд для типа SIM_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTTGGAATCTAAGTGACGCAA	23	70
Зонд для типа SIM_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTTGCGTCACTTAGATTGCCAAGG	23	70
Зонд для типа GIM_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCACACTGGGAAATGGGCTTATA	22	67
Зонд для типа GIM_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTATAAGCCCATTTCCCAGTGTG	22	67
Зонд для типа OXA_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCCACAAGTGGGCTGGTTGAC	20	69
Зонд для типа OXA_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTCAACCAGCCCACTTGTGG	20	67
Зонд для типа KPC_пр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTC	23	68
Зонд для типа KPC_обр.цепь	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGAATGAGCTGCACAGTGGGAAGC	23	68

## Последовательности олигонуклеотидных зондов для идентификации подгрупп карбапенемаз

Название	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл	T пл., °С
Зонд подгруппы VIM-1_67	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTTAGCCCATTCCGGGGAGCC	20	68
Зонд подгруппы VIM-1_568	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTTCAGCGAACGTGCTATACGG	20	64
Зонд подгруппы VIM-1_590	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTGTGCCGTCATGAGTTGT	21	63
Зонд подгруппы VIM-1_594	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTGGTTGTGCCGTTTAT	17	60
Зонд подгруппы VIM-2_67	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCTCGCTTTTTCCGTAGATTC	20	60
Зонд подгруппы VIM-2_568	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCTGCGAGTGTGCTCTATGG	20	64
Зонд подгруппы VIM-2_590	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTGTGCGATTTATGAGTTGT	21	60
Зонд подгруппы VIM-2_594	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTGCGATTTATGAGTTG	17	60
Зонд подгруппы VIM-7_130	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTTCGGCTGTACAAGATTGGCG	22	67
Зонд подгруппы VIM-7_184	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCTCGGTGACACGGTGTAC	18	66
Зонд подгруппы IMP-1_135	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGTGGGGCGTTGTTCCCTAAACATG	23	66
Зонд подгруппы IMP-1_367	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCTGCTTAAAAAAGACGGTAAGGTTT	25	63
Зонд подгруппы IMP-1_387	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGC	25	64
Зонд подгруппы IMP-1_497	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGCCTGAAAGGAAAATATTATTCGGTG	27	64
Зонд подгруппы IMP-2_206	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCCATTTACTGCTACAGATACTG	22	58
Зонд подгруппы IMP-2_264	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCAAAGGCACTATTTCCCTCAC	21	60
Зонд подгруппы IMP-2_264уд	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCAAAGGCACTATTTCCCTCACATTTT	26	64
Зонд подгруппы IMP-2_297	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCAGCACAGGGGGAATAGAGTG	21	64
Зонд подгруппы IMP-2_497	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTG	27	62
Зонд подгруппы IMP-5_505	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAATAGAGTTTGTTCGGTGGTT	22	65
Зонд подгруппы IMP-5_378	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAGACGGTAAAGTACAAGCTAA	21	63
Зонд подгруппы IMP-11_493	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGCTACCTAAAAATAAAATCTTATTTGG	27	65
Зонд подгруппы IMP-11_550	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGGTAATCTAGATGACGCAAATGTTG	25	67
Зонд подгруппы IMP-12_381	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTC	26	66
Зонд подгруппы IMP-12_300	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTACGGCTGGAATAGAGTGGCT	20	69
Зонд подгруппы OXA-23_225	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAAATACAGAATATGTGCCAGCCTCT	25	69
Зонд подгруппы OXA-23_321	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTAC	25	68
Зонд подгруппы OXA-23_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCA	25	68
Зонд подгруппы OXA-40_225	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAAATAAAGAATATGTCCCTGCATCA	25	66
Зонд подгруппы OXA-40_328	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGAACCTATCCTATGTGGGAGAAAAG	24	65
Зонд подгруппы OXA-40_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTACAAGAAGTTAATTTTGCCGATGA	23	60
Зонд подгруппы OXA-51_147	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCGAAGTACACACTACGGGTGTTTTAG	26	69
Зонд подгруппы OXA-51_408	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAGAATTGGCACGTCGTATTGGTC	25	68
Зонд подгруппы OXA-51_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAG	24	69
Зонд подгруппы OXA-48_524	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC	27	66
Зонд подгруппы OXA-48_552	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGGAGCGCAGCCAGCGTATTG	20	72
Зонд подгруппы OXA-58_206	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTGCACGCATTTAGACCGAGC	19	68
Зонд подгруппы OXA-58_408	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAGAATTGGCACGTCGTATTGGTC	23	69
Зонд подгруппы OXA-58_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCA	27	68

*Олигонуклеотидные зонды для идентификации типов карбапенемаз*

Результаты тестирования олигонуклеотидных зондов для идентификации основных групп карбапенемаз на микрочипах представлены на рисунке 32. Наблюдаемые абсолютные



интенсивности гибридизационных сигналов находились в диапазоне от 11000 до 21000 усл. ед. при уровне фонового сигнала около 1000 усл.ед. Перекрестной гибридизации ДНК отдельных типов карбапенемаз с олигонуклеотидами, специфичными для определения других типов, не наблюдали. Таким образом, все подобранные структуры олигонуклеотидов можно использовать для идентификации типов карбапенемаз методом гибридизационного анализа на микрочипах.

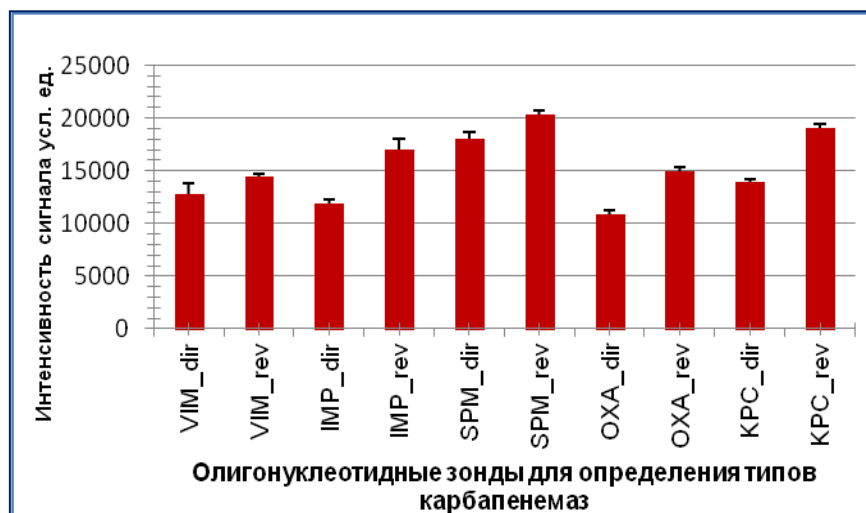


Рис. 32. Идентификация типов карбапенемаз методом гибридизационного анализа меченой ДНК-мишени на микрочипах.

#### *Олигонуклеотидные зонды для идентификации подгрупп карбапенемаз*

Для идентификации подгрупп было протестировано по 3-4 олигонуклеотидных зонда, выбранных на разных участках нуклеотидной последовательности генов. При анализе гибридизационных сигналов анализировали как интенсивность сигнала, так и специфичность идентификации. Для оценки уровня неспецифического связывания проверяли гибридизацию исследуемых зондов с ДНК-мишенью карбапенемаз других подгрупп. Результаты гибридизации различных зондов с меченой ДНК-мишенью приведены на рисунке 33 для карбапенемаз типов IMP и VIM.

Зонды для идентификации подгрупп VIM-1 и VIM-2 не давали перекрестной гибридизации с генами ферментов других подгрупп, поэтому выбор зондов для создания олигонуклеотидного микрочипа осуществлялся только на основе сравнения значений интенсивности гибридизационных сигналов с ДНК-мишенью того же типа. В результате для определения подгрупп VIM-1 и VIM-2 были выбраны по два зонда, обеспечивающие более высокие интенсивности сигналов гибридизации (VIM\_580 и VIM-594 для идентификации подгруппы VIM-1 (см. рис. 33 в ) и VIM\_568 и VIM\_580 для идентификации подгруппы VIM-2 (см. рис. 33 г)).

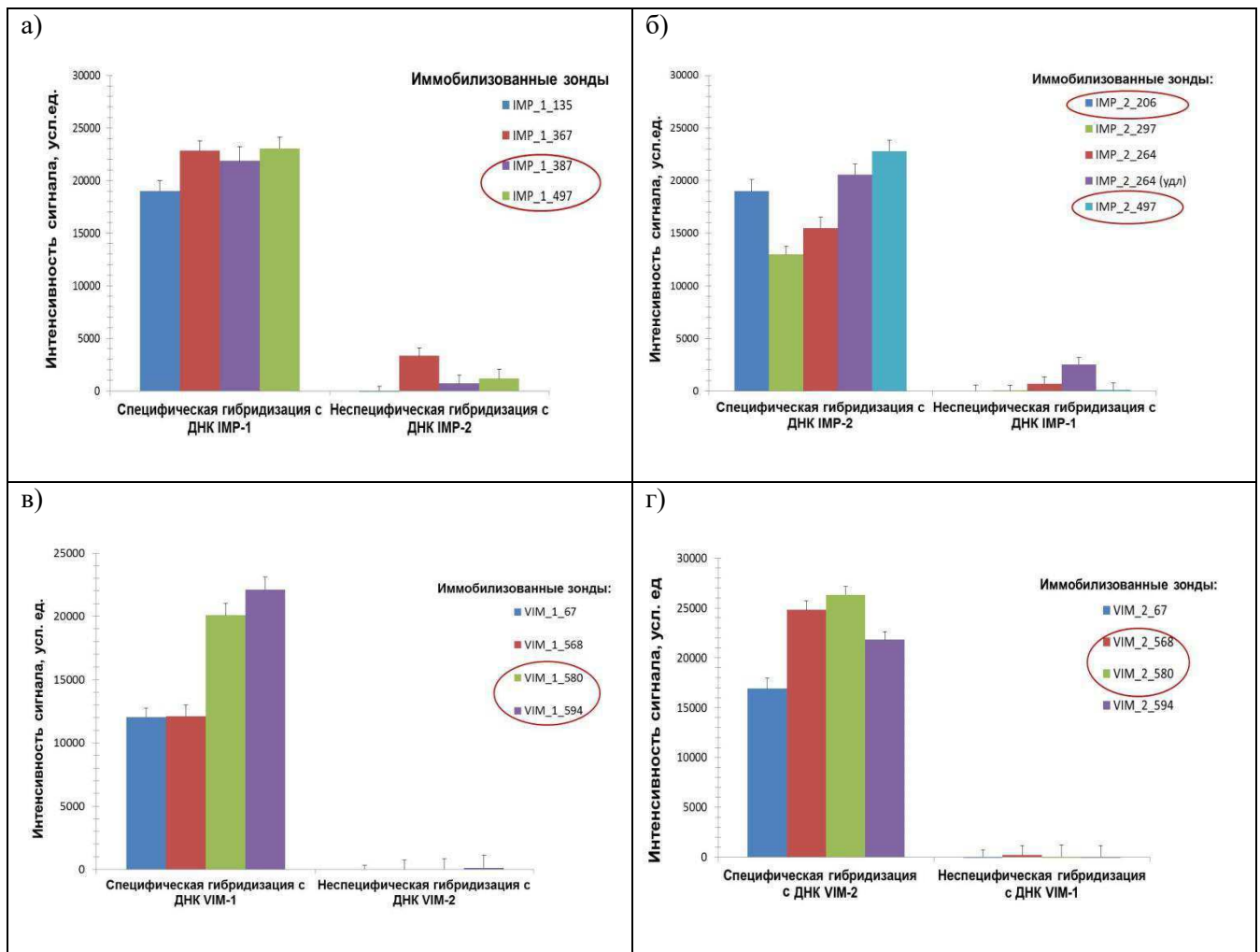


Рис. 33. Гибридизация зондов для типирования подгрупп карбапенемаз с меченой ДНК-мишенью на микрочипах на примере генов карбапенемаз а) IMP-1, б) IMP-2, в) VIM-1, г) VIM-2.

При тестировании зондов для подгрупповой идентификации карбапенемаз IMP типа, гибридационный сигнал неспецифического связывания был заметным, поэтому при выборе наиболее подходящих зондов для микрочипа основывались не только на значениях интенсивности аналитического сигнала, но и принимали во внимание наличие неспецифической гибридизации с ДНК-мишенью карбапенемаз других подгрупп.

Для сравнения эффективности гибридизации ДНК-мишени с различными зондами абсолютную интенсивность гибридационных сигналов нормировали на интенсивность фонового окрашивания вокруг ячейки микрочипа. Интенсивность сигнала неспецифического связывания также делили на интенсивность сигнала фона. Количественная обработка результатов гибридационного анализа с получением значений соотношения сигнал/фон описана в разделе 4.2.14 данной работы. Все значения полученных соотношений заносили в таблицу и строили диаграммы соотношений сигнал/фон для всех тестируемых зондов исследуемой подгруппы. В таблице 11 приведены полученные данные подгрупповой

идентификации карбапенемаз IMP типа. На рисунке 34 приведены результаты тестирования зондов для идентификации карбапенемаз подгруппы IMP-2, нормированные на интенсивность фона.

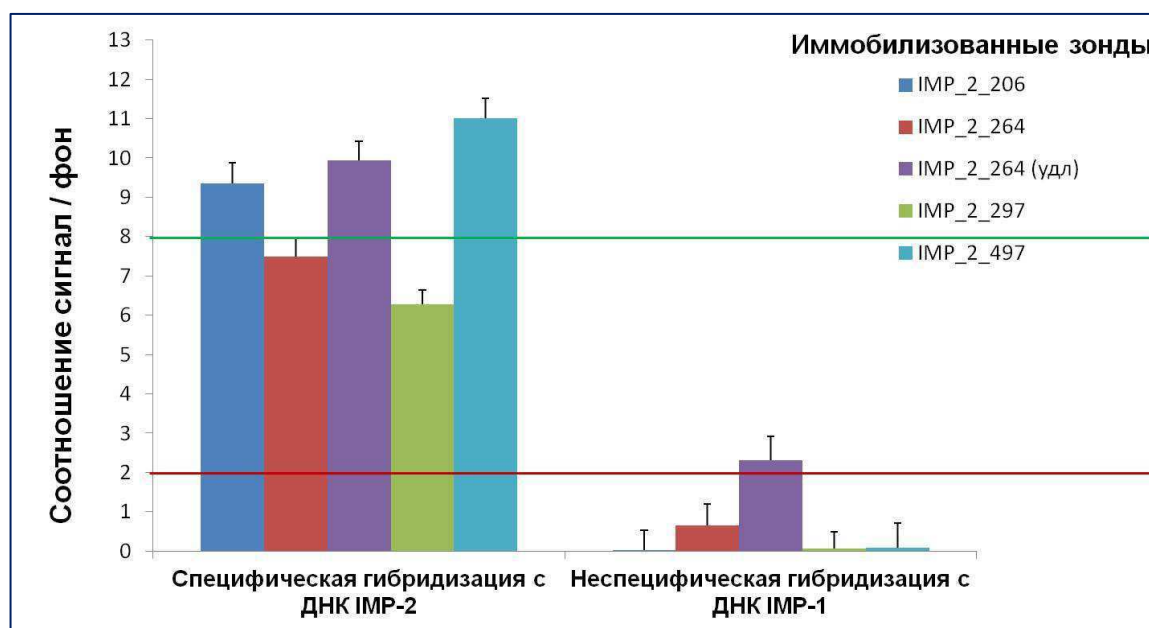


Рис. 34. Нормированные интенсивности гибридизационных сигналов взаимодействия «улавливающих» зондов для карбапенемазы IMP-2 со специфической ДНК-мишенью (IMP-2) и неспецифической ДНК-мишенью (IMP-1).

Критериями отбора зондов были: соотношение сигнал/фон  $> 8$  для специфической гибридизации (отмечен зелёной линией на рисунке 34) и соотношение сигнал/фон  $< 2$  для сигнала с ДНК-мишенью карбапенемаз других подгрупп (отмечено красной линией на рисунке 34). Для подгруппы IMP-1 первому критерию удовлетворяют 3 из 4 исследуемых зондов (см. таблицу 11), для подгруппы IMP-2 – 3 из 5 зондов характеризуются высокой интенсивностью сигнала по данному критерию (см. рис.34 и табл. 11). При учете второго критерия был отвергнут зонд IMP\_1\_367, так как при высоком сигнале специфической гибридизации специфичность идентификации была низкой вследствие относительно высокого сигнала с другими ДНК-мишенями (соотношение сигнал/фон = 2,2). Для включения в олигонуклеотидный микрочип был выбран другой зонд (IMP\_1\_497), интенсивность специфического сигнала которого была немного меньше, чем у IMP\_1\_367, но при этом неспецифическая гибридизация с другими ДНК-мишенями практически отсутствовала (см. таблицу 11).

При исследовании олигонуклеотидных зондов для идентификации подгруппы IMP-2, критерию высокой интенсивности сигнала удовлетворяли зонды IMP\_2\_206, IMP\_2\_264удл и IMP\_2\_497, однако для зонда IMP\_2\_264удл наблюдался высокий уровень неспецифического связывания с ДНК фермента IMP-1 (соотношение сигнал/фон  $> 2$ ). Поэтому для нанесения на

микрочип были выбраны зонды IMP\_2\_206 и IMP\_2\_497, дающие интенсивный и высокоспецифичный гибридизационный сигнал (см. рис.34 и табл. 11).

Таблица 11

Название зонда	Отношение сигнал/фон для специфической гибридизации со своей ДНК	Отношение сигнал/фон для неспецифической гибридизации с «чужой» ДНК
Идентификация подгруппы IMP-1		
IMP_1_135	9,0	0
IMP_1_367	<b>10,9</b>	<b>2,2</b>
IMP_1_387	<b>11,0</b>	0,8
IMP_1_497	<b>10,4</b>	0,5
Идентификация подгруппы IMP-2		
IMP_2_206	<b>9,4</b>	0,0
IMP_2_297	6,3	0,1
IMP_2_264	7,5	0,6
IMP_2_264удл	<b>10,0</b>	<b>2,3</b>
IMP_2_497	<b>11,0</b>	0,1

Для некоторых зондов была проварьирована их длина (для подгрупп IMP-2, ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58). Результат оптимизации длины зонда показан на рисунке 34 на примере идентификации подгруппы карбапенемаз IMP\_2. При тестировании зондов наблюдали следующую закономерность: при удлинении зонда (IMP\_2\_264 (удл) на рисунках 33, 34) интенсивность сигнала возрастала на 30%, однако при этом падала специфичность идентификации подгруппы ферментов. В результате оба зонда не были включены в микрочип, поскольку зонд IMP\_2\_264 не удовлетворяет критерию высокого аналитического сигнала, а IMP\_2\_264 (удл) не соответствует требованию высокой специфичности идентификации подгруппы карбапенемаз.

Влияние удлинения зондов на эффективность их гибридизации с ДНК-мишенью также было исследовано на зондах для идентификации подгрупп ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51 и ОХА-58, дающих гибридизационные сигналы низкой интенсивности. Однако для этих зондов удлинение не привело к значительному увеличению аналитических сигналов гибридизации (данные не приводятся) и для создания микрочипа подбирались другие зонды.

В результате молекулярного дизайна и отбора зондов для идентификации каждой подгруппы карбапенемаз были выбраны по два олигонуклеотидных зонда, обеспечивающих как высокий сигнал гибридизации, так и низкий сигнал перекрестной гибридизации с ДНК других

подгрупп данного типа и других типов карбапенемаз. Последовательности олигонуклеотидных зондов, выбранных для ДНК-микрочипа, представлены в таблице 12.

Таблица 12

Последовательности олигонуклеотидов для идентификации подгрупп карбапенемаз

Название	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл.	T пл., °C
Зонд подгруппы VIM-1_590	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTTGTGCCGTTTCATGAGTTGT	21	63
Зонд подгруппы VIM-1_594	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTGGTTGTGCCGTTTCAT	17	60
Зонд подгруппы VIM-2_568	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTGCGAGTGTGCTCTATGG	20	64
Зонд подгруппы VIM-2_590	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTTGTGCGATTTATGAGTTGT	21	60
Зонд подгруппы VIM-7_130	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTTTCGGCTGTACAAGATTGGCG	22	67
Зонд подгруппы VIM-7_184	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTCGGTGACACGGTGTAC	18	66
Зонд подгруппы IMP-1_387	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGC	25	64
Зонд подгруппы IMP-1_497	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCCTGAAAGGAAAATATTATTCGGTG	27	64
Зонд подгруппы IMP-2_206	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCCATTTACTGCTACAGATACTG	22	58
Зонд подгруппы IMP-2_497	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTG	27	62
Зонд подгруппы IMP-5_505	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTAATAGAGTTTTGTTCGGTGGTT	22	65
Зонд подгруппы IMP-5_378	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTAGACGGTAAAGTACAAGCTAA	21	63
Зонд подгруппы IMP-11_493	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGCTACCTAAAAATAAAATCTTATTTGG	28	65
Зонд подгруппы IMP-11_550	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGTAATCTAGATGACGCAAATGTTG	25	67
Зонд подгруппы IMP-12_381	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTC	26	66
Зонд подгруппы IMP-12_300	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTACGGCTGGAATAGAGTGGCT	20	69
Зонд подгруппы OXA-23_321	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTAC	25	68
Зонд подгруппы OXA-23_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCA	25	68
Зонд подгруппы OXA-40_225	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTAAATAAAGAATATGTCCCTGCATCA	25	66
Зонд подгруппы OXA-40_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTACAAGAAGTTAATTTTGCCGATGA	23	60
Зонд подгруппы OXA-51_147	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCGAAGTACACACTACGGGTGTTTTAG	26	69
Зонд подгруппы OXA-51_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAG	24	69
Зонд подгруппы OXA-48_524	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC	27	66
Зонд подгруппы OXA-48_552	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGAGCGCAGCCAGCGTATTG	20	72
Зонд подгруппы OXA-58_206	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCACGCATTTAGACCGAGC	19	68
Зонд подгруппы OXA-58_540	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCA	27	68

#### 7.4. Выбор последовательностей «улавливающих» и «детектирующих» зондов для определения немеченой ДНК

Для детекции немеченой ДНК была использована схема сэндвич-анализа, в которой используются два типа зондов. Первые – «улавливающие» иммобилизуются на поверхности микрочипа, вторые – «детектирующие» содержат метку и гибридизуются с ДНК-мишенью в участке, отличном от участка гибридизации первого зонда.

В качестве «улавливающих» олигонуклеотидных зондов, которые иммобилизовались на микрочипе, были использованы последовательности, выбранные для проведения гибридизационного анализа меченой ДНК (раздел 7.1). Задачей данного раздела работы был выбор последовательностей «детектирующих» зондов и анализ влияния взаимного

расположения двух зондов относительно ДНК-мишени на эффективность гибридизации. Последовательность «детектирующих» зондов предполагали выбирать на участках последовательности генов, высоко гомологичных для каждого типа карбапенемаз. То есть детектирующие зонды выбирали общие для каждого типа карбапенемаз, без разделения на подгруппы. Таким образом, специфичность идентификации подгрупп отдельных типов карбапенемаз обеспечивается специфичностью иммобилизованных «улавливающих» зондов.

Взаимное расположение зондов друг относительно друга и относительно ДНК-мишени может влиять на эффективность гибридизации. Для оптимизации сэндвич-схемы анализа были исследованы следующие параметры:

- Взаимное расположение двух зондов относительно друг друга (величина расстояния области мишени, расположенной между зондами)
- Положение «улавливающего» зонда на ДНК-мишени
- Тип улавливаемой цепи (прямая или обратная).

Схема проведения гибридизационного анализа в сэндвич-варианте состояла из следующих стадий: на микрочипе иммобилизовали набор «улавливающих» специфических олигонуклеотидных зондов, специфическую ДНК-мишень карбапенемазы получали методом ПЦР, проводили гибридизацию немеченой ДНК-мишени с иммобилизованными на поверхности микрочипа «улавливающими» олигонуклеотидами, затем проводили гибридизацию с «детектирующими» олигонуклеотидными зондами, меченными биотином. Биотин в дуплексах ДНК на поверхности микрочипа выявляли с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена с последующей колориметрической детекцией фермента (рис. 35).

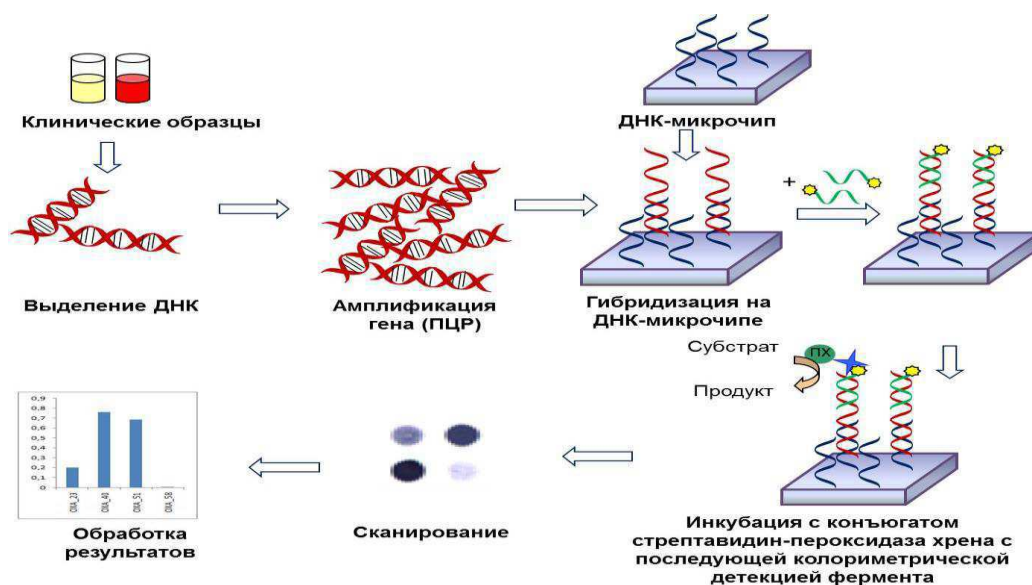


Рис. 35. Схема проведения гибридизационного анализа в сэндвич-варианте на олигонуклеотидных микрочипах.

#### 7.4.1. Влияние взаимного расположения «улавливающего» и «детектирующего» олигонуклеотидных зондов

Схематично возможное расположение «улавливающего» и «детектирующего» зондов относительно друг друга и ДНК-мишени изображено на рисунке 36.

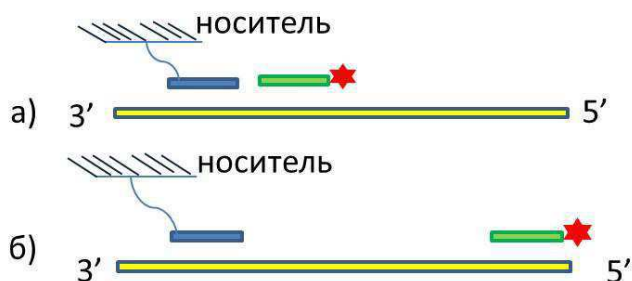


Рис. 36. Расположение «улавливающего» и «детектирующего» зондов на ДНК-мишени близко (а) и далеко (б) друг от друга.

Для каждого типа металло-бета-лактамаз и карбапенемаз ОХА-типа были выбраны по 2-4 варианта «улавливающих» и «детектирующих» зондов, расположенных на расстоянии от 0 н. до 500 н. друг от друга. Всего было исследовано 96 вариантов сочетаний зондов с различным расстоянием. Последовательности исследованных «улавливающих» зондов приведены в таблице 13, последовательности «детектирующих» зондов, содержащих биотин на 3'-конце, представлены в таблице 14. Биотин был ковалентно присоединен к 3'-концу зонда с использованием спейсера из 5 остатков тимидина для увеличения его доступности для конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена.

Поведение подобранных олигонуклеотидных зондов было исследовано в гибридационном анализе. Результаты гибридационного анализа с использованием зондов, расположенных на различном расстоянии друг от друга, приведены на рисунке 37. Средние значения интенсивности сигналов гибридизации, полученные при тестировании девяти генов карбапенемаз представлены в таблице 15.

Анализ результатов гибридационного анализа с использованием немеченой ДНК-мишени показал, что при близком положении зондов (расстояние между ними не более 100 н.) наблюдаемая интенсивность сигнала была выше, чем в случае удалённого расположения зондов. Последовательное расположение зондов прямо друг за другом (расстояние 0 н.) приводило к значительному увеличению гибридационного сигнала практически для всех исследованных зондов.

Последовательности «улавливающих» олигонуклеотидных зондов для идентификации подгрупп карбапенемаз

Название зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл	GC состав, %	T пл., °C	ΔGпл, ккал/моль*	ΔGд, ккал/моль**
VIM-1_67	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TTAGCCCATTCCGGGGAGCC	20	65,0	72,8	-2,91	-9,75
VIM-1_568	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TCAGCGAACGTGCTATACGG	20	55,0	68,3	-2,95	-6,30
VIM-1_584	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> ACGGTGGTTGTGCCGTTCA	19	57,9	71,3	-3,17	-8,02
VIM-1_590	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTTGTGCCGTTTCATGATTGT	21	47,6	67,9	0,02	-8,53
VIM-1_594	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTGGTTGTGCCGTTTCAT	17	52,9	64,4	-0,59	-3,61
VIM-2_67	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CTCGCTTTTTCCGTTAGATTC	20	45,0	62,9	0,01	-3,61
VIM-2_568	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TCTGCGAGTGTGCTCTATGG	20	55,0	67,9	-1,56	-3,61
VIM-2_584	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> ATGGTGGTTGTGCGATTTA	19	42,1	64,2	1,44	-3,61
VIM-2_590	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTTGTGCGATTTATGAGTTGT	21	38,1	63,7	0,49	-3,61
VIM-2_594	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTGCGATTTATGAGTTG	17	41,2	56,9	0,49	-3,61
VIM-7_130	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTTTCGGCTGTACAAGATTGGCG	22	54,5	70,0	-0,89	-7,55
VIM-7_184	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CTCGGTGACACGGTGTAC	18	61,1	65,8	-0,79	-4,64
VIM-7_568	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GCCGTGCGCGTACTGTTTG	19	63,2	70,7	-1,08	-10,36
IMP-1_135	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GTGGGGCGTTGTTCTAAACATG	23	52,2	70,2	-1,59	-5,38
IMP-1_367	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CTGCTAAAAAAGACGGTAAGTTTC	25	40,0	66,8	-1,01	-4,85
IMP-1_387	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGC	25	40,0	67,8	-1,18	-5,36
IMP-1_497	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TGCCCTGAAAGGAAAATATTATTCGGTG	27	37,0	68,5	-2,57	-7,80
IMP-2_206	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CCATTTACTGCTACAGATACTG	22	40,9	62,5	-1,63	-3,55
IMP-2_264	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TCAAAGGCACTATTTCTCACATTTTC	26	38,5	68,2	-0,74	-4,67
IMP-2_297	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CAGCACAGGGGGAATAGAGTG	21	57,1	68,4	-0,74	-3,30
IMP-2_497	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> TACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTG	27	29,6	65,7	-2,18	-13,14
IMP-5_505	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AATAGAGTTTTGTTCCGGTGGTT	22	36,4	65,0	1,33	-3,61
IMP-5_378	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AGACGGTAAAGTACAAGCTAA	21	38,1	63,2	-0,75	-6,34
IMP-11_493	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GGCTACCTAAAAATAAAATCTTATTTGG	28	28,6	64,5	-2,82	-8,27
IMP-11_550	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GGTAATCTAGATGACGCAAATGTTG	25	40,0	66,5	-0,30	-10,26
IMP-12_381	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GACAATAAGGTACAAGCTAAACACTC	26	38,5	66,2	0,30	-6,24
IMP-12_300	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> ACGGCTGGAATAGAGTGGCT	20	55,0	69,7	-0,52	-3,60
OXA-23_225	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AAATACAGAATATGTGCCAGCCTCT	25	40,0	68,8	-1,90	-3,91
OXA-23_321	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTAC	24	45,8	68,0	-0,48	-3,89
OXA-23_540	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCA	25	40,0	67,8	-0,13	-5,36
OXA-40_225	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AAATAAAGAATATGTCCCTGCATCA	25	32,0	65,6	-0,77	-7,05
OXA-40_540	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> ACAAGAAGTTAATTTTGCCGATGA	24	33,3	66,2	-0,45	-5,36
OXA-48_524	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC	27	37,0	66,3	-0,19	-6,30
OXA-48_552	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GGAGCGCAGCCAGCGTATTG	20	65,0	72,2	-3,93	-9,89
OXA-51_147	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CGAAGTACACACTACGGGTGTTTATG	26	46,9	69,2	-2,95	-4,64
OXA-51_408	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CAAGATTTAGCTCGTCTATTGGAC	25	44,0	67,7	-0,56	-6,34
OXA-51_540	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> CAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAG	24	45,8	68,6	-2,41	-5,09
OXA-51_587	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GCCAAAAGTCCAAGATGAAG	21	47,6	65,8	0,34	-3,14
OXA-58_206	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> GCACGCATTTAGACCGAGC	19	57,9	67,7	-0,90	-3,61
OXA-58_408	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AGAATTGGCACGTCGTATTGGTC	23	47,8	69,4	0,59	-6,30
OXA-58_540	NH <sub>2</sub> -(T) <sub>13</sub> AGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCA	27	33,3	67,8	0,20	-4,85







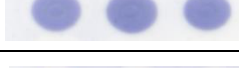
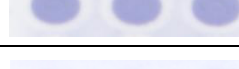

Последовательности меченных биотином «детектирующих» олигонуклеотидных зондов для идентификации карбапенемаз разных типов

Название зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл	GC состав, %	T <sub>м</sub> <sup>***</sup> , °C	ΔG <sub>ш</sub> <sup>*</sup> , ккал/моль	ΔG <sub>д</sub> <sup>**</sup> , ккал/моль
Det_VIM_233	GCTGTATCAATCAAAAAGCAACTCATCTTTTT-Bt	26	38,5	63,8	-1,08	-4,74
Det_VIM_384	GGCTGGGGTGGCAACGTACTTTTT-Bt	18	66,7	65,9	-1,64	-6,30
Det_VIM_519	CTATCCTGGTGCTGCGCATTCTTTTT-Bt	21	57,1	65,2	-0,7	-13,80
Det_VIM_603	TGAGTTGTCAAGCACGTCTGCGTTTTT-Bt	22	54,5	67,2	-1,71	-6,30
VIM_2_b_594	GTGCGATTTATGAGTTGTCTTTTT-Bt	19	42,1	55,9	0,49	-3,61
Det_VIM_240_rev	CCACGCTGTATCAATCAAAAAGTTTTT-Bt	21	42,9	63,9	0,30	-3,61
Det_IMP_332Bt	CTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACSTTTTT-Bt	28	42,9	66,1	0,34	-10,00
Det_IMP_477Bt	AGATAACGTAGTGGTTTGGTTGCTGTTTTT-Bt	26	46,2	67,4	-0,97	-6,30
Det_IMP_524Bt	GGTTGTTTTGTTAAACCGTACGGTCTTTTTT-Bt	26	42,3	66,4	-1,90	-19,69
Det_IMP_190_rev	GCCGTAAATGGAGTGTCAATTAGTTTTT-Bt	23	43,5	65,9	0,24	-5,36
IMP_2_445Bt	GTCTGGTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGTTTTT-Bt	30	40,0	67,9	-3,87	-9,26
Det_SPM_371	GACGTGGTCGAGCGATCTGACTTTTT-Bt	21	61,9	66,2	-2,10	-6,76
Det_OXA_23_238	ACATTTAAAATGTTGAATGCCCTGATCTTTTT-Bt	27	33,3	64,2	-2,37	-8,74
Det_OXA_23_249	GTTGAATGCCCTGATCGGATTGTTTTT-Bt	22	50,0	63,7	-0,97	-4,62
Det_OXA-23_568	CATACACAGCTTCCATTTAGTGATTTTTT-Bt	23	39,1	60,9	-1,91	-6,34
Det_OXA-40_555	CCTTGCACATAACCGATTACSTTTTTT-Bt	22	45,5	62,5	0,39	-7,05
Det_OXA-51_598	TGCAATCCATGTTATTCATAGAAGCTTTTTT-Bt	25	36,0	62,5	-1,55	-7,05
Det_OXA-58_589	CTGAAGTTCAGCAACAAGTGAAAGAGTTTTT-Bt	26	42,3	65,0	-1,18	-7,07

\* ΔG<sub>ш</sub> – свободная энергия Гиббса реакции образования шпилек (ккал/моль)

\*\* ΔG<sub>д</sub> – свободная энергия Гиббса реакции димеризации зонда (ккал/моль)

Таблица 15

Промежуток между зондами, нукл.	Средняя интенсивность сигнала, усл.ед.	Диапазон интенсивности сигнала, усл.ед.	Изображение точек на ДНК-микрочипе
0	34409	20000-42000	
6-70	28900	22000-33000	
70-100	27856	22000-32000	
100-200	23619	17000-28000	
200-300	21461	15000-25000	
300-400	14602	12000-17000	
400-500	8612	8000-10000	

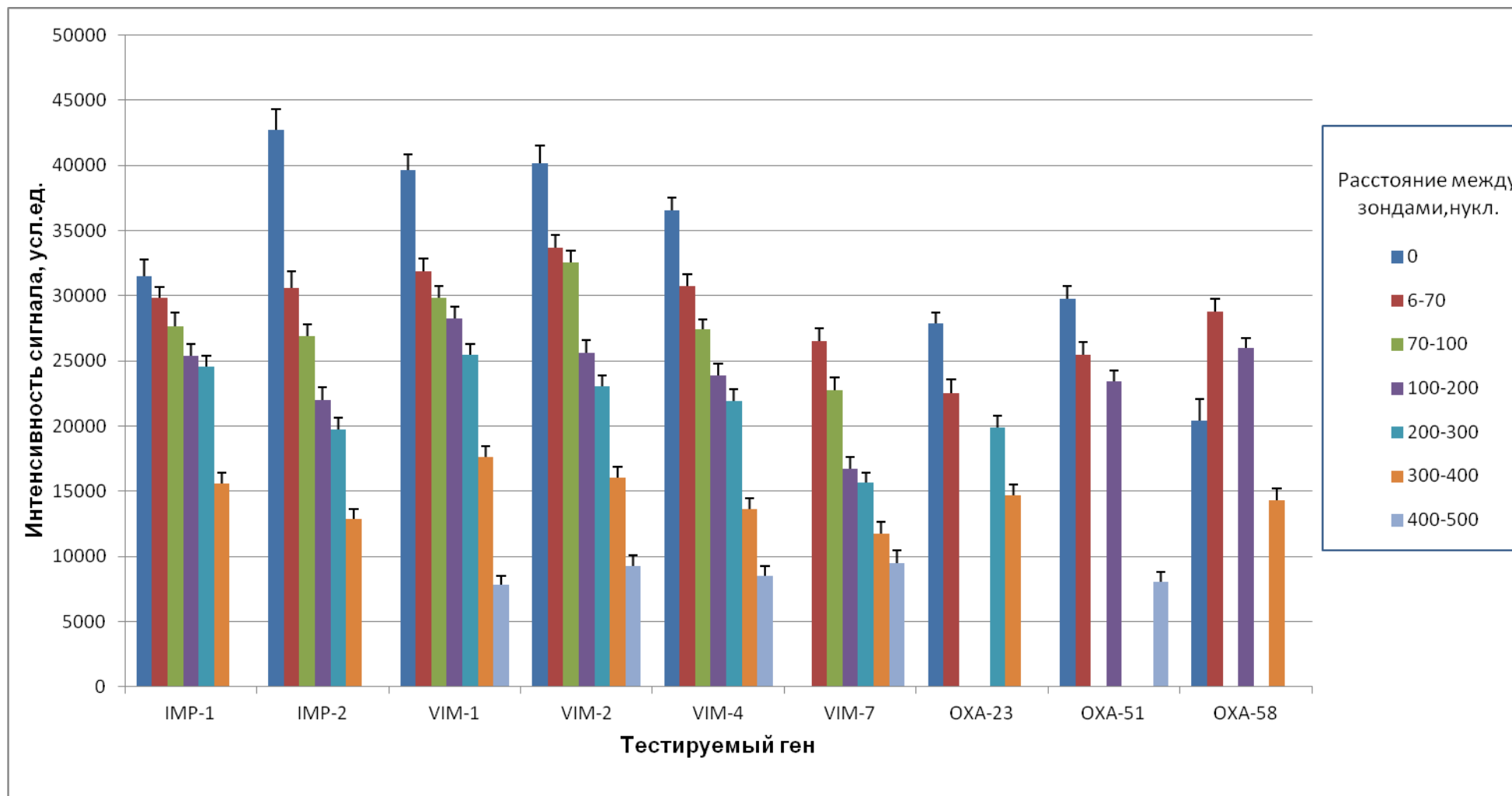


Рис 37. Зависимость интенсивности гибридных сигналов от расстояния между «улавливающим» и «детектирующим» олигонуклеотидами для карбапенемаз разных типов.

Критерием выбора зондов для включения в микрочип являлись высокий гибридационный сигнал и низкий уровень неспецифической гибридизации. Для сравнения результатов экспериментов, полученных на разных микрочипах, абсолютные значения сигналов нормировали на интенсивность фонового сигнала (рис. 38Б).

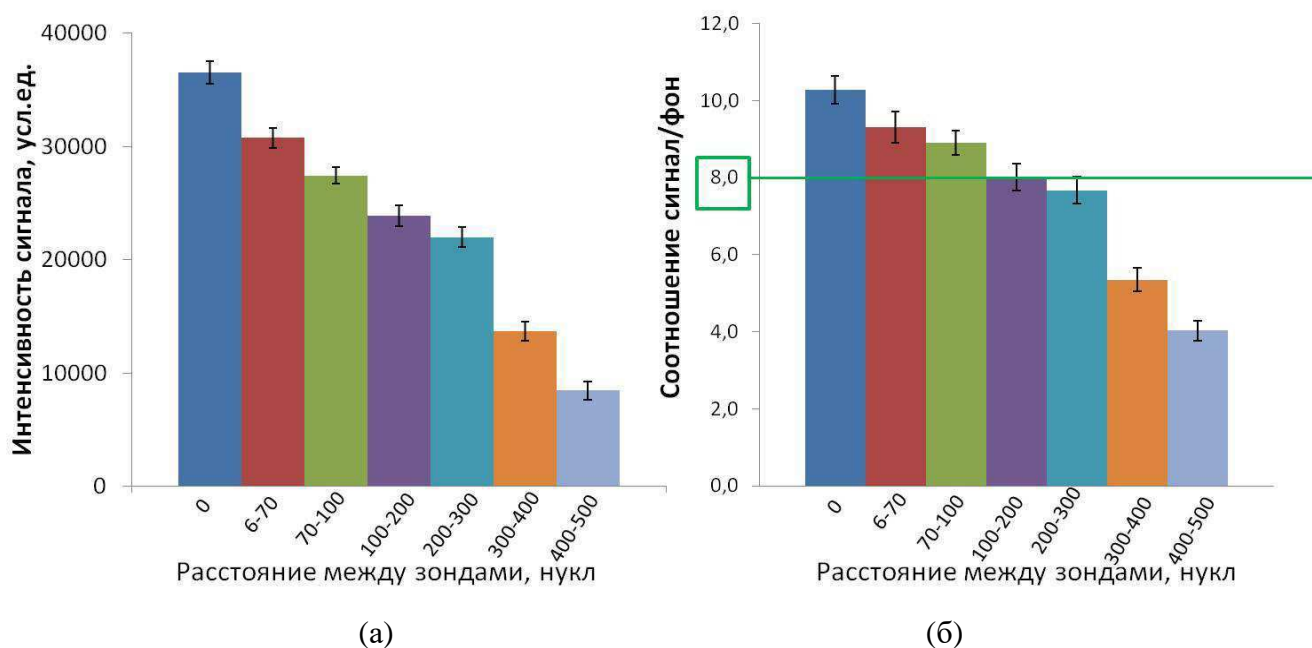


Рис. 38. Зависимость абсолютных (а) и нормированных (б) интенсивностей гибридационных сигналов от расстояния между «улавливающим» и «детектирующим» зондами на примере гена карбапенемазы VIM-4.

При выборе оптимального расстояния между зондами использовали критерий отношения сигнал/фон  $> 8$ , соответствующий гибридационным сигналам с высокой интенсивностью. Далее определяли, какое количество генов карбапенемаз при тестировании 8 образцов различных ДНК-мишеней можно выявить при таком критерии. Результаты определения количества идентифицируемых генов, достоверно определяемых при применении данного критерия, представлены в таблице 16.

Таблица 16

Зависимость количества достоверно идентифицируемых ДНК-мишеней от расстояния между зондами

Расстояние между зондами	0	6-70	70-200	200-300	300-400	400-500
Сигнал/Фон $> 8,0$	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

При использовании последовательно расположенных «улавливающего» и «детектирующего» зондов на расстоянии менее 100 н. удалось провести идентификацию всех восьми типов генов карбапенемаз с разделением на подгруппы. При расстоянии между зондами более 300 нуклеотидов интенсивность сигнала гибридизации резко уменьшалась, и

обнаружить все гены карбапенемаз при установленном нами критерии практически не удавалось.

Таким образом, для достоверной идентификации генов методом сэндвич-гибризационного анализа нужно подбирать зонды на небольшом расстоянии друг от друга, лучше всего использовать зонды, расположенные строго друг за другом. По-видимому, близкое расположение зондов друг за другом создают дополнительный эффект укладки оснований между двумя зондами, что проявляется как кооперативный эффект гибридизации. Подобные кооперативные эффекты могут возникать, главным образом, из-за раскрытия вторичных структур и образования стабильного ДНК-гибрида благодаря взаимодействиям между концевыми нуклеотидами прилегающих зондов. Ранее подобный эффект был показан на примере короткой синтетической последовательности ДНК [243]. Предполагается, что дополнительный эффект укладки обусловлен взаимодействием плоскостей оснований и стабилизацией связей с помощью слабых Ван-дер-Ваальсовых сил и диполь-дипольных взаимодействий между двумя основаниями примыкающих нуклеотидов двух зондов. Однако, в некоторых случаях больший эффект имеет образование локальных вторичных структур ДНК, тогда зонды, гибридизующиеся на небольшом расстоянии друг от друга, образуют более стабильные дуплексы, чем при последовательном расположении зондов [205].

При тестировании зондов для идентификации гена карбапенемазы ОХА-58 обнаруженная для большинства генов зависимость сигнала от расстояния между двумя зондами не выполнялась (рис. 39). Абсолютная интенсивность сигнала гибридизации при расстоянии между зондами 6-200 нуклеотидов была выше, чем в случае последовательного размещения зондов строго друг за другом (расстоянии 0 между зондами). Вероятно, это можно объяснить структурой самого «детектирующего» зонда, выбранного прямо за «улавливающим». Он состоит из GC-богатых участков, чередующихся с AT участками: GGGCAATTGCCGTTTAAACCTGAAGTTC. Интенсивность сигналов гибридизации с использованием такого «детектирующего» зонда была низкой. Таким образом, количество GC-повторов является важной характеристикой зонда, на которое необходимо обращать внимание при выборе последовательностей олигонуклеотидов при проведении генотипирования. Наличие протяженных GC-богатых участков (более 4 нуклеотидов) приводит к стабилизации гибризационного дуплекса, поэтому зонды, содержащие протяженные GC-участки, могут гибридизоваться с молекулой ДНК-мишени даже при наличии одного-двух неспаренных оснований. Кроме того, наличие в структуре зонда GC-повторов может приводить к образованию вторичных структур (димеров и «шпилек»), которые препятствуют эффективной гибридизации. Для «детектирующего» зонда ОХА-58, расположенного следом за

«улавливающим» и содержащего два протяженных GC-обогащенных участка, программа для расчёта параметров олигонуклеотидов выдавала значение  $\Delta G_{\text{димеризации}} = -21,7$  ккал/моль. Таким образом, в случае гибридизации зонда подобной структуры большой вклад вносят несовершенные термодинамические параметры олигонуклеотида, чем расстояние между «улавливающим» и «детектирующим» зондами.

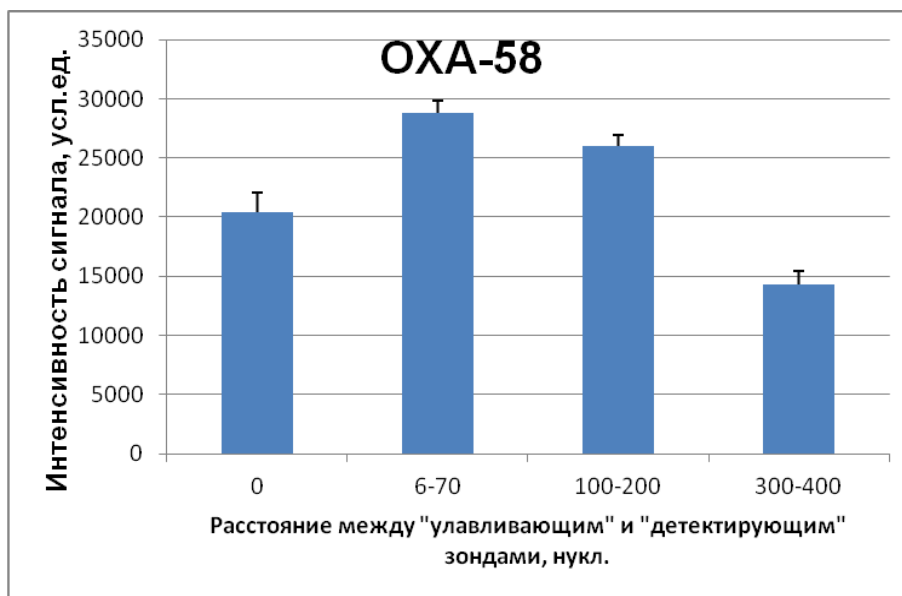


Рис. 39. Зависимость интенсивности гибридизационных сигналов от расстояния между зондами для гена карбапенемазы ОХА-58.

Таким образом, при проведении молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов для сэндвич-анализа нужно подбирать последовательности зондов, расположенные друг за другом по последовательности. Для зондов с протяженными GC-повторами и/или высокой вероятностью образования вторичных структур необходимо рассмотреть несколько вариантов зондов, и затем, проанализировав их поведение в гибридизационном анализе, выбрать наиболее оптимальный вариант.

#### 7.4.2. Зависимость эффективности гибридизационного анализа от типа «улавливаемой» цепи (прямая или обратная).

Нами проведено исследование влияния выбора структуры по прямой и обратной цепи гена. Схема выбора пар улавливающих и детектирующих зондов по прямой и обратной цепям гена показан на рисунке 40. Последовательности и основные термодинамические параметры подобранных «детектирующих» зондов указаны в таблице 14 с пометкой rev (раздел 7.4.1. данной работы).

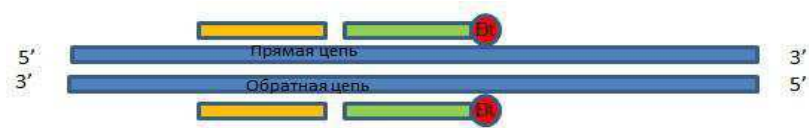


Рис. 40. Схематичное изображение цепей ДНК и расположения «улавливающих» и «детектирующих» зондов.

Результаты гибридационного анализа карбапенемаз типов IMP, VIM, NDM и KPC с использованием зондов, выбранных по прямой и обратной цепям генов, показаны на рисунке 41. Для всех исследованных типов генов существенных различий интенсивностей сигналов при выборе структур зондов по кодирующей цепи или по обратной цепи гена выявлено не было.

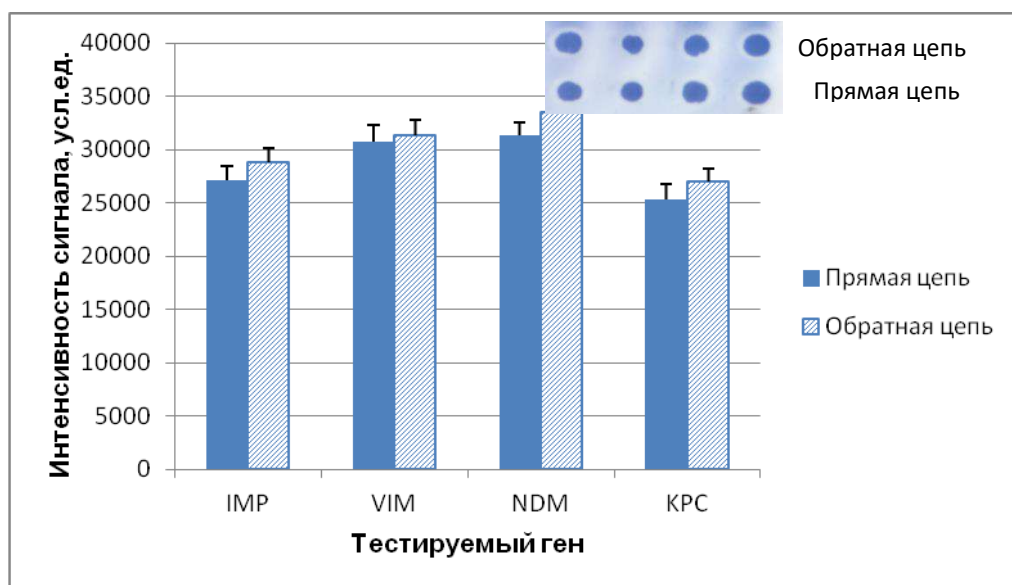


Рис. 41. Результаты гибридационного анализа карбапенемаз с использованием пар олигонуклеотидных зондов, выбранных по прямой и обратной цепям генов.

### 7.4.3. Влияние положения «улавливающего» зонда на ДНК-мишени на специфичность и чувствительность определения генов

Далее исследовали различные положения «улавливающего» зонда на мишени и их влияние на эффективность гибридации. Было выбрано несколько последовательностей зондов, различающиеся расположением на цепи ДНК-мишени: ближе к 3'концу определяемой цепи, примерно в середине цепи, а также ближе к 5'концу ДНК-мишени (рис. 42). Зная о влиянии расстояния между «улавливающим» и «детектирующим» зондами на гибридационный сигнал, старались выбирать зонды, расположенные на максимально близком (не более 50 н.) расстоянии друг от друга. Результаты гибридационного анализа пяти генов карбапенемаз в зависимости от положения зондов на ДНК-мишени приведены на рисунке 43. Самый высокий гибридационный сигнал был получен в случае последовательного

расположения зондов у 5'-конца определяемой цепи (обратной), при гибридизации зондов посередине цепи сигнал был средним. Самый низкий сигнал получен при расположении зондов у 3'-конца определяемой цепи.

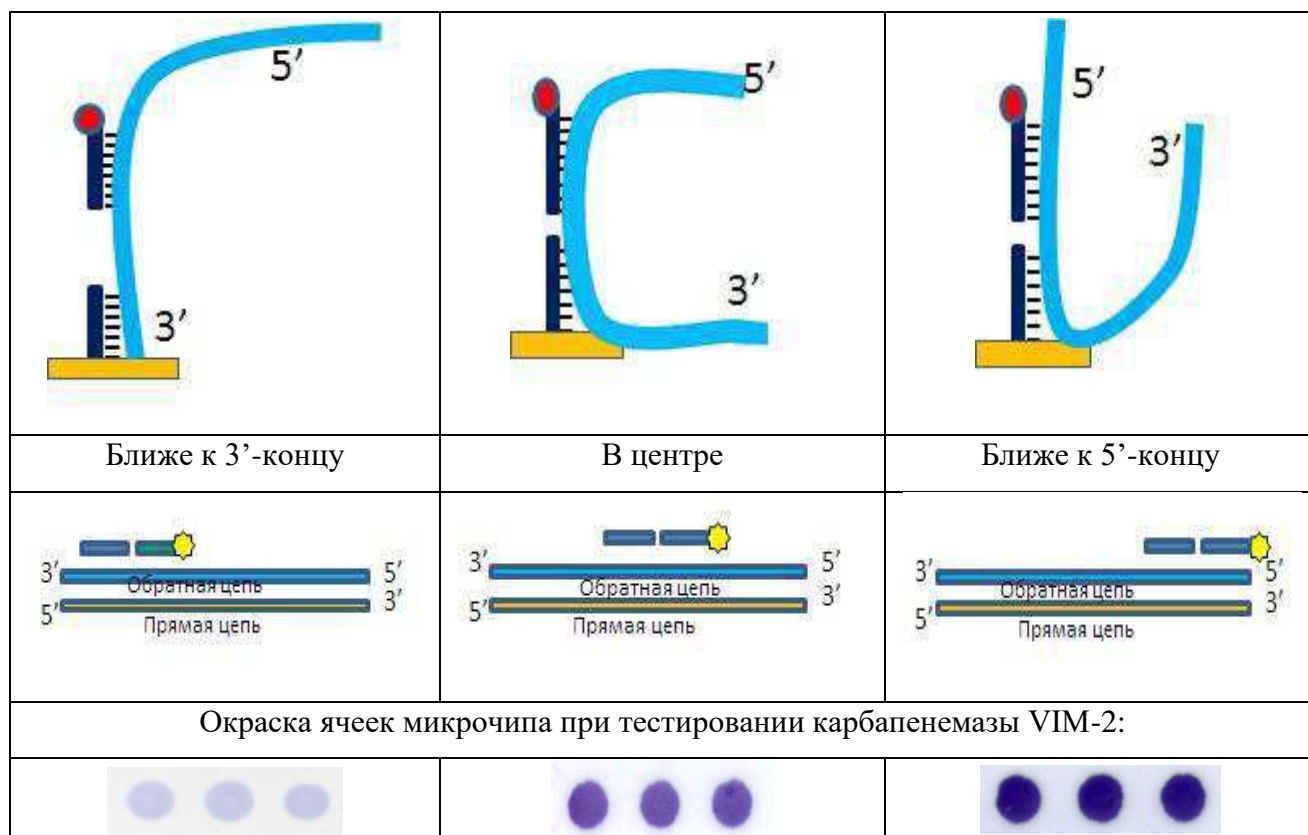


Рис. 42. Расположение пары олигонуклеотидных зондов на последовательности ДНК-мишени и результат тестирования их в гибридизационном анализе на примере карбапенемазы VIM-2.

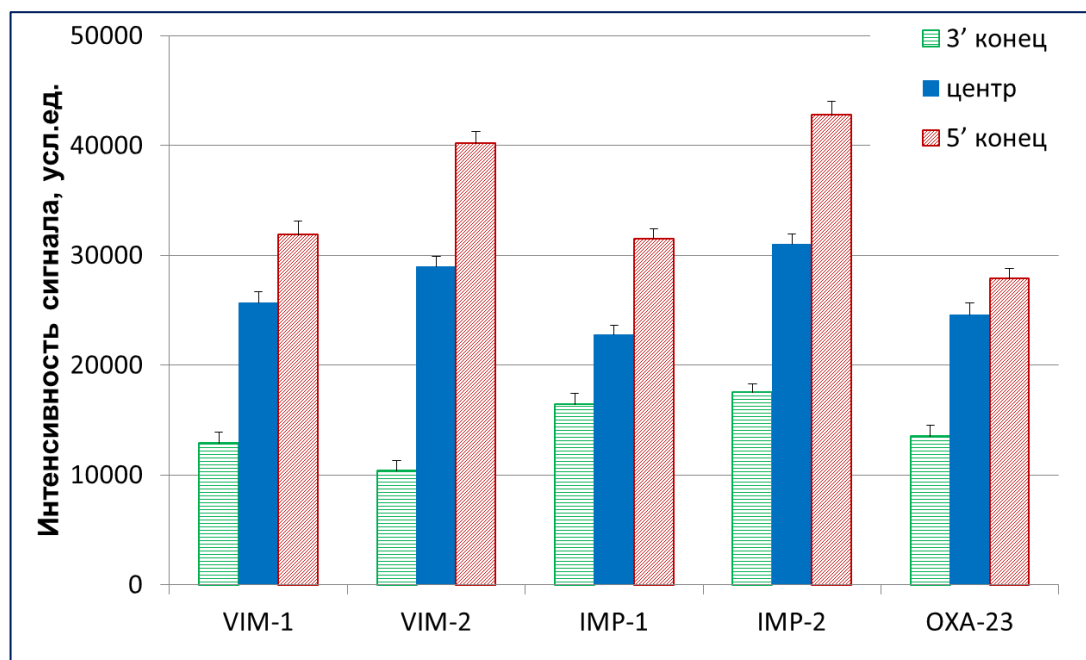


Рис. 43. Зависимость интенсивностей гибридизационных сигналов от положения пары «детектирующего» и «улавливающего» зондов на ДНК-мишени.

Таким образом, рекомендуется выбирать зонды для улавливания ДНК так, чтобы они гибридизовались ближе к 5'-концу определяемой цепи. Это значит, что при проведении молекулярного дизайна зондов по прямой цепи для получения хорошего гибридизационного сигнала следует в первую очередь обратить внимание на область ближе к 3' концу гена или амплифицируемого фрагмента.

#### 7.4.4. Влияние величины «свободного» участка ДНК-мишени на эффективность гибридизации

При улавливании ДНК-мишени близко к одному из концов большая часть ДНК-мишени остаётся свободной, не связанной с зондами (рис. 44). В работе исследовано влияние длины «свободного» участка ДНК на интенсивность сигнала гибридизации.

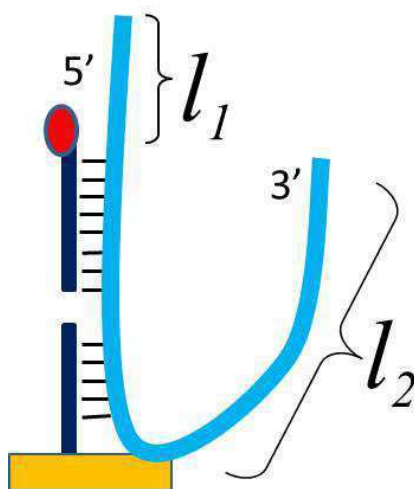


Рис. 44. Схематическое изображение ДНК-дуплекса и «свободных» участков ДНК-мишени.

Исследование проводили с использованием генов карбапенемаз группы VIM. Было подобрано 6 различных праймеров для амплификации участков генов разной длины: два обратных праймера, положение которых было фиксированным, и 4 прямых праймера выбирались в различных местах гена (в начале, середине, ближе к концу). Таким образом, в процессе ПЦР было получено восемь ампликонов разной длины: от практически полного гена (731 п.н.), до короткого фрагмента (136 п.н.), в котором зонды располагаются сразу за праймером и длина «свободного» участка в этом случае минимальна. Последовательности и основные термодинамические параметры праймеров представлены в таблице 17. Праймеры VIM\_dir и VIM\_rev ранее использовались для амплификации генов ферментов группы VIM. Их последовательности и параметры представлены в таблице 7 раздела 6.1. данной работы. Длины фрагментов амплификации, которые должны получиться в результате ПЦР с использованием различных комбинаций шести подобранных праймеров, указаны в таблице 18. Результаты гибридизационного анализа генов VIM-1, VIM-2 и VIM-4 с использованием полученных ампликонов представлены на рисунке 45.



Таблица 17

Последовательности праймеров для амплификации фрагментов генов карбапенемаз типа VIM

Название праймера	Последовательность праймера, 5' → 3'		Длина праймера, нукл.	GC, %	T <sub>пл.</sub> , °C	Вероятность обр. втор. стр.
vim_dir_17	прямой	GTAGTTTATTGGTCTACATGACCGC	25	44,0	63,5	-3,32
vim_dir	прямой	GATGGTGTTTGGTCGCATATCGC	23	52,2	66,5	-0,65
vim_dir_493	прямой	GTGCGCTTCGGTCCAGTAGA	20	60,0	66,1	-0,18
vim_dir_520	прямой	STATCCTGGTGCTGCGCATTCG	22	59,1	67,3	-0,54
vim_rev	обратный	CATTC(A/T)GCCAGATCGGCATCG	21	57,1	66,0	-3,37
vim_rev_739	обратный	GACTTGCTC(C/A)AGCACACA(G/A)C	21	61,9	67,6	-1,73

Таблица 18

Комбинации праймеров и длины фрагментов амплификации, получаемых при их использовании

Прямой праймер	Обратный праймер	Длина фрагмента амплификации, пар оснований
vim_dir_17	vim_rev_723	731
vim_dir_17	vim_rev	639
vim_dir	vim_rev_723	598
vim_dir	vim_rev	506
vim_dir_493	vim_rev_723	255
vim_dir_493	vim_rev	163
vim_dir_520	vim_rev_723	228
vim_dir_520	vim_rev_n	136

В целом, гибридизационные сигналы уменьшались с увеличением длины ампликона. В случае гибридизации полноразмерного гена, сигнал был значительно ниже, чем при взаимодействии зондов с более короткими фрагментами гена. Кроме влияния «свободного» участка ДНК, такое снижение сигнала может частично объясняться стерическими и диффузионными затруднениями взаимодействия более длинной цепи ДНК с иммобилизованными зондами.

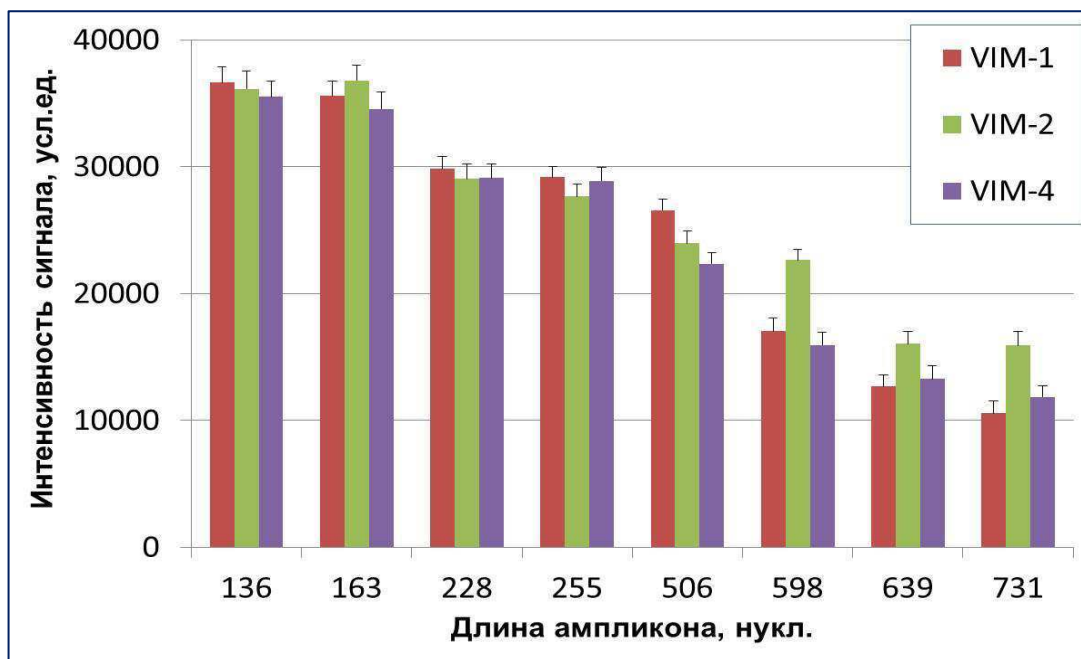


Рис. 45. Зависимость интенсивностей гибридационных сигналов от длины ДНК-мишени на примере трех генов карбапенемаз VIM типа.

Было исследовано влияние длины «свободных участков», расположенных по обе стороны от места связывания зондов с ДНК-мишенью ( $l_1$  и  $l_2$  на рисунке 44). Зафиксировав длину второго участка ( $l_2 = 30$  нукл. и  $l_2 = 122$  нукл.), варьировали длину фрагмента  $l_1$ . Результаты гибридационного анализа представлены на рисунке 46.

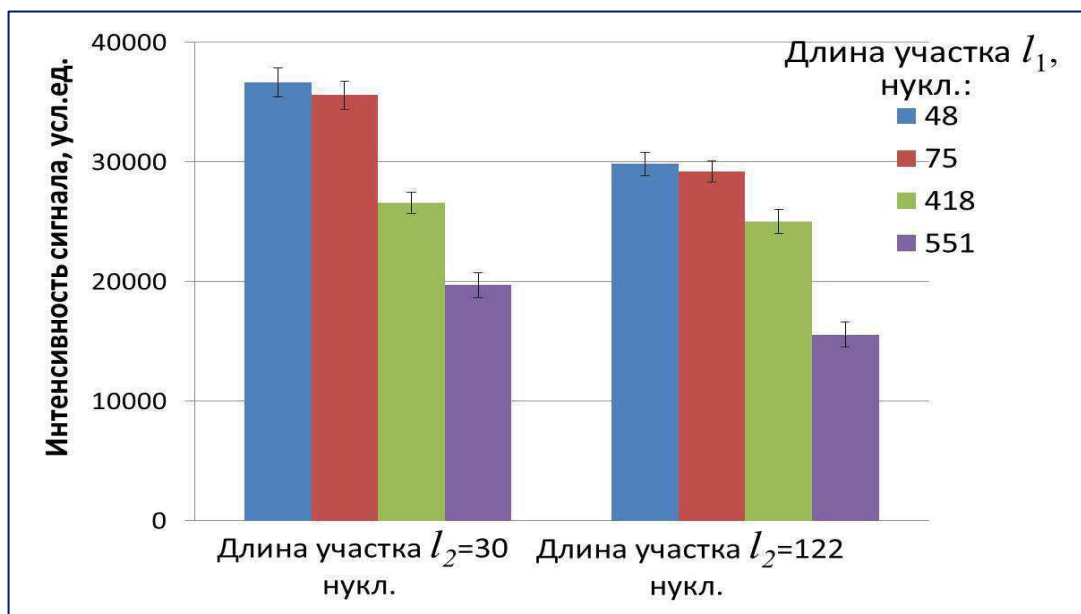


Рис. 46. Зависимость интенсивности гибридационного сигнала от длины «свободных» участков  $l_1$  и  $l_2$  на примере гена карбапенемазы VIM-1.

Полученные результаты показали, что с увеличением длины «свободного» участка ДНК-мишени  $l_1$  интенсивность аналитического сигнала снижалась. Длина участка  $l_2$  также оказывает

влияние на интенсивность сигнала гибридизации (при длине фрагмента  $l_2 = 30$  нукл. интенсивность сигнала выше, чем при длине  $l_2 = 122$  нукл). Максимальная интенсивность гибридизационных сигналов наблюдалась, когда длины свободных фрагментов не превышали 75 нуклеотидов.

## **7.5 Разработка рекомендаций по проведению молекулярного дизайна олигонуклеотидных зондов**

На основании выявленных закономерностей гибридизации ДНК-мишени с набором олигонуклеотидных зондов разработаны рекомендации по проведению молекулярного дизайна зондов для детекции генов методом сэндвич-гибридизации:

1. Поиск гомологичных участков последовательности для «улавливающих» зондов следует начинать в области 3' конца нуклеотидной цепи гена.
2. Далее проводится расчет термодинамических параметров выбранных олигонуклеотидных зондов. Для того чтобы все они гибридизовались с ДНК-мишенью эффективно и специфично в одинаковых гибридизационных условиях, различие в температурах плавления для разных олигонуклеотидных зондов должно быть минимальным (не более  $5^{\circ}\text{C}$ ). Вероятность образования вторичных структур («шпилек», димеров), которые затрудняют доступность зонда для ДНК-мишени, снижая тем самым эффективность гибридизации, должна быть минимальной.
3. Последовательности «улавливающего» и «детектирующего» зондов должны располагаться друг за другом.
4. Последовательности улавливающих зондов можно выбрать по прямой и обратной цепи гена, так как в некоторых случаях наблюдается различие в их способности гибридизоваться.
5. Для зондов с протяженными GC-повторами и/или высокой вероятностью образования вторичных структур необходимо рассмотреть несколько вариантов зондов, и затем, проанализировав их поведение в гибридизационном анализе, выбрать наиболее оптимальный вариант.
6. Для распознавания генов с низкой степенью гомологии можно выбирать и амплифицировать небольшие фрагменты гена (от 130 оснований).
7. Для распознавания близкородственных генов необходимо амплифицировать более протяженные фрагменты (от 300 до 500 оснований) и использовать несколько «улавливающих» зондов для увеличения специфичности анализа.

8. Праймеры для амплификации нужно располагать ближе к основаниям, участвующим в образовании дуплекса при гибридизации зондов, чтобы свободные участки ДНК-мишени были минимальных размеров.

На основании разработанных рекомендаций проводили анализ последовательностей генов остальных распространенных карбапенемаз (KPC, NDM, SPM, SIM, GIM, OXA-48) и выбирали зонды для их определения на олигонуклеотидных микрочипах. Выбранные последовательности «улавливающих» и «детектирующих» зондов приведены в таблице 19.

Таблица 19

Последовательности «улавливающих» и «детектирующих» олигонуклеотидных зондов для идентификации групп и подгрупп карбапенемаз методом сэндвич-гибридизации

Название зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нукл	GC состав, %	T пл., °C	ΔGш, ккал/моль*	ΔGд, ккал/моль**
KPC_218	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTG	25	44,0	69,0	0,16	-10,23
KPC_610	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCAGCAGTTTGTGATTGGCTAAAG	24	41,7	67,3	-0,96	-4,74
Det_KPC	GGAAACACGACCGGCAACCTTTTT-Bt	19	63,2	70,1	0,93	-9,75
NDM_412	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCGACTTATGCCAATGCGTTG	20	55,0	66,7	-1,72	-8,53
NDM_625	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTGATCAAGGACAGCAAGG	21	52,4	68,9	-1,03	-3,9
Det_NDM	CCAAGTCGCTCGGCAATCTCTTTTT-Bt	20	60,0	69,4	-0,4	-3,61
SPM_322	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCCATCCTGTTCCAGCGGATAATG	23	52,2	69,3	-1,54	-6,12
SPM_519	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGAAACAAGGCAAGGTCTTCTCG	22	50,0	67,7	-0,25	-3,61
Det_SPM	GAGCTGGTTGAGGTTTCATTTCCAGTTTTT-Bt	25	48,0	70,0	-3,03	-6,62
SIM_314	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGTGGCTTAATACAAAGTCCATCCC	24	45,8	67,7	-1,40	-5,02
SIM_462	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCCCAGGACACACTCAAGATAACG	23	52,2	68,7	-0,05	-3,61
Det_SIM	GCCTTGGCAATCTAAGTGACGCTTTTT-Bt	22	54,5	70,1	-1,99	-6,21
GIM	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCTCTACTATCCAGGTGCTGG	21	57,1	67,9	-2,20	-6,46
GIM_521	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTCTGCCTCGTGAGGAGTCAT	19	57,9	67,5	-2,00	-6,24
Det_GIM	GAGTGGGAAGGCTTAGGTTACGTTTTT-Bt	22	54,5	68,4	0,75	-3,61
OXA-48_524	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC	27	37,0	66,3	-0,19	-6,30
OXA-48_552	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTTTGGAGCGCAGCCAGCGTATTG	20	65,0	72,2	-3,93	-9,89
Det_OXA-48	GGAGCGCAGCCAGCGTATTGTTTTT-Bt	20	65,0	67,6	-3,93	-9,89

\* ΔGш – свободная энергия Гиббса реакции образования шпилек (ккал/моль)

\*\* ΔGд – свободная энергия Гиббса реакции димеризации зонда (ккал/моль)

## **ГЛАВА 8. МЕТОД ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОЙ И НЕМЕЧЕНОЙ ДНК-МИШЕНИ**

В разрабатываемом нами методе идентификации специфических генов карбапенемаз аналитический сигнал прямо пропорционален концентрации дуплексов ДНК, образующихся в зоне реакции на поверхности микрочипа. Концентрация дуплексов, в свою очередь, зависит как от структуры специфических зондов, так и от условий реакции гибридизации. Поэтому параллельно с оптимизацией структуры зондов проводили оптимизацию условий гибридизации. Сначала она проводилась с использованием зондов для отдельных типов карбапенемаз, а потом условия уточнялись на полном наборе зондов. Обобщенные результаты оптимизации условий гибридизации меченой и немеченой ДНК разных карбапенемаз описаны в данной главе.

### **8.1. Оптимизация условий проведения гибридизации с использованием меченой ДНК-мишени на олигонуклеотидных микрочипах**

Определение генов проводилось с использованием прямой схемы гибридационного анализа: ДНК-мишень амплифицировалась из ДНК, выделенной из культуры возбудителя, для этого использовалась мультиплексная ПЦР с одновременным включением биотина в качестве метки, затем меченая ДНК-мишень гибридизовалась с зондами, иммобилизованными на поверхности ДНК-микрочипа, после чего проводилось определение меченых дуплексов с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза.

Важным этапом оптимизации метода являлся выбор оптимальных условий проведения реакции гибридизации на поверхности мембраны с целью увеличения количества специфического продукта реакции гибридизации на поверхности носителя. Результаты гибридизации меченой ДНК с выбранным набором олигонуклеотидных зондов зависят от нескольких факторов: от температуры, при которой проводится гибридизация, солевого состава гибридационного буфера и времени проведения анализа. В процессе работы нами была проведена оптимизация перечисленных выше параметров с использованием 500 нг ДНК, амплифицированной из контрольных штаммов-продуцентов МБЛ и бета-лактамаз ОХА типов.

#### **8.1.1. Выбор оптимальной температуры гибридизации**

При выборе температуры гибридизации основным критерием являлось то, что она должна быть ниже, чем  $T_m$  образующихся гетеродуплексов. Также учитывалось, что при

существенном снижении температуры гибридизации может наблюдаться низкая специфичность анализа. Диапазон  $T_m$  выбранных олигонуклеотидов для определения генов карбапенемаз составил 60-70°C. Поэтому было решено исследовать протекание реакции гибридизации в диапазоне температур 40 - 50°C. Данные по тестированию генов бета-лактамаз VIM-1 и IMP-2 на олигонуклеотидных микрочипах с колориметрической детекцией, полученные при разных температурах гибридизации, представлены на рисунке 47. При анализе результатов наблюдали следующую закономерность: абсолютные интенсивности сигналов были выше при более низких температурах и уменьшались с увеличением температуры. Здесь стоит отметить, что хотя при 40°C зонды работали достаточно интенсивно, но для большинства из них наблюдалась перекрестная гибридизация с фрагментами генов других карбапенемаз, хотя и интенсивность сигнала неспецифической гибридизации была чуть выше фоновой. При 50°C наблюдалась низкая интенсивность гибридизационных сигналов. В качестве оптимальной температуры для проведения гибридизации была выбрана  $T = 45^\circ\text{C}$ , так как при этой температуре наблюдается достаточно интенсивный аналитический сигнал и низкий уровень неспецифической перекрестной гибридизации.

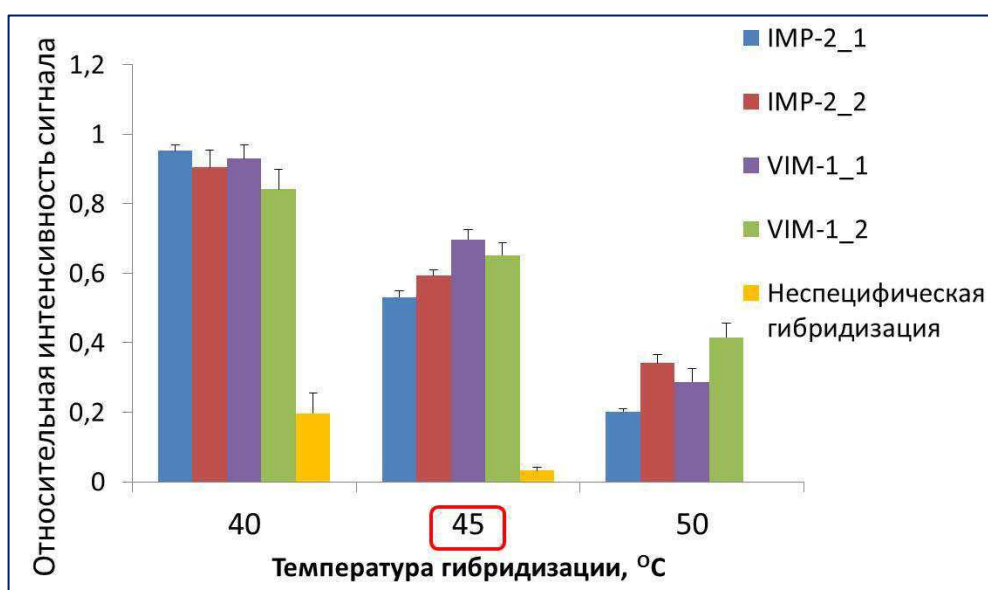


Рис. 47. Влияние температуры на эффективность гибридизации на примере карбапенемаз IMP-1 и VIM-1.

#### 8.1.2. Выбор концентрации соли в гибридизационном буфере

Результат гибридизации олигонуклеотидных зондов с ДНК-мишенью зависит от концентрации соли в гибридизационном буфере. Влияние концентрации соли на результат гибридизации исследовали на трех вариантах генов металло-бета-лактамаз VIM-1, VIM-2, IMP-1. Гибридизацию проводили при температуре 45°C. На рисунке 48 показаны выборочно результаты гибридизации ДНК-мишени с некоторыми зондами, полученные при использовании

гибридизационного буфера с различным содержанием NaCl. Увеличение концентрации соли до определенной концентрации приводило к увеличению наблюдаемых интенсивностей гибридных сигналов вследствие уменьшения взаимного отталкивания заряженных фосфатных групп двух олигонуклеотидных цепей. Однако при использовании буфера с высокой концентрацией соли специфичность реакции гибридизации падала. В результате в качестве оптимального для проведения гибридизации был выбран буфер с концентрацией NaCl 0,3 М.

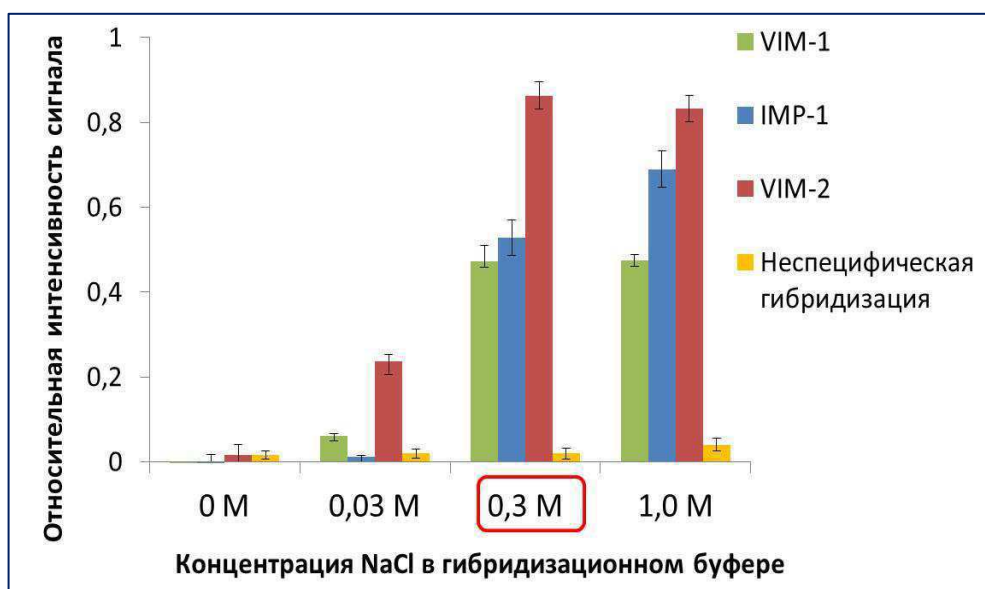


Рис 48. Результаты анализа образцов генов металло-бета-лактамаз при использовании гибридного буфера с различным содержанием NaCl.

### 8.1.3. Влияние фрагментации меченой ДНК на эффективность гибридизации

Параметром, определяющим эффективность гибридизации, является размер меченой ДНК-мишени. Интенсивность аналитического сигнала при гибридизации длинных меченых ПЦР-продуктов (600-700 нуклеотидов) в течение 1,5 часов при 45°C была невысокой (~10000 усл.ед.). Для уменьшения размера ПЦР-продуктов использовали фрагментацию ДНК-мишени ДНКазой. Результаты гибридизации образца, содержащего карбапенемазу VIM-1, с набором олигонуклеотидных зондов, без фрагментации анализируемой ДНК и при проведении её фрагментации приведены на рис. 49. Фрагментация до фрагментов величиной 50-150 нуклеотидов привела к значительному увеличению интенсивностей получаемых гибридных сигналов практически для всех протестированных зондов. Аналогичная зависимость наблюдалась и при анализе других образцов. На рисунке 50 показано влияние фрагментации на интенсивность гибридизации карбапенемаз подгрупп OXA-23, IMP-1 и VIM-2. Так же, как и для образца VIM-1, олигонуклеотидные зонды для IMP-1 и VIM-2 без

фрагментации ДНК-мишени давали среднюю интенсивность сигнала гибридизации зондов с меченой ДНК исследуемых образцов, а после фрагментации анализируемой ДНК получали аналитический сигнал высокой интенсивности. Однако при тестировании зондов для идентификации гена карбапенемазы ОХА-23, наблюдали обратную закономерность: при фрагментации анализируемой ДНК интенсивность сигнала гибридизации олигонуклеотидного зонда для ОХА-23 была меньше, чем без фрагментации (см. рисунок 50).

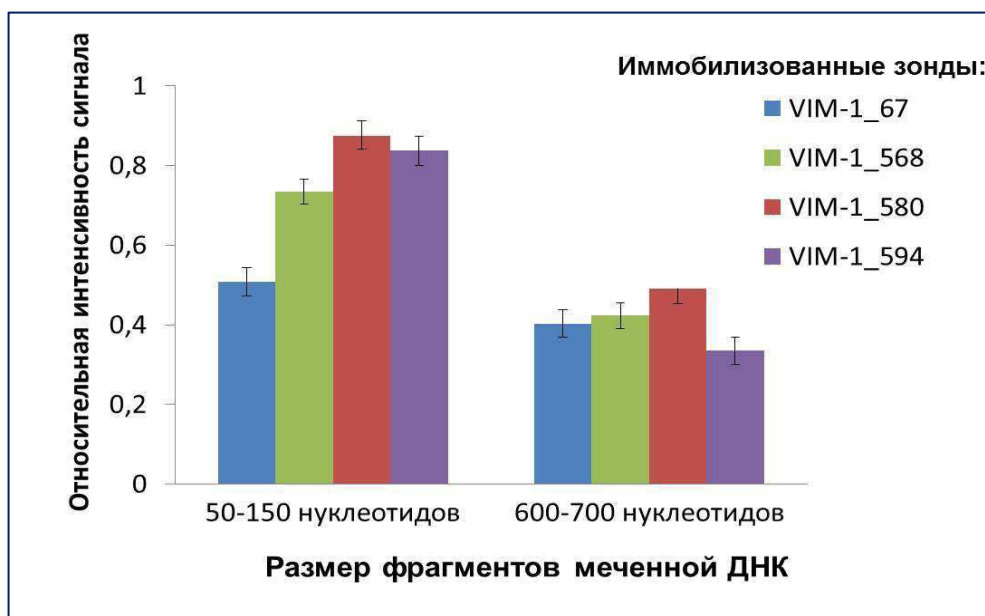


Рис. 49. Влияние размера меченой ДНК-мишени на эффективность гибридизации образцов карбапенемаз группы VIM.

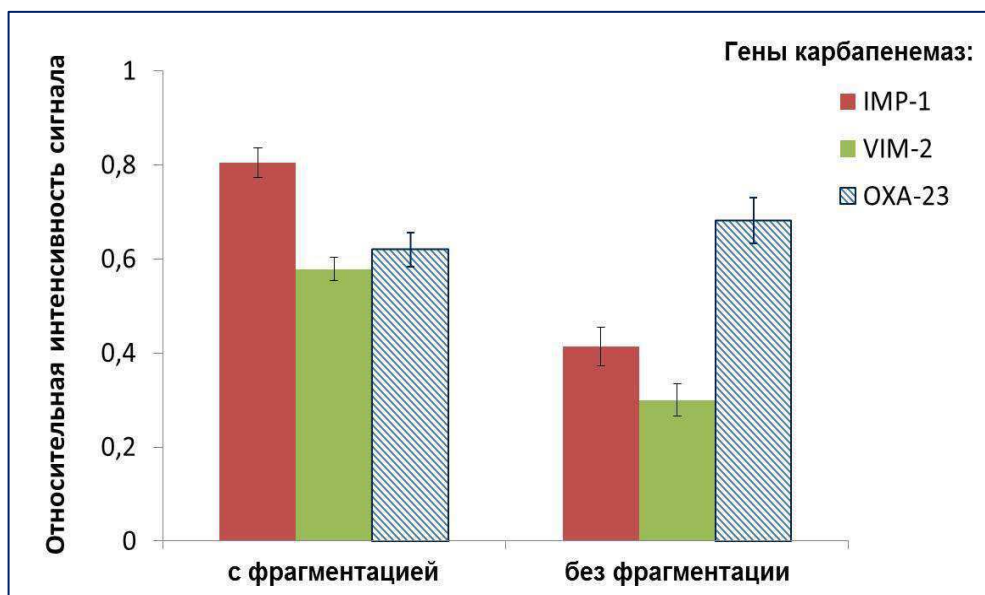


Рис. 50. Влияние фрагментации образцов карбапенемаз подгрупп ОХА-23, IMP-1 и VIM-2 на интенсивность аналитического сигнала гибридизации.



## 8.2. Оптимизация условий проведения сэндвич-гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах

Основные параметры, влияющие на эффективность «улавливающих зондов» (температура гибридизации и концентрация соли в реакционной смеси) были оптимизированы при разработке метода анализа меченой ДНК-мишени (раздел 8.1. данной работы). Установлено, что выбранные параметры (температура инкубации 45°C, концентрация NaCl 0,3 М) также являются оптимальными для анализа немеченой ДНК-мишени методом сэндвич-гибридизации. Дальнейшая оптимизация состояла в исследовании необходимости предобработки ДНК и введения дополнительных реагентов для улучшения гибридизации. Для оптимизации условий гибридизации использовали 300 нг немеченой ДНК, амплифицированной из контрольных штаммов-продуцентов МБЛ и ОХА-бета-лактамаз. Сравнивались результаты, полученные с использованием последовательно расположенных «улавливающего» и «детектирующего» зондов при различных условиях гибридизации.

### 8.2.1. Оптимизация условий гибридизации двухцепочечной ДНК-мишени

В работе исследовалась необходимость стадии разъединения цепей амплифицированной в процессе мультиплексной ПЦР двухцепочечной ДНК-мишени. Для разъединения цепей ДНК проводился её отжиг при 99°C в течение 3,5 минут с последующим быстрым охлаждением на льду и последующим проведением гибридизационного анализа. Сравнивали сигналы гибридизации предварительно прогретой анализируемой ДНК и двухцепочечной ДНК без прогрева. Результаты гибридизационного анализа карбапенемаз VIM-2, NDM-1, OXA-23 и OXA-58 приведены на рисунке 51.

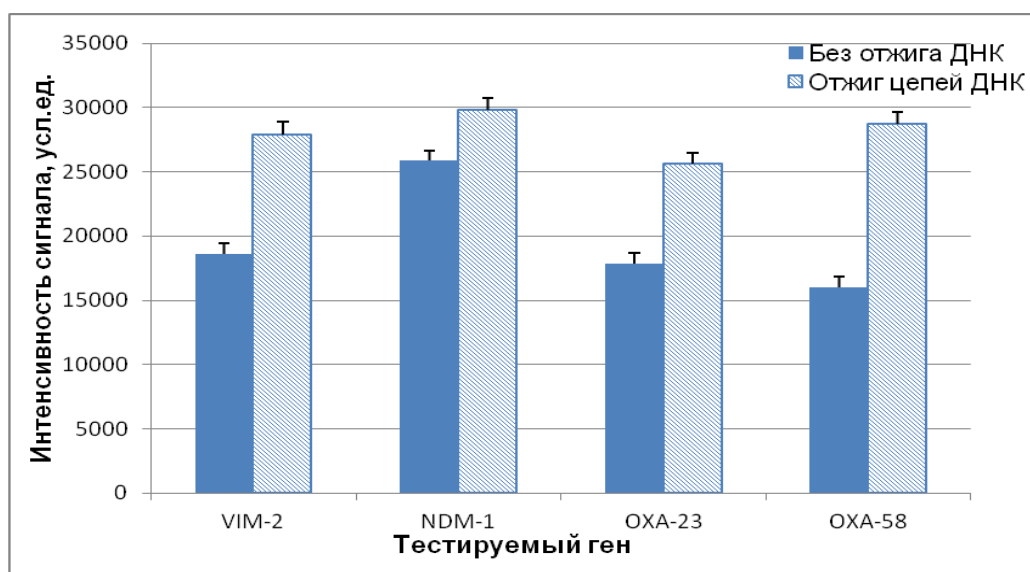


Рис. 51. Влияние стадии разъединения цепей ДНК на эффективность гибридизации на примере анализа генов карбапенемаз VIM-2, NDM-1, OXA-23 и OXA-58.

Гибридизационный сигнал был выше при проведении предварительной стадии разъединения цепей, что связано с лучшей связываемостью одноцепочечной ДНК с олигонуклеотидами на носителе и «детектирующими» зондами.

### 8.2.2. Влияние ионов магния в гибридизационном буфере на эффективность гибридизации ДНК-мишени

На эффективность сэндвич-гибридизационного анализа влияет конформация ДНК-мишени. Из литературы известно, что ионы магния способствуют частичному «распрямлению» молекулы ДНК [244]. Были протестированы различные концентрации ионов магния в гибридизационном буфере в диапазоне от 0 до 50 мМ. Результаты гибридизационного анализа карбапенемаз ОХА-23 и ОХА-51 при различных концентрациях ионов магния в гибридизационном буфере приведены на рисунке 52. Подобрана оптимальная концентрация ионов магния в гибридизационном буфере (12 мМ).

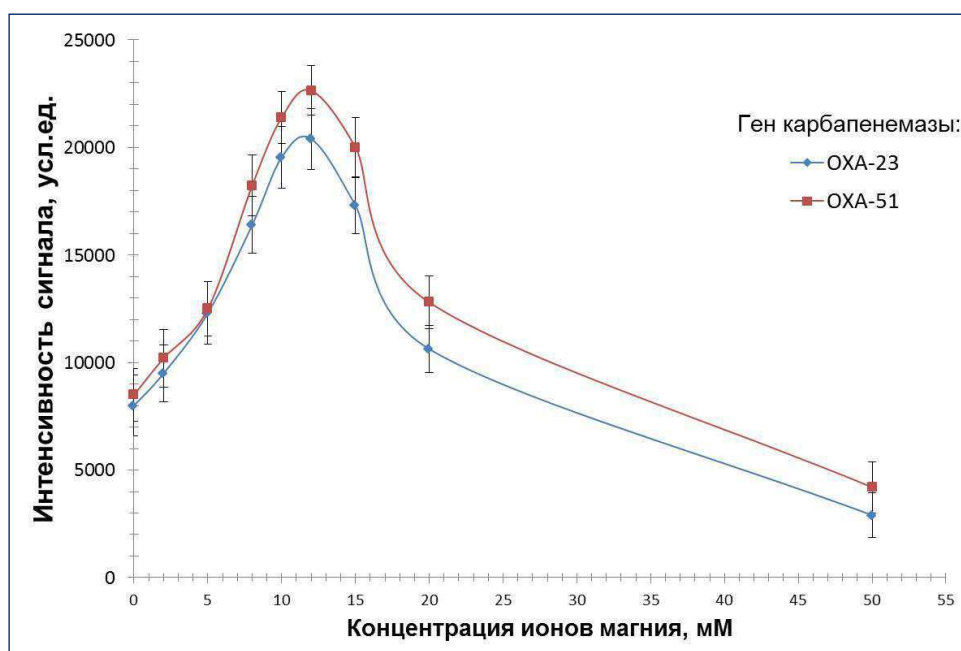


Рис. 52. Влияние концентрации ионов магния в гибридизационном буфере на интенсивность гибридизационного сигнала на примере карбапенемаз ОХА-23 и ОХА-51.

### 8.2.3. Оптимизация времени проведения стадии гибридизации

Предполагается, что разрабатываемый метод может быть использован в клинических лабораториях для более быстрой идентификации устойчивых к антибиотикам бактерий по сравнению с классическими микробиологическими тестами. С этой точки зрения сэндвич схема анализа, в которой гибридизация ДНК-мишени и гибридизация меченого «детектирующего» зонда проводятся отдельно, является менее перспективной. Поэтому далее в работе провели исследование возможности объединения двух стадий гибридизации в одну с целью уменьшения

общего времени анализа. Для этого сравнили эффективность идентификации гена карбапенемазы VIM-2 в двух вариантах: гибридизации ДНК-мишени и затем «детектирующего» зонда в две отдельные стадии и в одну стадию, когда на микрочип с иммобилизованными зондами добавляли одновременно ДНК-мишень и «детектирующий» зонд. Время стадий гибридизации варьировали от 15 минут до 2 часов. Результаты варьирования времени и количества стадий гибридизации приведены на рисунке 53. На графике по горизонтальной оси отложено общее время анализа одностадийной схемы, в скобках указано время каждой стадии для поочередного добавления ДНК-мишени и «детектирующих» зондов. Увеличение времени анализа более одного часа не приводит к значительному возрастанию аналитического сигнала, однако способствует улучшению специфичности гибридизации (интенсивность сигнала неспецифической гибридизации уменьшается при увеличении времени гибридизации). В качестве оптимального для получения аналитических сигналов достаточной интенсивности и специфичности принято время гибридизации 1,5 часа. Однако стоит отметить, что для проведения экспресс-анализа достаточное время гибридизации может быть уменьшено до 1 часа, поскольку интенсивность неспецифической гибридизации с карбапенемазами других подгрупп в этом случае является довольно низкой и значения относительной интенсивности не превышает уровня 0,15.

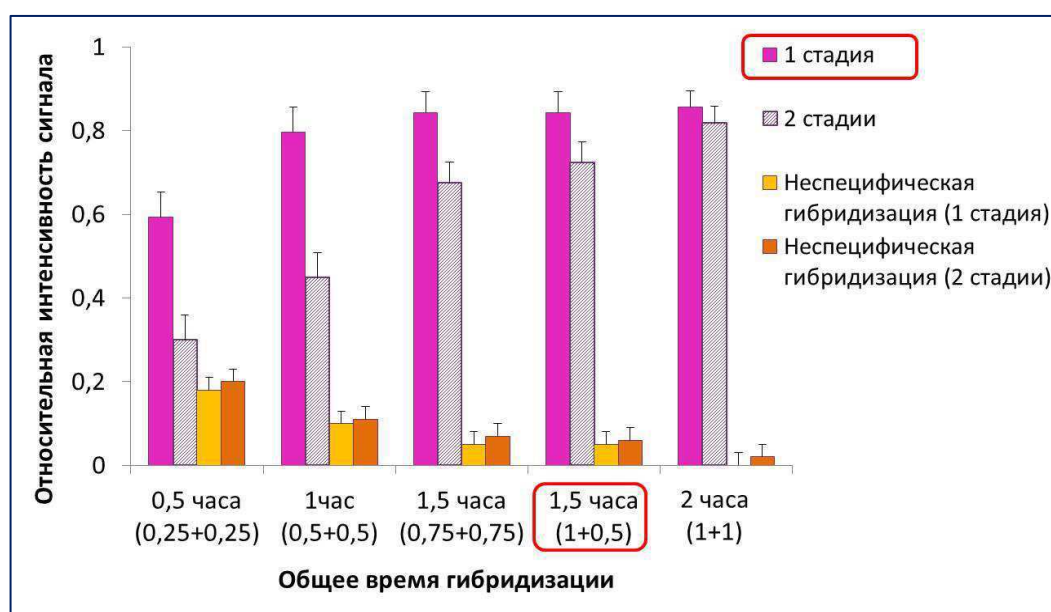


Рис. 53. Влияние способа добавления олигонуклеотидов в гибридизационную смесь и времени проведения стадии гибридизации на результаты гибридизационного анализа карбапенемазы VIM-2.

Также показано, что при одинаковом общем времени анализа в случае проведения сэндвич-гибридизации в одну стадию с одновременным добавлением анализируемой ДНК и «детектирующих» зондов интенсивность аналитического сигнала была выше. Вклад

неспецифической гибридизации был примерно равным в обоих случаях. Поэтому далее при проведении гибридизации ДНК-мишень и «детектирующие» зонды вводили в реакционную смесь одновременно на одной стадии.

### **8.3. Сравнение двух методов гибридизационного анализа – с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени для идентификации генов карбапенемаз на олигонуклеотидных микрочипах**

Мы провели сравнение двух схем проведения гибридизационного анализа на микрочипах: прямой схемы с использованием «улавливающих» зондов и меченой биотином ДНК-мишени и сэндвич-схемы с использованием немеченой ДНК-мишени и двух типов зондов, «удавливающих» и меченых «детектирующих».

#### **8.3.1. Исследование специфичности выявления генов карбапенемаз с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени**

В работе была исследована специфичность идентификации генов карбапенемаз методом гибридизационного анализа с использованием двух схем гибридизации. Идентификация типа гена карбапенемаз в обоих случаях была проведена специфично, неспецифического связывания зондов с генами других типов не наблюдалось (см. раздел 7.3. данной работы).

Результаты подгрупповой идентификации генов карбапенемаз методом гибридизационного анализа с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени представлены на рисунке 54.

При идентификации подгрупп генов карбапенемаз IMP типа с использованием меченой ДНК-мишени для некоторых олигонуклеотидных зондов наблюдали перекрёстную гибридизацию с генами других подгрупп. При проведении гибридизационного анализа по схеме «сэндвич» с применением немеченой ДНК-мишени и меченого «детектирующего» зонда подгрупповая идентификация генов карбапенемаз с использованием тех же «улавливающих» зондов на поверхности олигонуклеотидного микрочипа проводилась более специфично, неспецифического связывания не было выявлено. Таким образом, введение второго зонда в гибридизацию повышает специфичность выявления генов карбапенемаз.

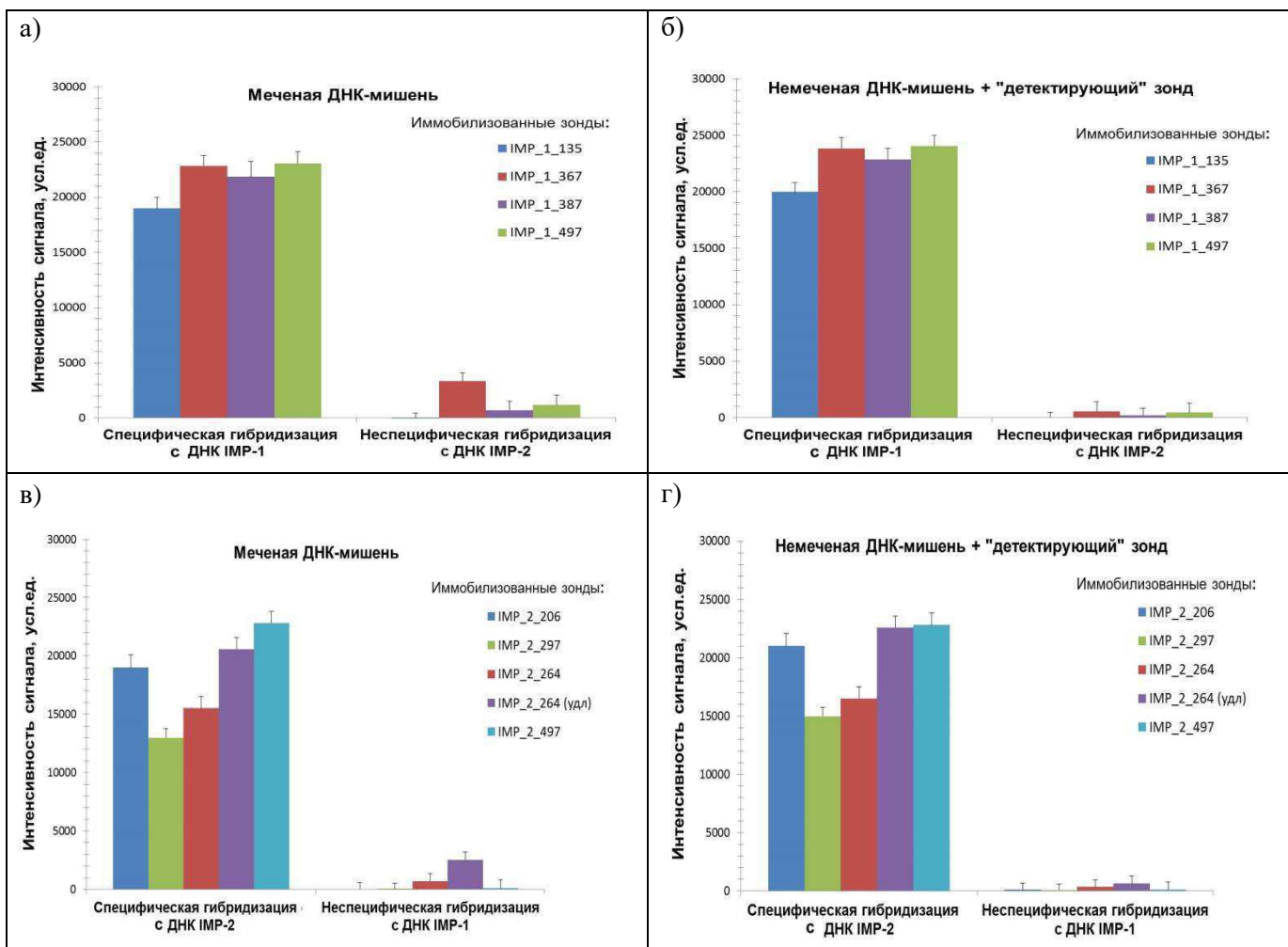


Рис. 54. Результаты гибридизационного анализа для идентификации генов карбапенемаз подгрупп IMP-1 и IMP-2.

(а) – гибридизация меченых ДНК мишеней: специфическая для IMP-1, неспецифическая для IMP-2,

(б) гибридизация немеченых ДНК мишеней в сэндвич-варианте: специфическая для IMP-1, неспецифическая для IMP-2,

(в) гибридизация меченых ДНК мишеней: специфическая для IMP-2, неспецифическая для IMP-1,

(г) гибридизация немеченых ДНК мишеней в сэндвич-варианте: специфическая для IMP-2, неспецифическая для IMP-1.

### 8.3.2. Сравнение чувствительности идентификации генов карбапенемаз с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени

Для сравнения чувствительности гибридизационного анализа с использованием двух схем гибридизации были проварьированы концентрации анализируемой ДНК (от 0,1 до 2 нг/мкл) и построены градуировочные зависимости интенсивности аналитических сигналов от концентрации ДНК. Полученные градуировочные графики для гена карбапенемазы VIM-2 приведены на рисунке 55. Гибридизационные сигналы были выше при использовании сэндвич-схемы анализа.

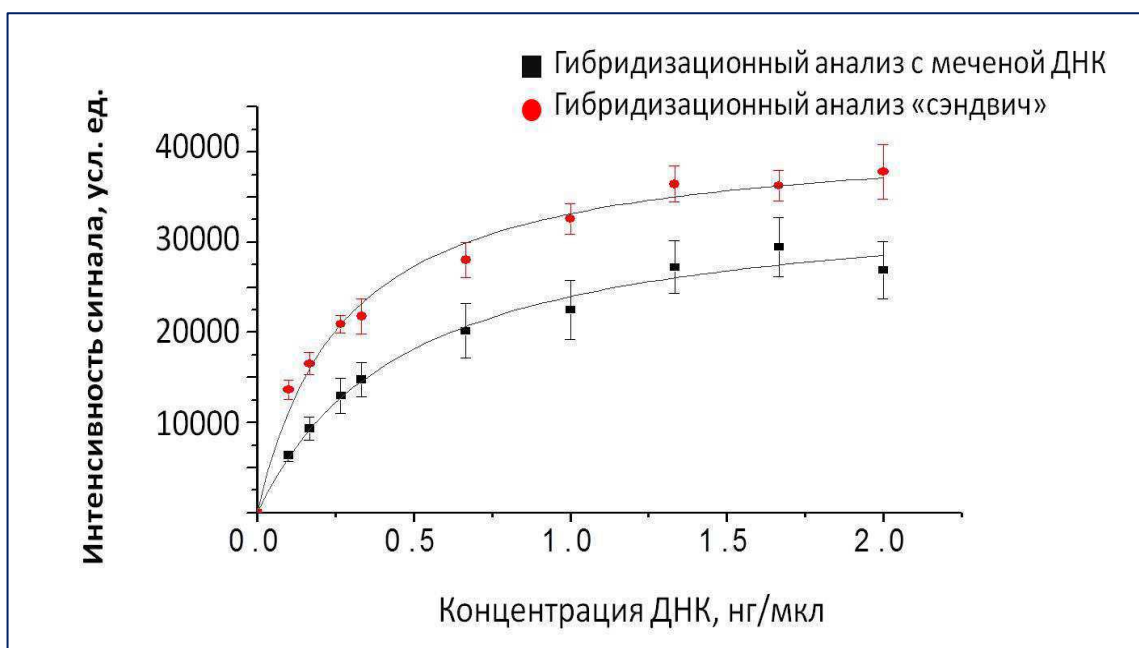


Рис. 55. Градуировочные графики определения гена карбапенемазы VIM-2 методом гибридного анализа на колориметрических микрочипах с использованием двух схем гибридации.

Для двух схем гибридного анализа с использованием меченой и немеченой ДНК-мишени были рассчитаны пределы обнаружения. Они приведены в таблице 20. Формулы для расчёта предела обнаружения приведены в разделе 6.2.15 данной работы. Предел обнаружения для сэндвич-схемы анализа был меньше в два раза, что говорит о большей чувствительности анализа с использованием данной схемы гибридации.

Таблица 20.

Аналитические характеристики определения гена карбапенемазы VIM-2 методом гибридного анализа на микрочипах

Схема гибридации	Предел обнаружения, нг/мкл	Коэффициент вариации, %
Прямая схема	0,04	15
Сэндвич схема	0,02	9

В целом полученные аналитические характеристики свидетельствуют о хорошей чувствительности и воспроизводимости метода гибридного анализа на олигонуклеотидных микрочипах.

Таким образом, введение второго зонда в реакцию гибридации приводит к увеличению чувствительности и специфичности анализа. Преимущества сэндвич-схемы состоят также в большем выходе немеченой ДНК-мишени в реакции амплификации. Далее для проведения идентификации карбапенемаз методом гибридного анализа на олигонуклеотидных микрочипах использовали сэндвич-схему гибридации.

## **ГЛАВА 9. МИКРОЧИП ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ КАРБАПЕНЕМАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОЙ ДНК-МИШЕНИ**

Целью следующего этапа работы являлась разработка микрочипа для идентификации генов карбапенемаз с использованием немеченой ДНК-мишени и двух типов зондов – «улавливающих» и «детектирующих».

### **9.1. Дизайн олигонуклеотидного микрочипа для проведения сэндвич-гибридизации для идентификации генов карбапенемаз**

Общий вид разработанного олигонуклеотидного микрочипа изображён на рисунке 56. Он содержит зонды для идентификации 8 типов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM и OXA), а также дополнительного типирования генов ферментов по 13 подгруппам (VIM-1, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11, IMP-12, OXA-23, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-58). Общее количество специфических зондов 42: по два идентификационных зонда на каждый из восьми типов карбапенемаз и по два олигонуклеотидных зонда для дополнительного типирования генов по подгруппам.

Также каждый микрочип содержит три типа контрольных олигонуклеотидов:

контроль иммобилизации (олигонуклеотид, меченный биотином),

положительный контроль гибридизации (олигонуклеотид, нуклеотидная последовательность которого комплементарна меченному биотином олигонуклеотиду, добавляемому к гибридизационной смеси),

отрицательный контроль гибридизации (олигонуклеотид со случайной последовательностью оснований).

Для повышения воспроизводимости анализа каждый олигонуклеотидный зонд наносился на микрочип в трех повторах.

Разработанный олигонуклеотидный микрочип имеет следующие параметры: размер микрочипа: 8 мм×11 мм, диаметр одной точки: 350 мкм, количество точек: 150.

При проведении анализа в гибридизационную смесь к ДНК-мишени добавляются 12 «детектирующих» зондов для выявления образующихся в процессе гибридизации ДНК-дуплексов «улавливающих» зондов с анализируемой ДНК: 6 зондов для детекции шести типов метало-бета-лактамаз (молекулярный класс В), один зонд для обнаружения генов ферментов KPC типа (молекулярный класс А) и по одному зонду на каждую подгруппу OXA-карбапенемаз (молекулярный класс D).



Рис. 56. Расположение специфических «улавливающих» и контрольных олигонуклеотидных зондов на микрочипе для определения генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D.

## 9.2. Тестирование контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз

Олигонуклеотидные микрочипы были протестированы с использованием образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов микроорганизмов - продуцентов карбапенемаз различных типов. Для сравнения результатов, полученных на различных микрочипах в разных опытах, значения абсолютных интенсивностей сигналов переводили в относительные – значения нормировали на интенсивность положительного контроля гибридизации. Олигонуклеотидные микрочипы были протестированы с использованием 13 образцов ДНК, выделенных из охарактеризованных контрольных штаммов микроорганизмов - продуцентов карбапенемаз различных типов (VIM-1, VIM-4, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-48, KPC-3). Сведения об образцах приведены в таблице 21. Во всех образцах гены карбапенемаз были правильно идентифицированы.

На рисунке 57 приведены результаты тестирования образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих металло-бета-лактамазы VIM-1 (а) и NDM-1 (б). По интенсивностям гибридизации исследуемой ДНК с идентификационными зондами определяли тип группы, к которой относится ген фермента в изучаемом образце. По интенсивностям гибридизации с подгрупп-специфическим зондами проводили дополнительное типирование гена по определению типа подгруппы.



На рисунке 58 (а) приведены результаты гибридизационного анализа контрольного штамма микроорганизма-продуцента ОХА-карбапенемазы ОХА-48 на ДНК-микрочипе. Разработанный микрочип позволяет успешно идентифицировать гены карбапенемаз в смеси, что продемонстрировано на примере тестирования штамма микроорганизма, продуцирующего одновременно две бета-лактамазы ОХА-40 и ОХА-51 (рис. 58 б).

Таблица 21

Контрольные штаммы микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз.

Номер штамма	Микроорганизм	Тип продуцируемой карбапенемазы
М. 12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1
М. 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-2
М. 238	<i>Escherihia coli</i>	VIM-4
М. 292	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-7
М. 11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP-1
М. 14	<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP-2
М. 295	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM-1
М.64	<i>Klebsiella pneumonie</i>	NDM-1
М.22	<i>Klebsiella pneumonie</i>	KPC-3
К. 44	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-23, OXA-51
К. 30	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-40, OXA-51
Р. 1744	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-58, OXA-51
М.12	<i>Klebsiella pneumonie</i>	OXA-48

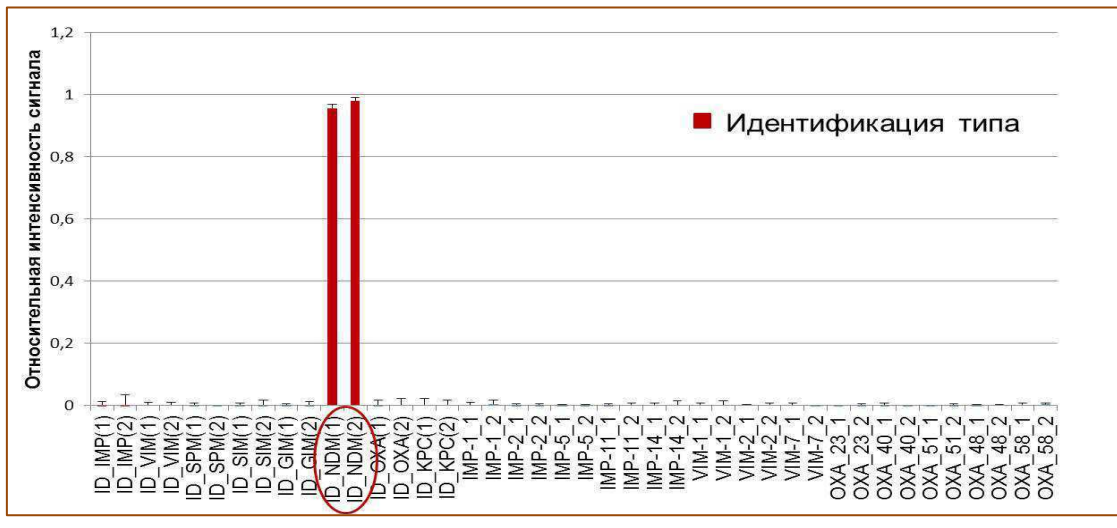
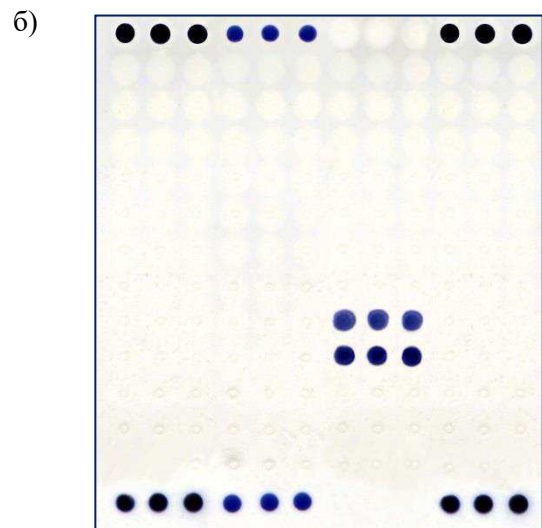
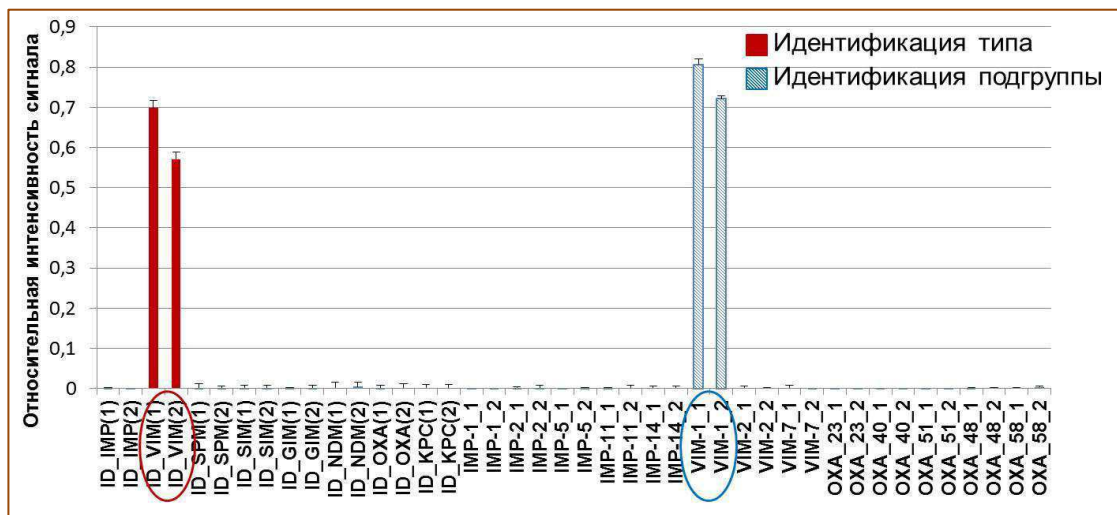
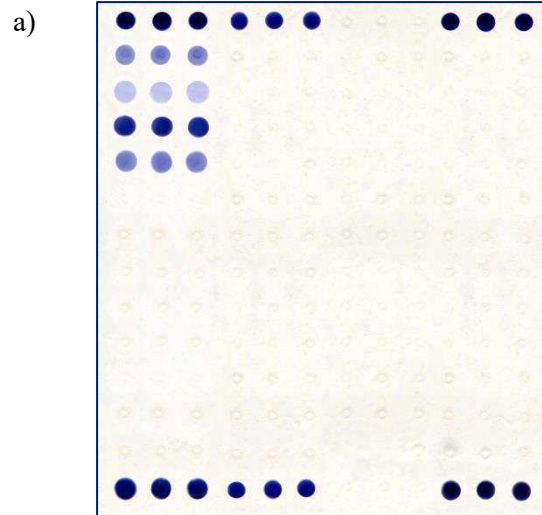


Рис. 57. Результаты тестирования контрольных штаммов-продуцентов МБЛ а) VIM-1, б) NDM-1 методом гибридационного анализа в сэндвич-варианте на олигонуклеотидных микрочипах.

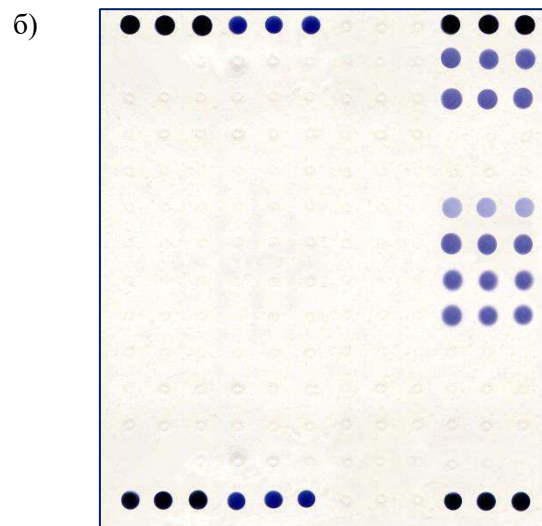
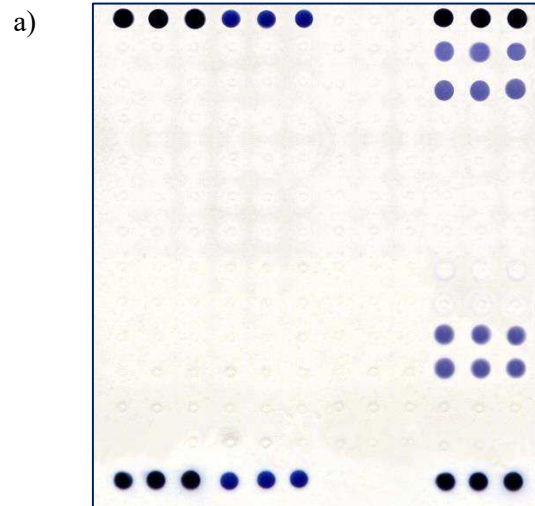


Рис. 58. Результаты тестирования контрольных штаммов, продуцирующих ОХА-карбапенемазы: а) ОХА-48, б) смесь карбапенемаз подгрупп ОХА-40 и ОХА-51 методом гибридационного анализа в сэндвич-варианте на олигонуклеотидных микрочипах.

## **ГЛАВА 10. ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ДНК-МИКРОЧИП ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАРБАПЕНЕМАЗ, БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА И ИНГИБИТОР-РЕЗИСТЕНТНЫХ БЕТА-ЛАКТАМАЗ**

Следующей задачей работы было исследование возможности совмещения разработанных олигонуклеотидных микрочипов для идентификации карбапенемаз молекулярных классов А, В и D с олигонуклеотидным микрочипом для диагностики бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV и CTX-M типов), разработанным в нашей лаборатории ранее [241].

На настоящий момент известно 178 TEM бета-лактамаз, 118 SHV бета-лактамаз и 90 бета-лактамаз CTX-M-типа. В данные группы ферментов входят бета-лактамазы, имеющие различные спектры субстратной специфичности: бета-лактамазы широкого спектра, гидролизующие только пенициллины и цефалоспорины первого поколения; БЛРС, которые наряду с пенициллинами и ранними цефалоспоридами обладают способностью гидролизовать цефалоспорины последних поколений и монобактамы; бета-лактамазы, устойчивые к действию классических ингибиторов сериновых бета-лактамаз (ИРТ); а также ферменты, имеющие как расширенный спектр субстратной специфичности, так и проявляющие устойчивость к ингибиторам – бета-лактамазы смешанного типа (СМТ). Набор олигонуклеотидных зондов для идентификации типов трех типов бета-лактамаз молекулярного класса А и ключевых позиций однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), кодирующих ключевые мутации в ферментах, обуславливающие изменение профиля субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам, был разработан в нашей лаборатории ранее [241].

Для идентификации на интегрированном микрочипе была выбрана прямая схема гибридизационного анализа с использованием фрагментированной меченой ДНК-мишени, так как сэндвич-схема не позволяет эффективно определять ОНП в генах.

### **10.1. Дизайн интегрированного олигонуклеотидного микрочипа для определения карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А**

Расположение олигонуклеотидных зондов на поверхности микрочипа представлено на рисунке 59. Интегрированный микрочип содержит 116 специфических олигонуклеотидных зондов:

- 19 зондов для идентификации 11 типов бета-лактамаз,
- 30 зондов для определения 17 подгрупп ферментов,

- 67 зондов для определения ОНП: 8 - в бета-лактамазах TEM типа, 6 - в бета-лактамазах SHV типа, 2 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-1, 5 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-2 и 3 - в бета-лактамазах подгруппы CTX-M-9.

Помимо специфических зондов каждый микрочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидов. Каждый олигонуклеотид наносился на микрочип в 3-х повторах.

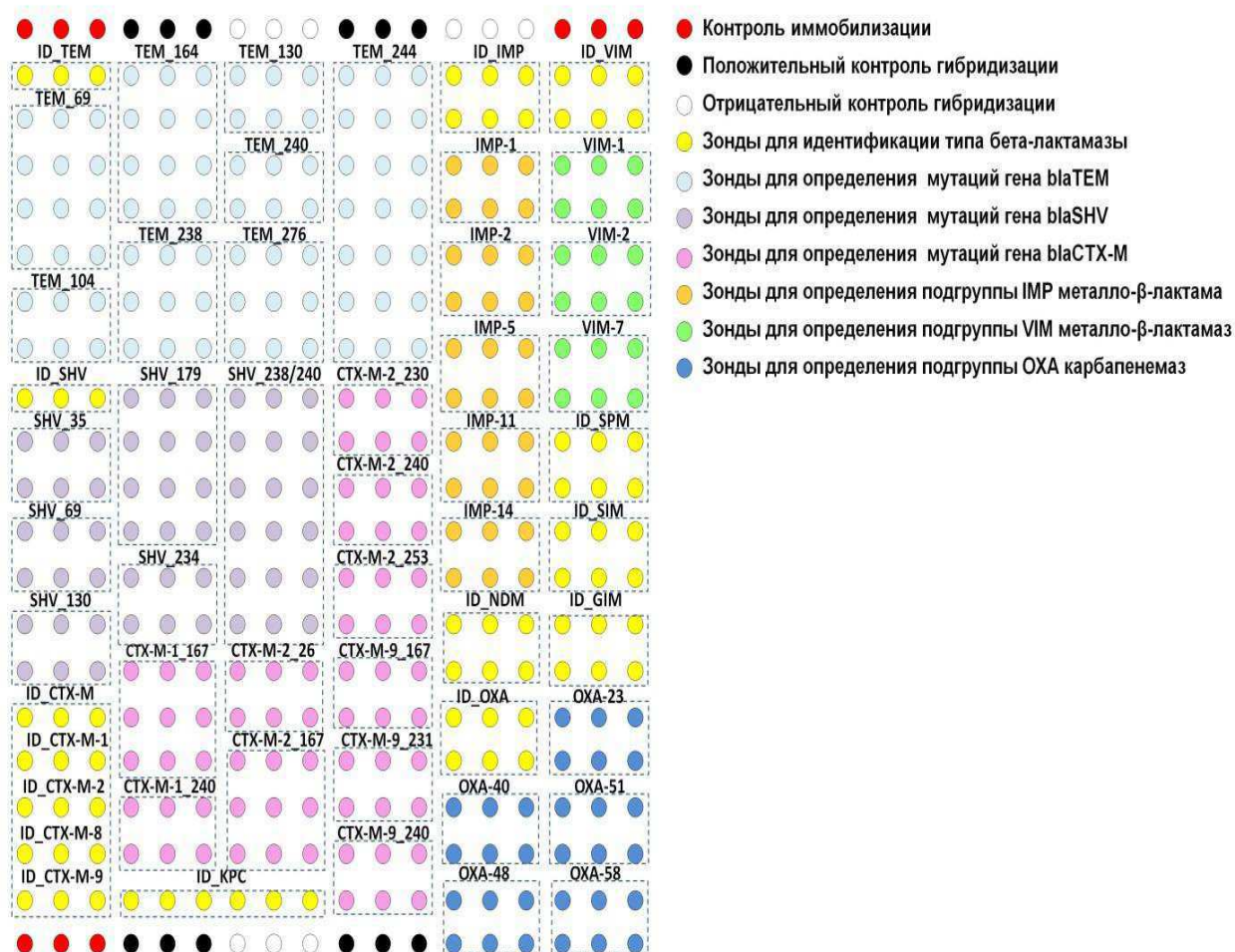


Рис. 59. Расположение олионуклеотидных зондов на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе для диагностики карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А.

## 10.2. Тестирование образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз, БЛРС и ИРТ

Далее проводилось тестирование интегрированного ДНК-микрочипа для определения генов карбапенемаз, БЛРС и ИРТ на образцах ДНК, выделенной из охарактеризованных контрольных штаммов бактерий-продуцентов бета-лактамаз.

Проведено тестирование 13 образцов, содержащих карбапенемазы VIM-1, VIM-4, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58, OXA-48, KPC-3. Сведения об образцах приведены в таблице 21 (раздел 9.2 данной работы). ДНК, выделенную

из контрольных образцов, амплифицировали в процессе одной мультиплексной ПЦР для амплификации генов БЛРС и карбапенемаз с одновременным введением биотина в качестве метки, разработанной в данной работе (см. раздел 6.4.). Затем проводили гибридизацию 300 нг полученной ДНК с зондами, иммобилизованными на поверхности олигонуклеотидного микрочипа.

Изображение олигонуклеотидного микрочипа после проведения анализа, а также значения интенсивности гибридизационного сигнала в относительных единицах, полученные в результате тестирования контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих карбапенемазы ОХА-23 и ОХА-51, приведены на рисунке 60. Для всех протестированных образцов наблюдался высокий аналитический сигнал. С использованием объединенного олигонуклеотидного микрочипа удалось специфично детектировать гены карбапенемаз. Кросс-гибридизации с зондами для идентификации генов бета-лактамаз молекулярного класса А не было выявлено.

Аналогично проводилось тестирование контрольных образцов бета-лактамаз молекулярного класса А. Результаты гибридизационного анализа образцов ДНК, выделенной из контрольных штаммов-продуцентов ТЕМ-1, SHV-1, SHV-5 и СТХ-М-15 на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе для типирования карбапенемаз показали, что типы генов для каждой позиции мутации были определены правильно (рис. 61). Неспецифической кросс-гибридизации с зондами для идентификации генов карбапенемаз не наблюдали. Специфичность определения WT/MT была высокой – 70,5 % ММ-зондов имели значения относительных интенсивностей  $RI_{MM}$ , не превышающих 0,1, значения  $RI_{MM}$  для остальных ММ-зондов находились в диапазоне от 0,1 до 0,5.

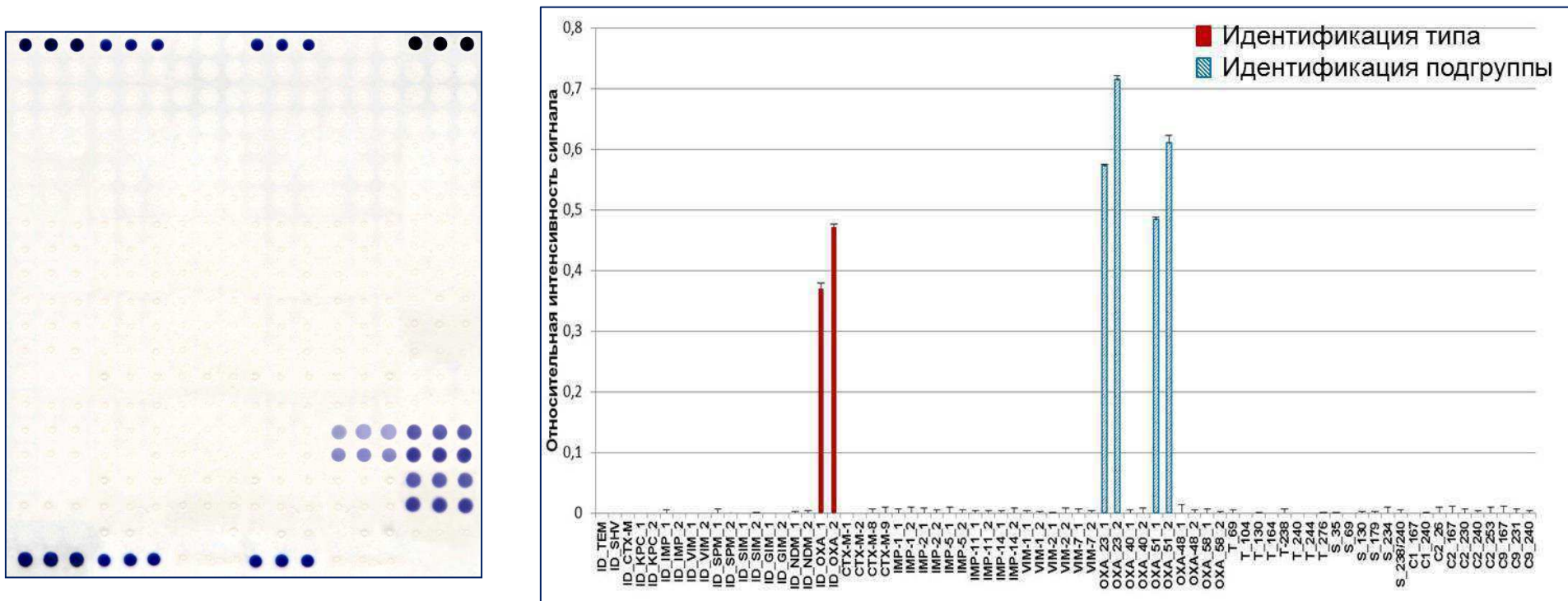


Рис. 60. Результаты гибридизационного анализа контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз группы OXA на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе для идентификации карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса A.

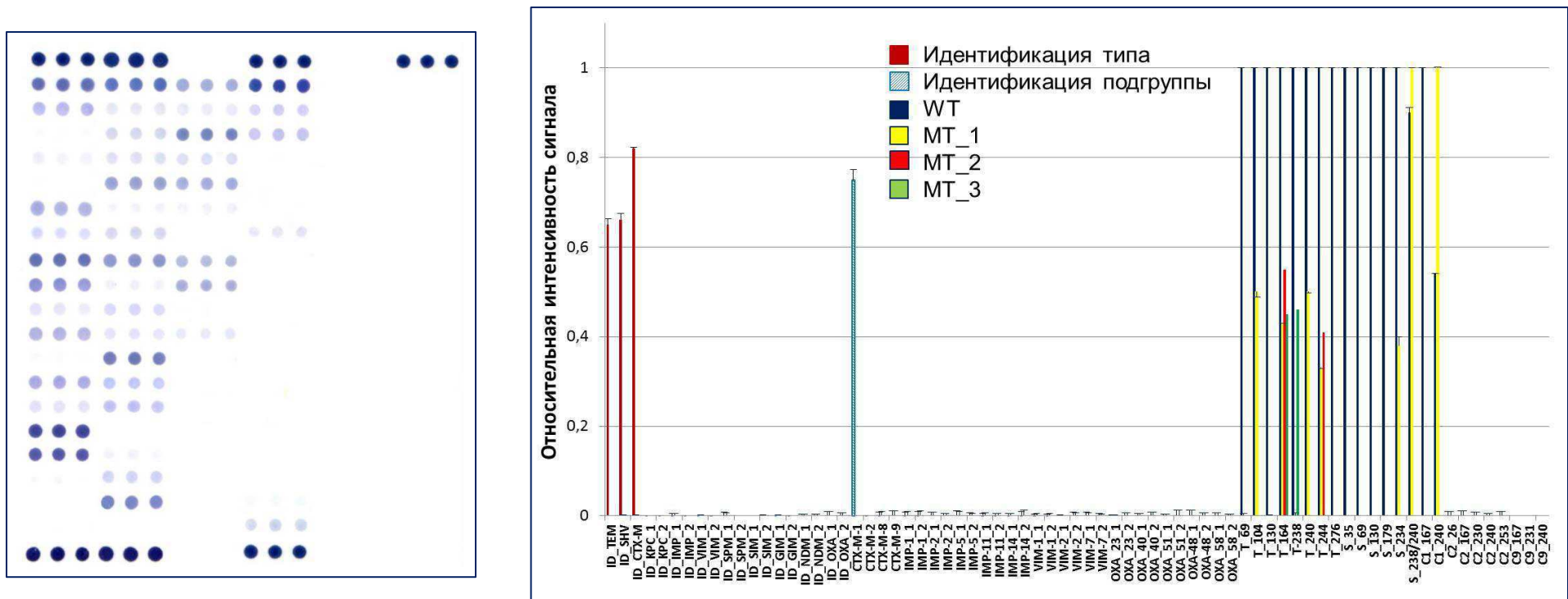


Рис. 61. Результаты гибридационного анализа образца ДНК, выделенной из контрольного штамма, продуцирующего бета-лактамазы широкого спектра (TEM-1, SHV-1) и БЛРС (SHV-5, CTX-M-15) на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе для идентификации карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А.



### 10.3. Тестирование смесей генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А

Одним из главных преимуществ олигонуклеотидных микрочипов является способность идентификации нескольких генов в одном образце. Возможность одновременной детекции генов данных ферментов была исследована на искусственно приготовленных смесях ДНК различных бета-лактамаз:

смесь № 1 была получена из образцов ДНК карбапенемазы OXA-48 и бета-лактамазы SHV-5 (из литературных данных известно, что данная карбапенемаза часто продуцируется совместно с генами БЛРС),

смесь № 2 состояла из ДНК металло-бета-лактамазы NDM-1 и бета-лактамазы CTX-M-9,

смесь №3 состояла из ДНК металло-бета-лактамаз VIM-1 и VIM-2 (эти гены принадлежат к одному типу, но различным подгруппам карбапенемаз).

Для проведения гибридизационного анализа 1 мкл образца ДНК из каждой смеси брали для проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации генов карбапенемаз и БЛРС. Далее 1000 нг полученной меченной биотином ДНК вносили в реакцию гибридизации с олигонуклеотидными зондами на поверхности ДНК-микрочипов. Изображения, полученные в результате гибридизационного анализа смесей №; 1, 2, 3 после детекции метки и сканирования олигонуклеотидных микрочипов представлены на рис. 62-64.

Все смеси бета-лактамаз правильно и достоверно идентифицировались на олигонуклеотидном микрочипе. При детекции смеси № 1 удалось достоверно идентифицировать карбапенемазу OXA-48 и БЛРС типа SHV. Для смеси № 2 высокие аналитические сигналы указывают на продукцию бета-лактамазы NDM-типа и БЛРС подгруппы CTX-M-9. При проведении гибридизационного анализа образца смеси № 3 на ДНК-микрочипе получены точки, которые свидетельствуют о продукции, по крайней мере, двух ферментов VIM-типа, относящихся к подгруппам VIM-1 и VIM-2. Таким образом, разработанный интегрированный олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз, БЛРС и ингибитор-устойчивых бета-лактамаз молекулярного класса А способен проводить высокоспецифическую идентификацию генов бета-лактамаз даже при одновременной продукции нескольких ферментов в одном образце.

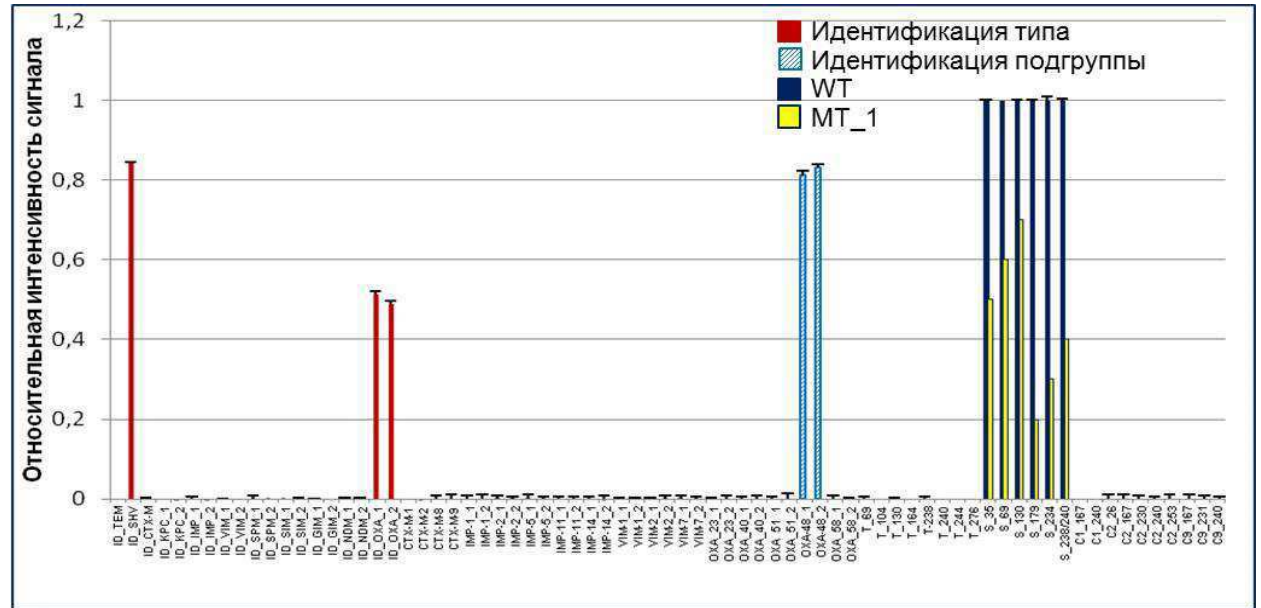
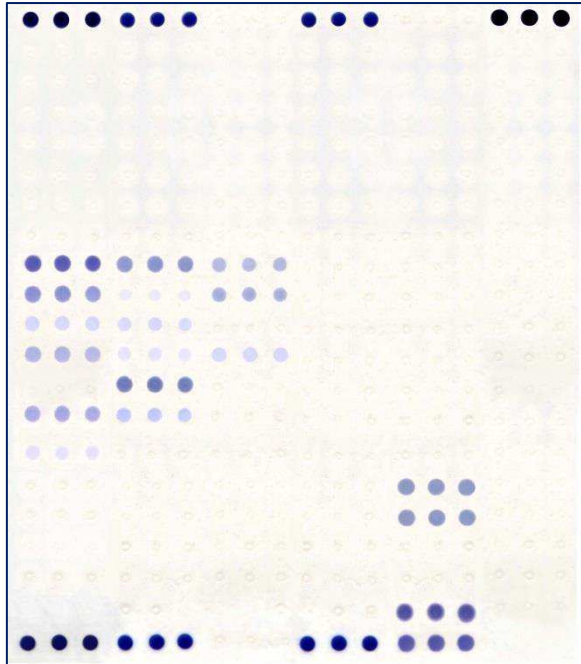


Рис. 62. Результаты гибридационного анализа смесей контрольных штаммов-производителей карбапенемазы OXA-48 и БЛРС SHV-5 на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе.

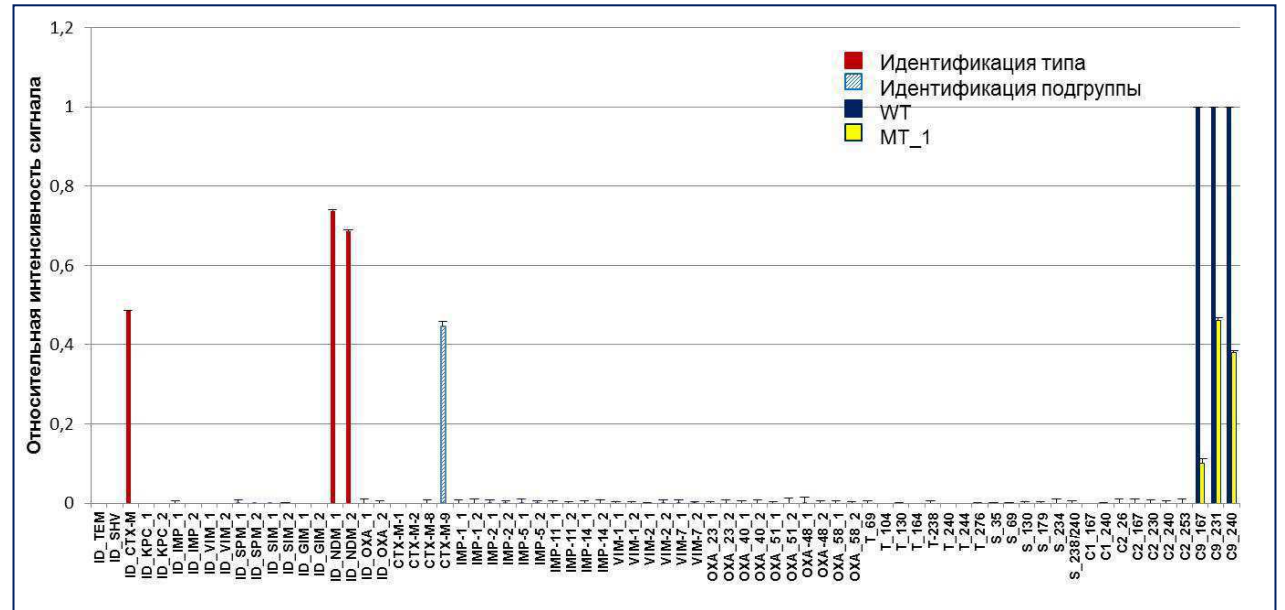
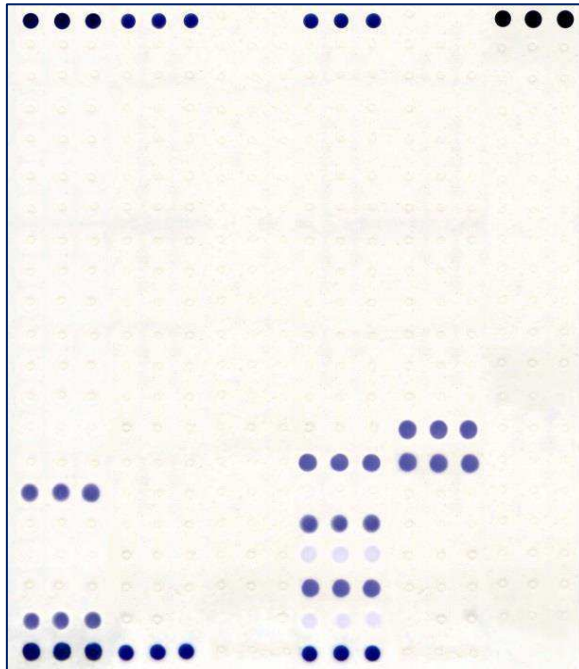


Рис. 63. Результаты гибридационного анализа смеси ДНК контрольных штаммов-продуцентов карбапенемазы NDM-1 и БЛРС CTX-M-9 на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе.

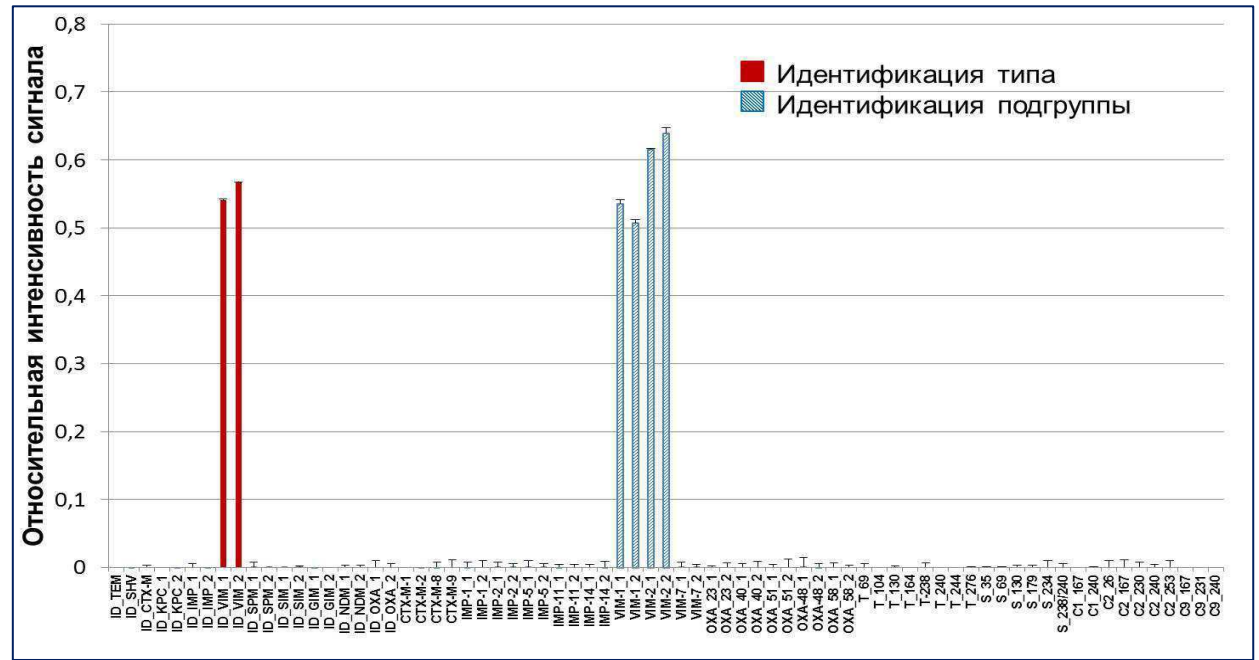
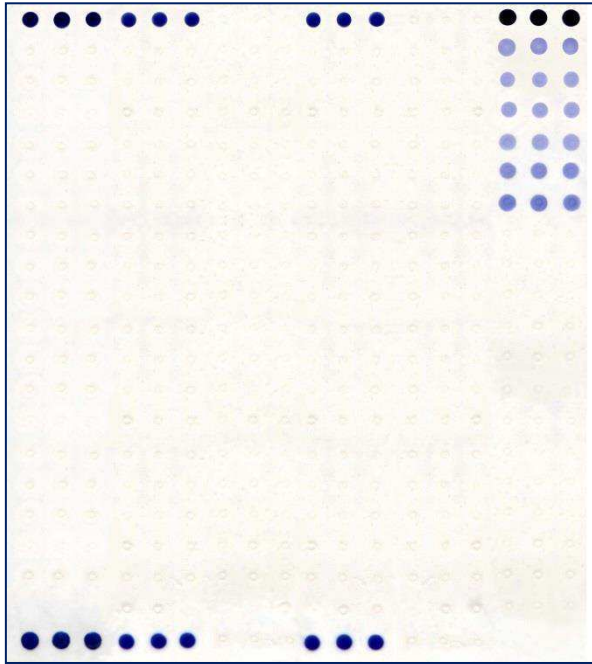


Рис. 64. Результаты гибридационного анализа смеси ДНК контрольных штаммов-продуцентов карбапенемаз VIM-4 и VIM-2 на интегрированном олигонуклеотидном микрочипе.

#### 10.4. Влияние состава ДНК-мишени на специфичность гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах

Для идентификации генов на интегрированном микрочипе предлагается использовать разработанную в работе мультиплексную ПЦР. Однако, мультиплексная ПЦР в присутствии смеси большого числа праймеров может сопровождаться синтезом неспецифических продуктов реакции. Представляло интерес изучение влияния состава ДНК-мишени и наличия в образце побочных продуктов амплификации на специфичность гибридизационного анализа на микрочипах.

Мы провели гибридизационный анализ на микрочипах образцов генов бета-лактамаз после их амплификации методом ПЦР со специфическими праймерами и после амплификации методом мультиплексной ПЦР, в результате которой образуется как целевой продукт, так и побочные продукты. Результаты электрофореза продуктов специфической и мультиплексной амплификации гена карбапенемазы VIM-2 приведены на рис. 65. Результаты гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах образца гена карбапенемазы VIM-2, амплифицированного ПЦР со специфическими праймерами и мультипраймерной ПЦР, приведены на рисунках 66, 67.

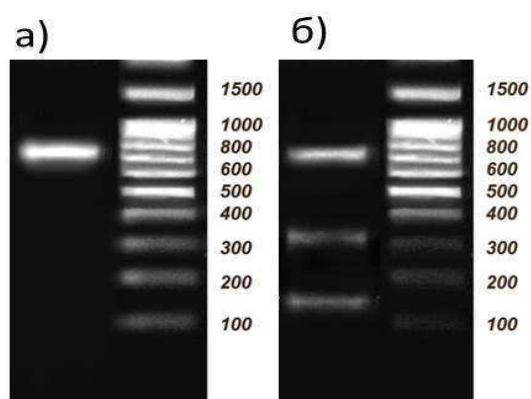


Рис. 65. Результаты электрофореза на агарозном геле образца карбапенемазы VIM-2 после ПЦР со специфическими праймерами (а) и после мультиплексной ПЦР (б).

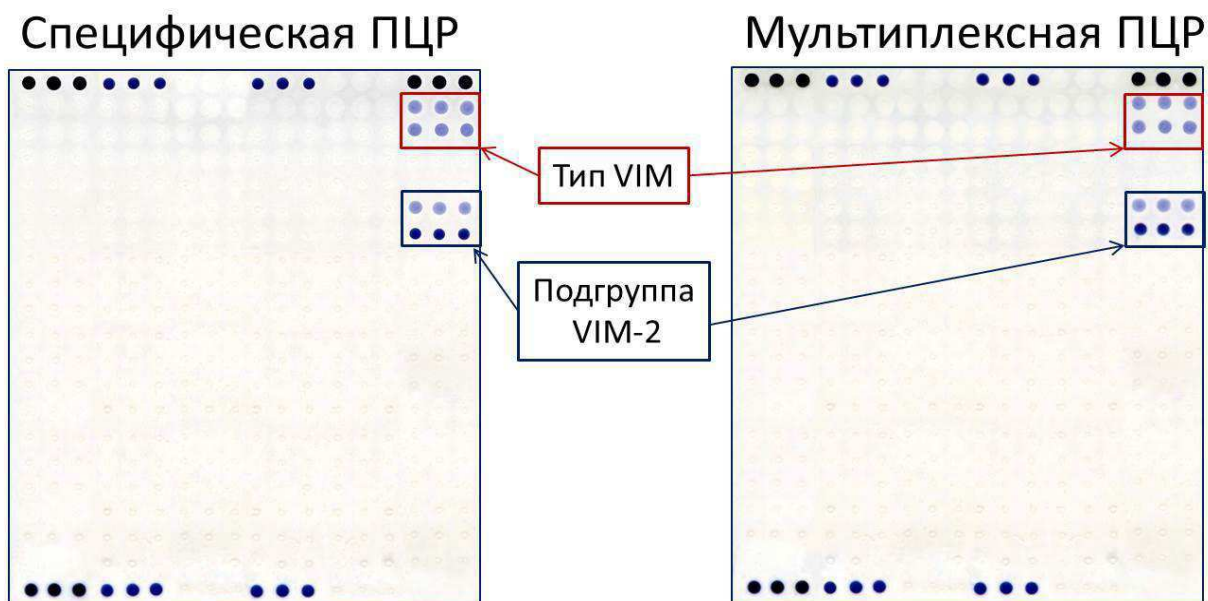


Рис. 66. Изображения, полученные в результате гибридационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах образца карбапенемазы VIM-2 после ПЦР со специфическими праймерами и после мультиплексной ПЦР.

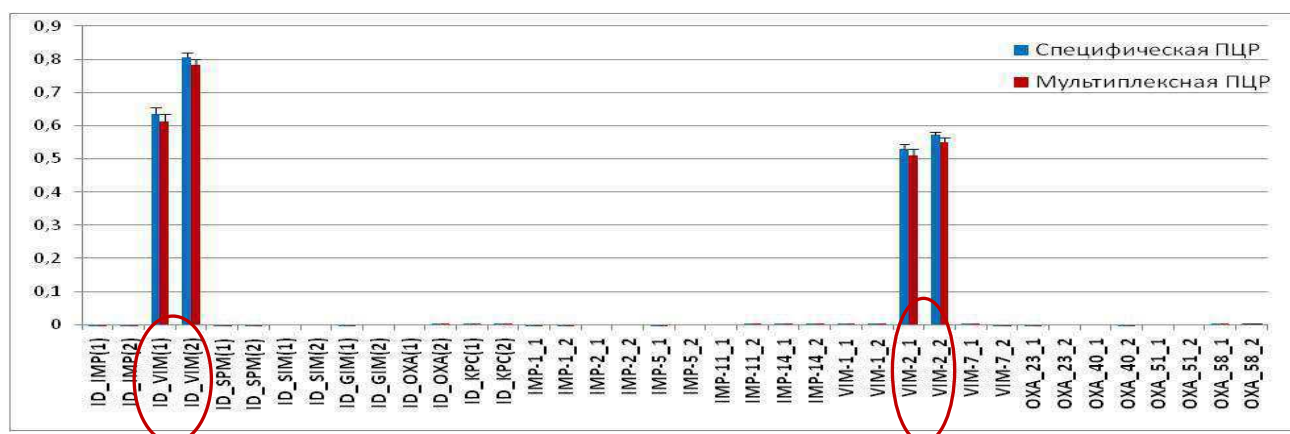


Рис. 67. Значения интенсивности аналитического сигнала в относительных единицах, полученные в результате гибридационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах образца карбапенемазы VIM-2 после ПЦР со специфическими праймерами и после мультиплексной ПЦР.

Специфичность идентификации генов на олигонуклеотидных микрочипах была одинаково высокой для обоих типов амплификации – ПЦР со специфическими праймерами или для мультиплексной ПЦР с образованием неспецифических побочных продуктов. Таким образом, было показано, что метод гибридационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах характеризуется высокой специфичностью идентификации генов даже при использовании ПЦР-продуктов низкой специфичности.

## ГЛАВА 11. АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ МИКРОЧИПАХ

Важной стадией разработки анализа является апробация его эффективности на реальных объектах. В процессе данной работы созданы два олигонуклеотидных микрочипа:

1. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз восьми типов методом гибридизационного анализа в сэндвич-варианте с использованием немеченой ДНК-мишени;

2. Интегрированный олигонуклеотидный микрочип для одновременной идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов) с использованием меченой ДНК-мишени.

Были изготовлены экспериментальные серии олигонуклеотидных микрочипов двух типов и проведена их апробация с использованием ДНК, выделенной из клинических образцов грамотрицательных микроорганизмов.

### 11.1. Апробация олигонуклеотидных микрочипов для идентификации генов карбапенемаз 8 типов методом гибридизационного анализа с использованием немеченой ДНК-мишени

Апробация олигонуклеотидных микрочипов для проведения анализа с использованием немеченой ДНК-мишени проведена на 31 образце ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов с различным уровнем чувствительности к карбапенемам по данным фенотипических тестов. ДНК, выделенная из штаммов бактерий была предоставлена НИИ нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко и НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Данные по тестированию клинических образцов методом гибридизационного анализа представлены в таблице 22.

Среди 12 образцов *Acinetobacter baumannii*, 10 были резистентными к действию карбапенемов. В них обнаружены гены карбапенемаз молекулярного класса D, принадлежащих подгруппам ОХА-23 (один образец), ОХА-40 (5 образцов), ОХА-51 (10 образцов), ОХА-58 (4 образца). Следует отметить, что во всех 10 образцах *Acinetobacter baumannii*, устойчивых к действию карбапенемов, идентифицированы гены хромосомно-кодируемой карбапенемазы подгруппы ОХА-51.

Из 13 клинических образцов штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, способностью расщеплять карбапенемы, по данным фенотипирования, обладали 11 образцов. Во всех

устойчивых к действию карбапенемов образцах *Pseudomonas aeruginosa* мы обнаружили гены карбапенемаз подгруппы VIM-2, широко распространенных в настоящее время на территории Российской Федерации. В одном образце ДНК, выделенной из бактерий *Klebsiella pneumoniae*, резистентных к карбапенемам, идентифицирован ген карбапенемазы типа NDM. При тестировании 9 образцов ДНК, выделенной из штаммов микроорганизмов, чувствительных к действию карбапенемов, гены карбапенемаз не были обнаружены.

Таблица 22

Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов, на олигонуклеотидных микрочипах

Чувствительность к карбапенемам	Тип микроорганизма	Число образцов	Типы найденных карбапенемаз					
			Подгруппа OXA-23	Подгруппа OXA-40	Подгруппа OXA-51	Подгруппа OXA-58	Подгруппа VIM-2	Тип NDM
Резистентные (n=22)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	n=10	1	5	10	4	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n=11	-	-	-	-	11	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n=1	-	-	-	-	-	1
Чувствительные (n=9)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	n=2	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n=2	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n=3	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	n=2	-	-	-	-	-	-

Таким образом, при апробации олигонуклеотидных микрочипов для идентификации восьми типов генов карбапенемаз не было выявлено ни ложно-положительных, ни ложно-отрицательных результатов. Результаты анализа клинических образцов полностью соответствуют данным, полученным методами фенотипирования. Метод характеризуется 100% чувствительностью и специфичностью.

## 11.2. Апробация интегрированного олигонуклеотидного микрочипа для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А с использованием меченой ДНК-мишени

Разработанный интегрированный олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А был апробирован на 68 образцах ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов, полученных в



различных лечебных учреждениях РФ. Все образцы были предварительно охарактеризованы фенотипически с использованием диско-диффузионного метода: 19 образцов ДНК бактерий, чувствительных к действию карбапенемов и цефалоспоринов 3-4 поколений, 22 образца ДНК, выделенной из штаммов микроорганизмов, устойчивых к карбапенемам, 27 образцов ДНК бактерий, устойчивых к действию цефалоспоринов 3-4 поколений и обладающих фенотипом БЛРС(+). Также наличие генов бета-лактамаз в устойчивых к бета-лактамам антибиотикам образцах было подтверждено секвенированием и методом ПЦР в реальном времени.

Для 30 образцов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, 10 образцов *Acinetobacter baumannii* и 11 образцов штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в процессе мультиплексной ПЦР была получена меченая ДНК. Для каждого полученного ПЦР-продукта было проведено два независимых эксперимента по гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах.

Результаты анализа 68 образцов ДНК, выделенной клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacteriaceae spp.*, представлены на рисунке 68. Данные об образцах ДНК и выявленных в них генах бета-лактамаз приведены в приложении 4.

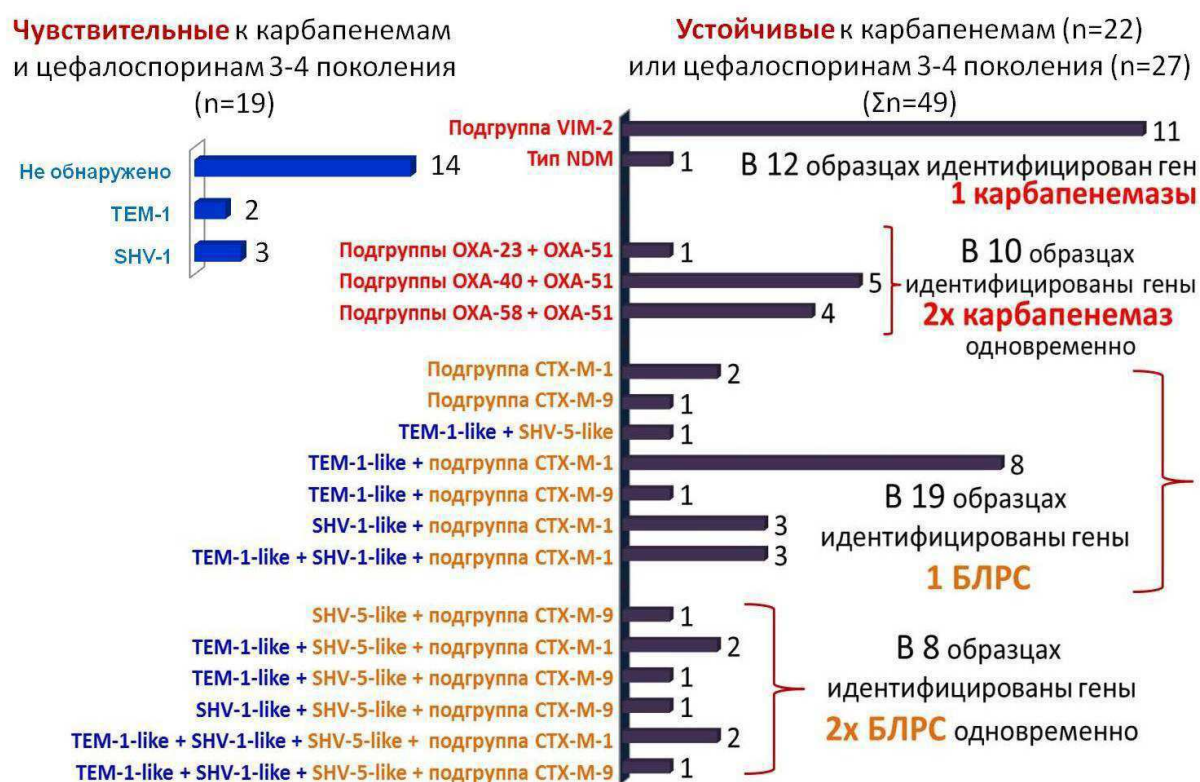


Рис. 68. Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов на интегрированном микрочипе.

При тестировании 19 образцов ДНК, выделенных из штаммов микроорганизмов, чувствительных к действию карбапенемов и цефалоспоринов 3-4 поколений, в 5 образцах ДНК представителей *Enterobacteriaceae spp.* были идентифицированы гены пенициллиназ TEM-1 и

SHV-1, в 14 образцах гены бета-лактамаз исследуемых типов не обнаружены. Таким образом, ложноположительных результатов тестирования клинических образцов не наблюдалось.

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

Среди 27 образцов ДНК бактерий, устойчивых к цефалоспорином 3-4 поколений в 19 образцах идентифицированы гены одной бета-лактамазы расширенного спектра (типа CTX-M (n=18) или SHV (n=1)), в 8 образцах идентифицированы гены одновременно двух БЛРС. Ложноотрицательных результатов при тестировании клинических образцов не было выявлено. Идентификация генов бета-лактамаз на микрочипах показала 100 % совпадение с данными микробиологического фенотипирования, секвенирования и метода ПЦР в реальном времени. Отличие от данных секвенирования состояло только в том, что секвенирование позволяет провести полное генотипирование, т.е. определить, ген какого фермента обнаружен. Разработанный микрочип, как и метод ПЦР в реальном времени, позволяет правильно определить тип фермента, его подгруппу и наличие ключевых (функциональных) мутаций в ферменте, определяющих профиль субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании разработан принцип идентификации разнородных и близкородственных генов в одном анализе на микрочипах с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена. Этот принцип может быть реализован с использованием двух схем гибридизационного анализа ДНК.

Для идентификационного анализа генов преимущества, состоящие в более высокой чувствительности и более высокой специфичности, показаны для сэндвич-схемы анализа с использованием немеченой ДНК-мишени и двух типов зондов. Другим преимуществом данной схемы является более высокий выход немеченой ДНК-мишени в мультиплексной ПЦР.

Мультианализ генов различных типов с одновременной идентификацией однонуклеотидного полиморфизма может проводиться на микрочипах с использованием другой схемы анализа: гибридизации меченой биотином ДНК-мишени с иммобилизованными зондами.

Для мультианализа генов бета-лактамаз на микрочипах оптимизированы условия мультиплексных ПЦР, позволяющих получать ампликоны ДНК-мишеней различной длины с выходом 40-80 нг/мкл.

Разработана технология гибридизационного анализа на колориметрических микрочипах с использованием, в основном, отечественных реагентов и принципа детекции результатов анализа, не требующего дорогостоящего оборудования. Сконструированы два типа микрочипов для идентификации карбапенемаз отдельно и совместно с наиболее клинически значимыми типами бета-лактамаз. Проведена апробация микрочипов с использованием ДНК, выделенной из клинических образцов штаммов-возбудителей внутрибольничных инфекций. Разработанный метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах для идентификации генов карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А характеризуется хорошей точностью и производительностью. Важной особенностью метода является высокая селективность идентификации смесей генов в одном образце.

Идентификация генов карбапенемаз на ДНК-микрочипах позволяет осуществлять быструю диагностику: анализ от выделения ДНК из культуры клеток до получения конечного результата занимает около 4 ч, включая 0,5 ч на выделение бактериальной ДНК, 40 минут на амплификацию генов карбапенемаз, 1,5 ч на гибридизацию с последующей отмывкой и 1 ч на колориметрическую детекцию результатов гибридизации.

Разработанная технология мультианализа генов на микрочипах является перспективной для внедрения в практику здравоохранения.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан принцип одновременной идентификации генов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA типов) с дополнительным разделением на подгруппы на микрочипах с колориметрической детекцией.
2. Оптимизирован метод мультиплексной ПЦР для получения немеченой и меченой биотином ДНК-мишени с выходом продукта реакции 40-80 нг/мкл.
3. Проведен молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов для одновременной идентификации 8 типов и 13 подгрупп генов карбапенемаз. Исследовано влияние структурных параметров «улавливающих» и «детектирующих» зондов на специфичность и чувствительность мультианализа генов.
4. Проведено сравнение двух схем анализа: гибридизации меченой биотином ДНК-мишени с «улавливающими» зондами и гибридизации немеченой ДНК-мишени с «улавливающими» и «детектирующими» зондами. Метод сэндвич-гибридизации характеризовался более высокой чувствительностью и специфичностью анализа.
5. Разработан микрочип для идентификации 8 типов генов карбапенемаз (KPC, VIM, IMP, SPM, NDM, SIM, GIM, OXA) с использованием сэндвич-гибридизационного анализа. Проведена апробация олигонуклеотидных микрочипов на 31 образце ДНК, выделенной из клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacteriaceae spp.*
6. Разработан интегрированный микрочип для идентификации карбапенемаз и бета-лактамаз молекулярного класса А (TEM, SHV, CTX-M типов). Показана высокая специфичность идентификации нескольких генетических детерминант устойчивости у мультирезистентных бактерий. Проведена апробация интегрированного микрочипа на 68 образцах ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов. Установлена 100% корреляция результатов идентификации с данными микробиологического фенотипирования, ПЦР в реальном времени и секвенирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases // *Ann NY Acad Sci.* – 2013. – V. 1277. – P. 84–90.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2014. – Т. 16, – № 4 – С. 254-265.
3. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'Souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S., Sukhorukova M.V., Pavlukov R.A., Kozlov R.S., Toleman M.A., Walsh T.R. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study // *Lancet Infect Dis.* – 2013. – V. 13, № 10. – P. 867-876.
4. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance, World Health Organization <http://www.who.int/drugresistance/en/> (2014).
5. Rubtsova M.Y., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2010. – V. 26. – P. 1252–1260.
6. Ambler R.P. The structure of beta-lactamases // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 1980. – V. 289. – №. 1036. – P. 321-331.
7. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* // *British Journal of Experimental Pathology.* – 1929. – V. 10. – P. 226-236.
8. Macfarlane G. Howard Florey, the making of a great scientist // Oxford University Press, London. – 1979. – 416 P.
9. Bush K., Bradford P.A.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2016. – V. 6. – No. 8. – P. 1-22.
10. Tipper D.J., Strominger J.L. Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine // *Proc Natl Acad Sci.* – 1965. – V. 54. – P. 1133– 1141.
11. Georgopapadakou N., Hammarstrom S., Strominger J.L. Isolation of the penicillin-binding peptide from D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis* // *Proc Natl Acad Sci.* – 1977. – V. 74 – P. 1009– 1012.
12. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. Т. 1 / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, – 2011. – С. 314-316.
13. Otero L.H., Rojas-Altuve A., Llarrull L.I., Carrasco-Lopez C., Kumarasiri M., Lastochkin E., Fishovitz J., Dawley M., Heseck D., Lee M. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function // *Proc Natl Acad Sci.* – 2013. – V. 110. – P. 16808–16813.
14. Gonzales P.R., Pesesky M.W., Bouley R., Ballard A., Biddy B.A., Suckow M.A., Wolter W.R., Schroeder V.A., Burnham C.A., Mobashery S. Synergistic, collaterally sensitive  $\beta$ -lactam combinations suppress resistance in MRSA // *Nature Chem Biol.* – 2015. – V.11. – P. 855–861.

15. Белобородов В.Б., Грувер К.П. Карбапенемы в современной клинической практике // Российский медицинский журнал. – 2010. – №17. – С. 1037.
16. Moellering R.C., Eliopoulos G.M., Sentochnik D.E. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics // J. Antimicrob. Chemother. – 1989. – V. 24. – P. 1-7.
17. Козлов Р.С., Никулин А.А. Эртапенем – представитель новой группы карбапенемов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009. – Т. 11. – № 1. – С. 40-55.
18. Kiratisin P., Chongthaleong A., Tan T.Y., Lagamayo E., Roberts S., Garcia J., Davies T. Comparative in vitro activity of carbapenems against major Gram-negative pathogens: Results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study // Int J Antimicrob Agents. – 2012. – V. 39. – P. 311–316.
19. Zhanel G.G., Wiebe R., Dilay L., Thomson K., Rubinstein E., Hoban D.J., Noreddin A.M., Karlowsky J.A. Comparative review of the carbapenems // Drugs. – 2007. – V. 67. – P. 1027–1052.
20. Dagan R., Velghe L., Rodda J.L., Klugman K.P. Penetration of meropenem into the cerebrospinal fluid of patients with inflamed meninges // J Antimicrob Chemother. – 1994. – V. 34. –P. 175–179.
21. Livermore D.M., Sefton A.M., Scott G.M. Properties and potential of ertapenem // J Antimicrob Chemother. – 2003. – V.52. – P. 331-344.
22. Hammond M.L. Ertapenem: a Group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties // J. Antimicrob. Chemother. – 2004. – V. 2. – P. 117-119.
23. Hammoudi D. Moubareck C.A. Moubareck D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods // Journal of Microbiological Methods. – 2014. – V. 107. – P. 106-118.
24. Kattan J.N., Villegas M.V., Quinn J.P. New developments in carbapenems // Clin Microbiol Infect. – 2008. – V. 14. – P. 1102–1111.
25. Prescott W.A., Gentile A.E., Nagel J.L., Pettit R.S. Continuous infusion antipseudomonal  $\beta$ -lactam therapy in patients with cystic fibrosis // P&T. – 2011. – V. 36. – № 11. – P. 723-763.
26. Nordmann P., Picazo J., Mutters R., Korten V., Quintana A., Laeuffer J., Seak J., Flamm R., Morrissey I. Comparative activity of carbapenem testing: The COMPACT study // J Antimicrob Chemother. – 2011. – V. 66. – P. 1070–1078.
27. Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A., Bonomo R.A. Carbapenems: Past, present, and future // Antimicrob Agents Chemother. – 2011. – V. 55. – P. 4943-4960.
28. Fujimoto K., Takemoto K., Hatano K., Nakai T., Terashita S., Matsumoto M., Eriguchi Y., Eguchi K., Shimizudani T., Sato K. Novel carbapenem antibiotics for parenteral and oral applications: In vitro and in vivo activities of 2-aryl carbapenems and their pharmacokinetics in laboratory animals // Antimicrob Agents Chemother. – 2013. – V. 57. – P. 697-707.
29. Livermore D.M., Mushtaq S. Activity of biapenem (RPX2003) combined with the boronate  $\beta$ -lactamase inhibitor RPX7009 against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae // J Antimicrob Chemother. – 2013. – V. 68. – P. 1825-1831.
30. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin // Nature. – 1940. – V. 146. – P. 837.

31. Massova I., Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1998. – V. 42. – P. 1-17.
32. Bonomo R.A.  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2017. V. 7. – No 1. doi: 10.1101/cshperspect.a025239.
33. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime // *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* – 2013. – V. 1. – P. 7-16.
34. Li H., Luo Y-F., Williams B.J., Blackwell T.S., Xiea C-M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies // *Int J Med Microbiol.* – 2012. – V. 302. – № 2. – P. 63-68.
35. Jacoby G., Mills D.M. Role of  $\beta$ -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other  $\beta$ -lactams in *Klebsiella Pneumoniae* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – P. 3203-3206.
36. Gutierrez O., Juan C., Cercenado E., Navarro F., Bouza E., Coll P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals // *Antimicrob Agents and Chemother.* – 2007. – V. 51. – P. 4329-4335.
37. Quale J., Bratu S., Gupta J., Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates // *Antimicrob Agents and Chemother.* – 2006. – V. 50. – P. 1633-1641.
38. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives // *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* – 2016. – V. 3. – № 1. – P. 15-21.
39. Meletis, G., Exindari M., Vavatsi N., Sofianou D., Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *Hippokratia.* – 2012. – V. 16. – P. 303-307.
40. Bush K. Characterization of  $\beta$ -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1989. – V. 33. – P. 259–263.
41. Bush K., Jacoby G. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V.54. – P. 969-976.
42. Bush K. The ABCD's of beta-lactamase nomenclature // *J Infect Chemother.* – 2013. – V. 19. – P. 549-559.
43. Queenan, A. M., Foleno B., Gownley C., Wira E., Bush K. Effects of inoculum and  $\beta$ -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – V. 42. – P. 269–275.
44. Queenan A.M., Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – V.20. – P. 440-458.
45. Rasmussen J.W., Hoiby N. Class A carbapenemases // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – V. 60. – P. 470-482.
46. Jean S-S., Lee W-S., Lam C., Hsu C-W., Chen R-J., Hsueh P-R. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options // *Future Microbiol.* – 2015. – V. 10. – № 3. – P. 407–425.
47. Nordmann P., Cuzon G. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria // *Lancet. Infect. Dis.* – 2009. – V. 9. – P. 228–236.

48. Chiu S.K., Wu T.L., Chuang Y.C. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase // PLoS One. – 2013. – V. 8. № 7. – P. 69428.
49. Landman D., Bratu S., Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* // J. Med. Microbiol. – 2009. – V. 58. – No. 10. – P. 1303-1308.
50. Bratu S., Landman D., Haag R. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium // Arch. Intern. Med. – 2005. – V. 165. – № 12. – P. 1430–1435.
51. Patel J.B., Rasheed J.K. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. // Clinical Microbiology Newsletter. 2009. V.31. P. 55-62.
52. Diene S. M., Rolain J.-M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species // Clin Microbiol Infect. – 2014. – V. 20. – P. 831–838.
53. Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues // Clin. Microbiol. Infect. – 2010. – V. 16. – P. 112-122.
54. Bradford P.A., Bratu S. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City // Clin. Infect. Dis. – 2004. – V.39. – P. 55-60.
55. Johnson J.K., Wilson L.E., Zhao L., Richards K., Thom K.A., Harris A.D. Point prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Maryland // Infect. Control Hosp. Epidemiol. // – 2014. – V. 35. – № 4. – P. 443–445.
56. Lee C.R. Lee J.H., Park K.S., Kim Y.B., Jeong B.C., Lee S.H. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods // Front Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 895.
57. Giani T., Pini B., Arena F., Conte V., Bracco S., Migliavacca R. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey // Euro Surveill. – 2013. – V. 18. – No. 22.
58. Navon-Venezia S., Chmelnitsky I., Leavitt A., Schwaber M.J., Schwartz D., Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – V. 50. – № 9. – P. 3098–3101.
59. Yoo J.S., Kim H.M., Yoo J.I. Detection of clonal KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Korea during nationwide surveillance in 2011 // J. Med. Microbiol. – 2013. – V. 62. – № 9. – P. 1338–1342.
60. Jean S.S., Hsueh P.R. Spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Asia // Future Microbiol. – 2014. – V. 9. – No. 3. – P. 273-275.
61. Lefebvre B., Lévesque S., Bourgault A.M., Mulvey M.R., Mataseje L., Boyd D., Doualla-Bell F., Tremblay C. Carbapenem non-susceptible enterobacteriaceae in Quebec, Canada: results of a laboratory surveillance program (2010-2012) // PLoS One. – 2015. –V. 10. – No. 4. – e0125076.
62. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gramnegative bacteria in Saint



- Petersburg, Russia // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2014. – V. 44. – No. 2. – P. 152-155.
63. Poole K. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics // Cell. Mol. Life. Sci. – 2004. – V. 61. – P. 2200-2223.
64. Bebrone C. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily // Biochemical pharmacology. – 2007. – V. 74. – P. 1686-1701.
65. Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. – 1991. – V. 35. – No. 1 – P. 147-151.
66. Riccio M.L., Franceschini N., Boschi L. Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – V. 44. – No. 5. – P. 1229-1235.
67. Hung K.H., Yan J.J., Lu J.J., Chen H.M., Wu J.J. Characterization of the modified Hodge test-positive isolates of *Enterobacteriaceae* in Taiwan // J. Microbiol. Immunol. Infect. – 2013. – V. 46. – No. 1 – P. 35-40.
68. Koyano S., Saito R., Nagai R. Molecular characterization of carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a teaching hospital, Japan // J. Med. Microbiol. – 2013. – V. 62. – No. 3. – P. 446-450.
69. Walsh T.R., Toleman M.A. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? // Clinical Microbiology reviews. – 2005. – V. 18. – P. 306-325.
70. Koratzanis E., Souli M., Galani I., Chryssouli Z., Armaganidis A., Giamarellou H. Epidemiology and molecular characterisation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a university hospital Intensive Care Unit in Greece // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2011. – V. 38. – No. 5. – P. 390-397.
71. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A *et al.* Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – V. 43. – No. 7. – P. 1584-1590.
72. Poirel L, Naas T, Nicolas D *et al.* Characterization of VIM-2, a carbapenem hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – V. 44. – No. 4. – P. 891-897.
73. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – V. 18. – No. 5. – P. 413-431.
74. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- $\beta$ -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – V. 48. – No. 1. – P. 329-332.
75. Yong D, Toleman MA, Giske CG Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – V. 53. – No. 12. – P. 5046-5054.

76. Molton JS, Tambyah PA, Ang BS, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: A perspective from Asia // *Clin Infect Dis* – 2013. – V. 56. – P. 1310-1318.
77. Zhang H.M., Hao Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common  $\beta$ -lactam hydrolysis mechanism // *The FASEB Journal*. – 2011. – V. 25. – P. 2574-2582.
78. Groundwater P.W. , Xu S., Lai F., Varadi L., Tan J. Perry J.D., Hibbs D.E. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1: structure, inhibitors and detection of producers // *Future Med. Chem.* – 2016. doi: 10.4155/fmc-2016-0015.
79. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria // *BioMed Research International*. – 2014. – V. 2014. – No. 249856. – P. 1-12.
80. Zmarlica M.I., Nailor M.D., Nokolau D.P. Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics // *Infection and Drug Resistance*. – 2015. – V. 8. – P. 297-309.
81. Li J, Nation RL, Turnidge JD et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections // *Lancet Infect. Dis.* – 2006. – V. 6. – P. 589–601.
82. Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Поненко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2013. – Т. 58. – No. 3. – С. 10-13.
83. Wei W-J., Yang H-F., Li J-B. New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern // *Chinese Medical Journal*. – 2014. – V. 128. – No. 14. – P. 1969-1976.
84. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study // *Lancet Infect Dis*. – 2011. – V. 11. – P. 355-62.
85. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M-2011 D. M. Livermore, T. R. Walsh, M. Toleman, and N. Woodford, “Balkan NDM-1: escape or transplant? // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2011. – V. 11. – No. 3. – P. 164.
86. Rasmussen J.W., Hoiby N. OXA-type carbapenemases // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – V. 57. – P. 373-383.
87. Antunes N.T., Fisher J.F. Acquired Class D  $\beta$ -Lactamases // *Antibiotics*. – 2014. – V. 3. – P. 398-434.
88. Heritier C., Poirel L., Aubert D., Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – V. 47. – P. 268–273.
89. Paton R., Miles R.S., Hood J., Amyes S.G. ARI 1:  $\beta$ -Lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 1993. – V. 2. – P. 81–87.
90. Mendes R.E., Bell J.M., Turnidge J.D., Castanheira M., Jones R.N. Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: Report from the sentry surveillance program // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – V. 63. – P. 55–59.
91. Carvalho K.R., Carvalho-Assef A.P., Peirano G., Santos L.C., Pereira M.J., Asensi M.D. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla OXA-23

- collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – V. 34. – No. 1. – P. 25–28.
92. Turton J.F., Kaufmann M.E., Glover J. et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – V. 43. – No. 7. – P. 3074–3082.
  93. Stoeva T., Higgins P.G., Bojkova K., Seifert H. Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2008. – V. 14. – No. 7. – P. 723–727.
  94. Lee M.H., Chen T.L., Lee Y.T. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying bla OXA-23 from hospitals in central Taiwan // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2013. – V. 46. – No. 6. – P. 419–424.
  95. Dash N., Panigrahi D., Al Zarouni M. et al. High Incidence of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Sharjah, United Arab Emirates // *Microb. Drug Resist.* – 2014. – V. 20. – No. 1. – P. 52–56.
  96. Poirel L., Heretier C. Chromosome-Encoded Ambler Class D  $\beta$ -Lactamase of *Shewanella oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – P. 348-351.
  97. Werneck J.S., Picao R.C., Carvalhaes C.G., Cardoso J.P., Gales A.C. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: A case report // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – V. 66 – P. 452–44.
  98. Sevillano E., Gallego L., Garcia-Lobo. J.M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii* // *Pathol. Biol. (Paris)* – 2009. – V. 57. – P. 493–495.
  99. Zander E.; Fernández-González A., Schleicher X., Dammhayn C., Kamolovit W., Seifert H., Higgins P.G. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii* // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2014. – V. 43. P. 375–377.
  100. Montealegre M.C., Maya J.J., Correa A., Espinal P., Mojica M.F., Ruiz S.J., Rosso F., Vila J., Quinn J.P., Villegas M.V. First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – V. 56. – P. 3996–3998.
  101. Zarrilli R., Giannouli M., Tomasone F., Triassi M., Tsakris A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2009. – V. 3. – No. 5. – P. 335–341.
  102. Quinteira S., Grosso F., Ramos H., Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – V. 51. – P. 3465–3466.
  103. Castanheira M., Deshpande L.M., Mathai D., Bell J.M., Jones R.N., Mendes R.E. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. – No. 3. – P. 1274–1278.
  104. Lolans K., Rice T.W., Munoz-Price L.S., Quinn J.P. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 50. – No. 9. – P. 2941–2945.

105. Kaitany K.C., Klinger N.V., June C.M., Ramey M.E, Bonomo R.A., Powers R.A., Leonard D.A. Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – V. 57. – No. 10. – P. 4848-4855.
106. Poirel L., Naas T., Nordmann P. Diversity, epidemiology and genetics of Class D  $\beta$ -lactamases. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – P. 24-38.
107. Lin, Y.C., Sheng W.H., Chen Y.C., Chang S.C., Hsia K.C., Li S.Y. Differences in carbapenem resistance genes among *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* genospecies 3 and *Acinetobacter* genospecies 13tu in Taiwan // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2010. – V. 35. – No. 3. – P. 439–443.
108. Evans B.A., Hamouda A., Towner K.J., Amyes S.G. Novel genetic context of multiple bla OXA-58 genes in *Acinetobacter* genospecies 3 // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – V. 65. – P. 1586–1588.
109. Coelho J., Woodford N., Afzal-Shah M., Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – V. 50. – P. 756–758.
110. Brown S., Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – V. 57. – P. 1-3.
111. Carrër A., Poirel L., Yilmaz M. et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – No. 3. – P. 1369–1373.
112. Moquet O., Bouchiat C., Kinana A. et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrugresistant enterobacteria, Senegal // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – V. 17. – No. 1. – P. 143–144.
113. Poirel L., Heritier C., Tolun V., Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumonia* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – P. 15–22.
114. Cuzon G., Naas T., Lesenne A., Benhamou M., Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenemhydrolysing OXA-48  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2010. – V. 36. – No. 1. – P. 91–93.
115. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge // *Med. Mal. Infect.* – 2014. – V. 44. – № 2. – P. 51–56.
116. Poirel L., Castanheira M., Carrër A. et al. OXA-163, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. – No. 6. – P. 2546–2551.
117. Steward C.D., Rasheed J.K. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 2864-2872.
118. Meher R., Nazish F. Extended spectrum AmpC and metallo-beta-lactamases in *Serratia* and *Citrobacter* spp. in a disc approximation assay // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2009. – V. 3. – P. 285-294.
119. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2014. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (accessed 28 December 2013):

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/EUCAST\\_guidelines\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_121222.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf).

120. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24 USA. Wayne, PA, USA: CLSI.
121. Nordmann P., Gniadkowski M., et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – V. 18. – No. 5. – P. 432–438.
122. Huang T.D., Poirel L., Hrabac J., Poirel L., Bogaerts P. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers // *J Antimicrob Chemother.* – 2014. – V. 69. – P. 445–50.
123. Hrabac J., Chudakova E., Pappagiannitsis C.C. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – V. 20. – P. 839–853.
124. Bratu S., Mooty M., et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – V. 49. – No. 7. – P. 3018–3020.
125. Hodge W., Ciak J., Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* // *J Clin Microb* – 1978. – V. 7. – P. 102 – 103.
126. Lee K., Chong Y., Shin H.B. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species // *Clin Microbiol Infect.* – 2001. – V. 7. – P. 88–91.
127. Moland E.S., Hong S.G. Newer  $\beta$ -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications // *Clinical Microbiology Newsletter.* – 2008. – V. 30. – P. 79–85.
128. Hornstein M., Sautjeau-Rostoker C., et al. Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – V. 153. – No. 2. – P. 333–339.
129. Girlich D., Poirel L. and Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae // *J Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50. – P. 477–479.
130. Pasteran F., Mendez T., Guerriero L., Rapoport M., Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae // *J Clin Microbiol.* – 2009. – V. 47. – P. 1631–1639.
131. Yong D., Lee K. and Yum J.H. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp // *J Clin Microbiol.* – 2002. – V. 40. – P. 3798–3801.
132. Kali A., Srirangaraj S., Kumar S., Divya H.A., Kalyani A., Umadevi S. Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units // *Australasian Medical Journal.* – 2013. – V. 6. – No. 12. – P. 686–693.
133. Шевченко О.В., Эдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло- $\beta$ -лактамазы: значения и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий // *Клин микробиол антимикроб химиотер.* – 2007. – V. 9. – С. 211–218.

134. Girlich D., Halimi D., Zambardi G., Nordmann P. Evaluation of Etest® MBL strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2013. – V. 77. – P. 200-201.
135. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases // *J Gen Microbiol.* – 1975. – V. 88. – No. 1. – P. 169-178.
136. Schneider I., Queenan A.M., et al. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea promenusa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – V. 50. – No. 4. – P. 1330–1335.
137. Yang Y., Bush K. Biochemical characterization of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase AsbM1 from *Aeromonas sobria* AER 14 M: a member of a novel subgroup of metallo-beta-lactamases // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. – V. 137. – No. 2–3. – P. 193–200.
138. Wolter D.J., Kurpiel P.M., et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-Antimicrob // *Agents Chemother.* – 2009. – V. 53. – No. 2. – P. 557–562.
139. Bernabeu S., Poirel L., et al. Spectrophotometry-based detection of carbapenemas producers among Enterobacteriaceae // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – V. 74. – No. 1. – P. 88–90.
140. Bialvaei A.Z., Kafil H.S., Asgharzadeh M., Memar M.Y., Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases // *Journal of Chemotherapy.* – 2016. – V. 28. – No. 1. – P. 1-19.
141. Dortet L., Poirel L. and Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – V. 56. – P. 6437–6440.
142. Tijet N., Boyd D., Patel S.N., Mulvey M.R., Melano R.G. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother*– 2013. – V. 57. – P. 4578–4580.
143. Gallagher L.C., Roundtree S.S., Lancaster D.P., Rudin S.D., Bard J.D., Roberts A.L. Performance of the CLSI Carba NP and the Rosco Carb screen assays using North American carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates // – 2015. – V. 53. – P. 3370e3.
144. Yusuf E., Van Der Meeren S, Schallier A., Pierard D. Comparison of the Carba NP test with the Rapid CARB Screen Kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2014. – V. 33. – No. 12. – P. 2237–40.
145. Dortet L., Poirel L., Errera C. and Nordmann, P. CarbAcinet NP test for rapid detection of carbapenemase-producers in *Acinetobacter* spp // *J Clin Microbiol.* – 2014. – V. 52. – P. 2359–2364.
146. Sekyere J.O., Govinden U., Essack S. Y. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria // *Journal of Applied Microbiology.* – 2015. – V. 119. – P. 1219-1233.
147. Pires J., Novais A. and Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures // *J Clin Microbiol.* – 2013. – V. 51. – P. 4281–4283.

148. Viau R., Frank K.M., Jacobs M.R., Wilson B., Kaye K., Donskey C.J., Perez F., Endimiani A., Bonomo R.A. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods // *Clin Microbiol Rev.* – 2016. – V. 29. – P. 1-27.
149. Aguirre-Quinonero A., Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates // *J Infect Chemother.* – 2016. – P. 1-11.
150. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J Clin Microbiol.* – 2011. – V. 49. – P. 3222-3227.
151. Hrabák J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis // *Clin Microbiol Rev.* – 2013. – V. 26. – P. 103 – 114.
152. Alvarez-Buylla A., Picazo J.J., et al. Optimized method for Acinetobacter species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – V. 51. – No. 5. – P. 1589–1592.
153. Kempf M., Bakour S., Flaudrops C., Berrazeg M., Brunel J.-M., Drissi M., Mesli E., Touati A. Rapid detection of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // *PLoS One* – 2012. – V. 7. – P. e31676.
154. Hoyos-Mallecot Y., Riazco C., Miranda-Casas C., Rojo Martín M., Gutierrez-Fernandez J. Navarro-Mari J. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS // *J Microbiol Methods.* – 2014. – V. 105. – P. 98–101.
155. Lutgring J.D., Brandi M. Limbago. The Problem of Carbapenemase Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Detection // *J. Clin. Microbiol.* – 2016. – V.. – №. – P. .
156. Carricajo A., Verhoeven P.O., Guezzou S., Fonsale N., Aubert G. Detection of carbapenemase-producing bacteria using the ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – V. 58. – P. 1231-1234.
157. Koivunen M.E.K.R. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories // *Lab. Med.* – 2006. – V. 37. – № 8. – P. 8.
158. Kitao T., Miyoshi-Akiyama T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo-beta-lactamases that mediate carbapenem resistance in Pseudomonas // *J. Microbiol. Methods.* – 2011. – V. 87. – No. 3. – P. 330–337.
159. Lupo A., Papp-Wallace K.M., Sendi P., Bonomo R.A., Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2013. – V. 77. – P. 179–194.
160. Dallenne C., Da Costa A. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – V. 65. – No. 3. – P. 490–495.
161. Voets G.M., Fluit A.C., Scharringa J., Cohen Stuart J., Leverstein-van Hall M.A. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases and OXA  $\beta$ -lactamases // *Int J Antimicrob Agents.* – 2011. – V. 37. – P. 356 –359.

162. Mendes R.E., Kiyota K.A., Monteiro J. et al. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay and meltcurve analysis // *J Clin Microbiol* – 2007. – V. 45. – P. 544–547.
163. Monteiro J., Widen R.H., Pignatari A., Kubasek C., Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR // *J Antimicrob Chemother.* – 2012. – V. 67. – P. 906–909.
164. Chen L., Mediavalla J.R., Endimiani A. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*blaKPC*) variants // *J Clin Microbiol.* – 2011. – V. 49. – P. 579–585.
165. Swayne R., Ellington M.J., Curran M.D., Woodford N., Aliyu, S.H. Utility of a novel multiplex Taq Man PCR assay for metallo- $\beta$ -lactamase genes plus other Taq Man assays in detecting genes encoding serine carbapenemases and clinically significant extended-spectrum  $\beta$ -lactamases // *Int J Antimicrob Agents.* – 2013. – V. 42. – P. 352–356.
166. Van der Zee A., Roorda L., Bosman G. et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC // *BMC Infect Dis.* – 2014. – V. 14. – P. 27.
167. Hanemaaijer N.M., Nijhuis, R.H.T., Slotboom B.J., Mascini E.M., van Zwet A.A. New screening method to detect carriage of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in patients within 24 hours // *J Hosp Infect.* – 2014. – V. 87. – P. 47–49.
168. Cuzon G., Naas T., Bogaerts P., Glupczynski Y. Nordmann P. Probe ligation and real-time detection of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM carbapenemase genes // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2013. – V. 76. – P. 502–505.
169. Findlay J., Hopkins K.L., Meunier D. and Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria // *J Antimicrob Chemother.* – 2015. – V. 70. – P. 1338-1342.
170. Nijhuis R., Samuelsen Q., Savelkoul P. and van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (CheckDirect CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2013. – V. 77. – P. 316–320.
171. Spanu T., Fiori B., D’Inzeo T., Canu G., Campoli S., Giani T., Palucci I., Tumbarello M. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*blaKPC*) // *J Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50. – P. 2783–2785.
172. Liu W., Zou D., Li Y., Wang X., He X., Wei X., Shao C., Li X. Sensitive and rapid detection of the New-Delhi metallo-beta-lactamase gene by loop-mediated isothermal amplification // *J Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50. – P. 1580–1585.
173. Nakano R., Nakano A., Ishii Y., Ubagai T., Kikuchi-Ueda T., Kikuchi H., Tansho-Nagakawa S., Kamoshida G. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *J Infect Chemother.* – 2015. – V. 21. – P. 202–206.
174. Solanki R., Lavanya Vanjari, Sreevidya Subramanian, Aparna B., Nagapriyanka E., Vemu Lakshmi. Comparative Evaluation of Multiplex PCR and Routine Laboratory Phenotypic Methods for Detection of Carbapenemases among Gram Negative Bacilli // *J Clin Diagn Res.* – 2014. – V. 8. – No. 12. – P. 23-26.



175. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2008. – V. 9. – P. 387–402.
176. Новикова Е.И., Снегирева Г.П. Секвенирование «Нового поколения» (NGS): применение для молекулярно-генетических исследований в онкологии // *Вестник РНЦРР.* – 2016. – V. 16. – No. 1. – С. 1-16.
177. Buermans H.P.J., Den Dunnen J.T. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica // Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease.* – 2014. – V. 1842. – P. 1932–1941.
178. Frickmann H., Wycliffe O.M., Zautner A.E. Emerging Rapid Resistance Testing Methods for Clinical Microbiology Laboratories and Their Potential Impact on Patient Management // *BioMed Research International.* – 2015. – V. 2014. – Article ID 375681.
179. Loman N. J., Misra R. V., Dallman T. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms // *Nature Biotechnology.* – 2012. – V. 30. – No. 5. – P. 434–439.
180. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* – 1975. – V. 98. – P. 503–517.
181. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Science.* – 1995. – V. 270. – P. 467-470.
182. Heller M.J. DNA microarray technology: devices, systems and applications // *Ann. Rev. Biomed.* – 2002. – V. 4. – P. 129-153.
183. Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production // *Anal. Biochem.*, – 2004. – V. 325. – P. 92-106.
184. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., Moroz A., Zasedatelev A., Mirzabekov A. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiology and Infection.* – 2005, – V. 11. – P. 531-539.
185. Leinberger D.M., Grimm V., Rubtsova M., Weile J., Schröppel K., Wichelhaus T.A., Knabbe C., Schmid R.D., Bachmann T.T. Integrated Detection of Extended Spectrum Beta-Lactam Resistance by DNA Microarray-Based Genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes // *J Clin Microbiol.* – 2010. – V. 48. – No. 2. – P. 460-471.
186. Grimm V., Susa M., Knabbe C. Microarray and method for genotyping SHV beta-lactamases // *Patent US 2006/02109 99.*
187. Weille J., Schmid R. DNA microarray for genotyping multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* – 2007. – V. 59. – P. 325–338.
188. Grimm V., Ezaki S. Use of DNA Microarrays for Rapid Genotyping of TEM Beta-Lactamases That Confer Resistance // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – V. 42. – P. 3766-3774.
189. Satoshi E., Cornelius K., Bachmann T.T. Method for microbial antibiotic resistance detection // *European Patent 2005/1580281 A2.*

190. Volokhov D., Chizhikov V. Microarray analysis of erythromycin resistance determinants // *J. of Applied Microbiology*. – 2003. – V. 95. – P. 787-798.
191. Dufva M., Poulsen L. Genotyping of mutation in the beta-globin gene using DNA microarrays // *Methods Mol Biol*. – 2009. – V. 509. – P. 47-56.
192. Monecke S., Ehricht R. Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2005. – V. 11. – P. 825-833.
193. Perreten V., Vorlet-Fawer L., Slickers P., Ehricht R., Kuhnert P., Frey J. Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria // *J Clin Microbiol*. – 2005. – V. 43. – No. 5. – P. 2291–2302.
194. Peter H., Wienke J., Bier F.F. Lab-on-a-Chip Multiplex Assays // *Methods Mol Biol*. – 2017. – V. 1546. – P. 283-294.
195. Sarkar A., Raji A., Garaween G., Soge O., Rey-Ladino J., Al-Kattan W., Shibl A., Senok A. Antimicrobial resistance and virulence markers in methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* isolates associated with nasal colonization // *Microb Pathog*. – 2016. – V. 93. – P. 8-12.
196. Monecke S.1., Müller E., Schwarz S., Hotzel H., Ehricht R. Rapid microarray-based identification of different *mecA* alleles in *Staphylococci* // *Antimicrob Agents Chemother* //– 2012. – V. 56. – No. 11. – P. 5547-5554.
197. Zhu L.X., Zhang Z.W., Liang D., et al. Multiplex asymmetric PCR-based oligonucleotide microarray for detection of drug resistance genes containing single mutations in *Enterobacteriaceae* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2007. – V. 51. – No. 10. – P. 3707–3713.
198. Greve B., Weidner J, Cassens U, Odaibo G, Olaleye D, Sibrowski W, Reichelt D, Nasdala I, Göhde W. A new affordable flow cytometry based method to measure HIV-1 viral load // *Cytometry A*. – 2009. – V. 75. – No. 3. – P. 199-206.
199. Xiao J.M., Xiong J., Kang G.Y., Li Q., Jiang Z.Y., Chen J.H., Wang L.L., Yao F.D., Song J.W. A novel biosensor-based microarray assay for the visualized detection of CYP2C19 2, 3, 4 and 5 polymorphisms // *Clin Chem Lab Med*. – 2015. – V. 53. – No. 2. – P. 217-223.
200. Feinberg A.P., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal Biochem*. – 1983. – V. 132. – No. 1. – P. 6-13.
201. Franke-Whittle I.H., Klammer S.H., Mayrhofer S., Insam H. Comparison of different labeling methods for the production of labeled target DNA for microarray hybridization // *J Microbiol Methods*. – 2006. – V. 65. – No. 1. – P. 117-126.
202. Zou N., Ditty S., Li B., Lo S.C. Random priming PCR strategy to amplify and clone trace amounts of DNA // *Biotechniques*. – 2003. – V. 35. – P. 758-760.
203. Eggeling F., Spielvogel H. Applications of random PCR // *Cell Mol Biol*. – 1995. – V. 41. – No. 5. – P. 653-670.
204. Braun S.D., Monecke S., Thürmer A., Ruppelt A., Makarewicz O., Pletz M., Reißig A1., Slickers P., Ehricht R. Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay // *PLoS One*. – 2014. – V. 7. – e102232.
205. Barken K.B., Gabig-Ciminska M, Holmgren A, Molin S. Effect of unlabeled helper probes on detection of an RNA target by bead-based sandwich hybridization // *Biotechniques*. – 2004. – V. 36. – No. 1. – P. 124-132.

206. Nieminen T., Pakarinen J., Tsitko I., Salkinoja-Salonen M., Breitenstein A., Ali-Vehmas T., Neubauer P. 16S rRNA targeted sandwich hybridization method for direct quantification of mycobacteria in soils // *J Microbiol Methods*. – 2006. – V. 67. – No. 1. – P. 44-55.
207. Soini J., Falschlehner C., Mayer C., Böhm D., Weinel S., Panula J., Vasala A., Neubauer P. Transient increase of ATP as a response to temperature up-shift in *Escherichia coli* // *Microb Cell Fact*. – 2005. – V. 4. – No. 1. – P. 9.
208. Leskela T., Tilsala-Timisjärvi A., Kusnetsov J., Neubauer P., Breitenstein A. Sensitive genus-specific detection of *Legionella* by a 16S rRNA based sandwich hybridization assay // *J Microbiol Methods*. – 2005. – V. 62. – No. 2. – P. 167-179.
209. Pioch D., Jurgen B., Evers S., Maurer K.H., Hecker M., Schweder T. Improved sandwich-hybridization assay for an electrical DNA-chip-based monitoring of bioprocess-relevant marker genes // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2008. – V. 78. – No. 4. – P. 719-728.
210. Rautio J., Barken K.B., Lahdenperä J., Breitenstein A., Molin S., Neubauer P. Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates // *Microb Cell Fact*. – 2003. – V. 2. – No. 1. – P. 4.
211. Preston C.M., Marin R., Jensen S.D., Feldman J., Birch J.M., Massion E.I., Delong E.F., Suzuki M., Wheeler K., Scholin C.A. Near real-time, autonomous detection of marine bacterioplankton on a coastal mooring in Monterey Bay, California, using rRNA-targeted DNA probes // *Environ Microbiol*. – 2009. – V. 11. – No. 5. – P. 1168-1180.
212. Cai Q., Li R., Zhen Y., Mi T., Yu Z. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay // *Harmful Algae*. – 2006. – V. 5. – P. 300-309.
213. Diercks S., Medlin L.K., Metfies K. Colorimetric detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* using sandwich hybridization in a microtiter plate assay // *Harmful Algae*. – 2008. – V. 7. – P. 137-145.
214. Ueno T., Funatsu T. Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – No. 3. – e90920.
215. Iizuka R., Ueno T., Funatsu T. Detection and Quantification of MicroRNAs by Ligase-Assisted Sandwich Hybridization on a Microarray // *Methods Mol Biol*. – 2016. – V. 1368. – P. 53-65.
216. Chevrier D., Oprisan G., Maresca A., Matsiota-Bernard P., Guesdon J-L. Isolation of a specific DNA fragment and development of a PCRbased method for the detection of *Mycobacterium genavense* // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 1999. – V. 23. – P. 243-252.
217. Lee C.Y., Panicker G., Bej A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink NH microwell plate sandwich hybridization // *J Microbiol Methods*. – 2003. – V. 53. – No. 2. – P. 199-209.
218. Li H., He Z. Magnetic bead-based DNA hybridization assay with chemiluminescence and chemiluminescent imaging detection // *Analyst*. – 2009. – V. 134. – No. 4. – P. 800-804.
219. Li H., Sun Z., Zhong W., Hao N., Xu D., Chen H.Y. Ultrasensitive Electrochemical Detection For DNA Arrays Based on Silver Nanoparticle Aggregates // *Anal Chem*. – 2010. – V. 82. – No. 13. – P. 5477-5483.
220. Bao Y.P., Huber M., Wei T.F., Marla S.S., Storhoff J.J., Müller U.R. SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticle probes // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – V. 33. – No. 2. – e15.

221. Yang B., Zhou G., Huang L.L. PCR-free MDR1 polymorphism identification by gold nanoparticle probes // *Anal Bioanal Chem.* – 2010. – V. 397. – No. 5. – P. 1937-1945.
222. Ermini M.L., Mariani S., Scarano S., Minunni M. Direct detection of genomic DNA by surface plasmon resonance imaging: An optimized approach // *Biosens Bioelectron.* – 2013. – V. 40. – No. 1. – P. 193-199.
223. Liu Y., Elsholz B., Enfors S.O., Gabig-Ciminska M. Critical factors for the performance of chip array-based electrical detection of DNA for analysis of pathogenic bacteria // *Anal Biochem.* – 2008. – V. 382. – No. 2. – P. 77-86.
224. Ferapontova E.E., Hansen M.N., Saunders A.M., Shipovskov S., Sutherland D.S., Gothelf K.V. Electrochemical DNA sandwich assay with a lipase label for attomole detection of DNA // *Chem Commun (Camb).* – 2010. – V. 46. – No. 11. – P. 1836-1838.
225. Naas T., Cuzon G., Truong H., Bernabeu S., Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC carbapenemases // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – No. 8. – P. 3086-3092.
226. Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y. Nordmann, P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases // *J Clin Microbiol.* – 2011. – V. 49. – P. 1608–1613.
227. Woodford N., Warner M., Pike R., Zhang J. Evaluation of a commercial microarray to detect carbapenemase-producing Enterobacteriaceae // *J Antimicrob Chemother* – 2006. – V. 66. – P. 2887–2888.
228. Stuart J.C., Voets G., Scharringa J., Fluit A.C., Leverstein Van Hall M.A. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray // *J Med Microbiol* – 2012. – V. 61. – P. 809–812.
229. Bogaerts P., Cuzon G., Evrard S., Hoebeke M., Naas T., Glupczynski Y. Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter // *Int J Antimicrob Agents.* – 2016. – V. 48. – No. 2. – P. 189-193.
230. Sullivan K.V., Deburger B., Roundtree S.S., Ventrola C.A., Blecker-Shelly D.L. and Mortensen J.E. Pediatric multicenter evaluation of the Verigene gram-negative blood culture test for rapid detection of inpatient bacteremia involving gram-negative organisms, extended-spectrum beta-lactamases, and carbapenemases // *J Clin Microbiol.* – 2014. – V. 52. – P. 2416–2421.
231. Peter H., Berggrav K., Thomas P., Pfeifer Y., Witte W., Templeton K., Bachmann TT. Direct Detection and Genotyping of Klebsiella pneumoniae Carbapenemases from Urine by Use of a New DNA Microarray Test // *J Clin Microbiol.* – 2012. – V. 50. – No. 12. – P. 3990-3998.
232. Dally S., Lemuth K., Kaase M., Rupp S., Knabbe C., Weile J. DNA Microarray for Genotyping Antibiotic Resistance Determinants in Acinetobacter baumannii Clinical Isolates // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – V. 57. – No. 10. – P. 4761-4768.
233. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // *J Histochem Cytochem.* – 1974. – V. 22. – No. 12. – P. 1084-1091.
234. Arlet G., Brami G., Decre D. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases // *FEMS Microbiol Lett.* – 1995. – V. 134. – P. 203-208.

235. Tanzer L.R., Hu Y., Cripe L., Moore R.E. A hot-start reverse transcription-polymerase chain reaction protocol that initiates multiple analyses simultaneously // *Anal. Biochem.* – 1999. – V. 273. – P. 307–310.
236. Dang C., Jayasena S. D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 264. P. 268–278.
237. Mizuguchi H., Nakatsuji M., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka, T. Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase // *J. Biochem.* – 1999. – V. 126. P. 762–768.
238. Koukhareva I., Haoqiang H., Yee J., Shum J., Paul N., Hogrefe R.I., Lebedev A.V. Heat activatable 3'-modified dNTPs: synthesis and application for hot start PCR // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2008. P. 259–260.
239. Lebedev A. V, Paul N., Yee J., Timoshchuk V.A., Shum J., Miyagi K., Kellum J., Hogrefe R.I., Zon G. Hot start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – e131.
240. Ashrafi E. H., Paul, N. Heat-activatable primers for hot-start PCR and hot-start one-step RT-PCR: endpoint and real-time experiments. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2009. – V. 15, – Unit 15.9.
241. Уляшова М.М. «ДНК-микрочипы для генотипирования бета-лактамаз молекулярного класса А». Кандидатская диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, МГУ, 2011.
242. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1986. – V. 83. – No. 11. – P. 3746-3750.
243. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M.D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – No 2. – P. 564-574.
244. Mukherjee S., Bhattacharyya D. Influence of divalent magnesium ion on DNA: molecular dynamics simulation studies // *J Biomol Struct Dyn.* – 2013. – V. 31. – No 8. – P. 896-912.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Карбапенемазы молекулярного класса А

Субтип β-лактамаз КРС	Номер в GenBank	Источник выделения	Локализация гена	Ссылка
КРС-1	AF297554	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 45:1151-1161, 2001
КРС-2	AY034847	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	JAC 51:711-714, 2003
КРС-3	AF395881	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 48:4793-4799, 2004
КРС-4	AY700571	<i>Enterobacter spp.</i>	Плазмида	
КРС-5	EU400222	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 2009, 53(2): 557-562.
КРС-6	EU555534	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 56:6006-6008, 2012
КРС-7	EU729727	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	JAC 65:1807-1818, 2010
КРС-8	FJ234412	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-9	FJ624872	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида	AAC 56:6057-6059, 2012
КРС-10	GQ140348	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 54:1354-1357, 2010.
КРС-11	HM066995	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	J. Clin. Microbiol. 50:1632-1639, 2012
КРС-12	HQ641421	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-13	HQ342889	<i>Enterobacter cloacae</i>		
КРС-14	JX524191	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-15	KC433553	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.: 1230, 2013
КРС-16	KC465199	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-17	KC465200	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-18	KP681699	<i>Escherichia coli</i>		
КРС-19	KJ775801	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-20	Assigned			
КРС-21	Assigned			
КРС-22	KM379100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
КРС-23	Assigned			
КРС-24	KR052099	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		

## Приложение 2. Карбапенемазы молекулярного класса В

### Тип VIM

Субтип β-лактамаз VIM	Номер в GenBank	Источник выделения	Локализация гена	Ссылка
<b>Подгруппа VIM-1 (21 представитель)</b>				
VIM-1	Y18050	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 43:1584-1590, 1999
VIM-4	AY135661	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 46:4026-4028, 2002
VIM-5	AY144612	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	JAC 54:282-283, 2004
VIM-12	DQ143913	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 49:5153-5156, 2005
VIM-13	DQ365886	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	AAC 52:3589-3596, 2008
VIM-14	AY635904	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	Clin. Microbiol. and Infect. 17: 722-724, 2011
VIM-19	FJ822963	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Интегрон класс 1 (Плазмида)	AAC 54:471-476, 2010
VIM-25	HM750249	<i>Proteus mirabilis</i>		Unpublished
VIM-26	FR748153	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Интегрон класс 1 (Плазмида)	Clin. Microbiol. Infect. 17:1811-1816, 2011
VIM-27	HQ858608	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 55:3570-3572 2011
VIM-28	JF900599	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1 (Хромосома)	J Infect Dis. 67:382-384, 2014
VIM-29	JX311308	<i>Escherichia coli</i>		Unpublished
VIM-32	JN676230	<i>Klebsiella oxytoca</i>		Unpublished
VIM-33	JN676230	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		AAC 57:130-136, 2013
VIM-34	JX013656	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Интегрон класс 1 (Хромосома)	AAC 69:274-275, 2014
VIM-35	JX982634	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Интегрон класс 1 (Хромосома)	AAC 58:7358-7366, 2014
VIM-37	JX982636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	JAC 69:1804-1814, 2014
VIM-38	KC469971	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	Microbiol. Infect. Dis. 78:292-294, 2014
VIM-39	KF131539	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC :(2015) In press
VIM-42	KP071470	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Unpublished
VIM-43	KP096412	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

<b>Подгруппа VIM-2 (16 представителей)</b>				
VIM-2	AF191564	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 44:891-897, 2000
VIM-3	AF300454	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 45:2224-2228, 2001
VIM-6	AY165025	<i>Pseudomonas putida</i>	Плазмида	AAC 48:2334-2336, 2004
VIM-8	AY524987	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		J. Clin. Microbiol. 42: 5094-5101, 2004
VIM-9	AY524988	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
VIM-10	AY524989	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
VIM-11	AY605049	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1	AAC 49:474-475, 2005
VIM-15	EU419745	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1 (Хромосома)	AAC 52:2977-2979, 2008
VIM-16	EU419746	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1 (Хромосома)	AAC 52:2977-2979, 2008
VIM-17	EU118148	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1 (Плазмида)	AAC 53:1325-1330, 2009
VIM-18	AM778091	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Интегрон класс 1	AAC 53:1225-1227, 2009
VIM-23	GQ242167	<i>Enterobacter cloacae</i>	Интегрон класс 1 (Плазмида)	JAC 66:684-685, 2011
VIM-24	HM855205	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Интегрон класс 1 (Плазмида)	AAC 55:2428-2430, 2011
VIM-30	JN129451	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
VIM-31	JN982330	<i>Enterobacter cloacae</i>	Плазмида	AAC 56:3283-3287, 2012
VIM-36	JX982634	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		JAC 69:1804-1814, 2014
<b>Подгруппа VIM-7 (1 представитель)</b>				
VIM-7	AJ536835	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 48:329-332, 2004

### Тип IMP

Субтип β-лактамаз IMP	Номер в GenBank	Источник выделения	Локализация гена	Ссылка
<b>Подгруппа IMP-1 (11 представителей)</b>				
IMP-1	S71932	<i>Serratia marcescens</i>	Хромосома	AAC 38:71-78, 1994
IMP-3	AB010417	<i>Shigella flexneri</i>	Плазмида	AAC 44:2023-2027, 2000
IMP-4	AF244145	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 45:710-714, 2001
IMP-6	AB040994	<i>Serratia marcescens</i>	Плазмида	AAC 45:1343-1348, 2001



IMP-10	AB074433	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 46:2014-2016, 2002
IMP-26	EU541448	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	J. Clin. Microbiol. 48:2563-4, 2010
IMP-30	DQ522237	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 57:5122-5125, 2013
IMP-38	HQ875573	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	J Infect Dev Ctries. 8:1044-8, 2014
IMP-40	AB753457	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		AAC 59:7299-7307, 2015
IMP-42	AB753456	<i>Acinetobacter soli</i>		J Clin Microbiol. 51:1762-8, 2013
IMP-52	LC055762	<i>Escherichia coli</i>		
<b>Подгруппа IMP-2 (9 представителей)</b>				
IMP-2	AJ243491	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 44:1229-1235, 2000
IMP-8	AF322577	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 45:2368-2371, 2001
IMP-13	AJ550807	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		JAC 52:583, 2003
IMP-19	EF118171		Плазмида	AAC 51:4486-4488, 2007
IMP-20	AB196988			
IMP-24	EF192154		Хромосома	Int. J. Antimicrob. Agents 32:475-480, 2008.
IMP-33	JN848782	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		AAC 57:6401-6403, 2013
IMP-37	JX131372	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Int. J. Antimicrob. Agents 40:571-573, 2012
IMP-47	KP050486	<i>Serratia marcescens</i>		
<b>Подгруппа IMP-5 (10 представителей)</b>				
IMP-5	AF290912			FEMS Microbiol. Lett. 215:33-39, 2002
IMP-7	AF318077			AAC 46:255-258, 2002
IMP-9	KC543497		Плазмида	AAC 50:355-358, 2006
IMP-15	AY553333			AAC 52:2289-2290, 2008
IMP-25	EU541448			AAC 56:6403-6406, 2012
IMP-28	JQ407409	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Хромосома	AAC 56:4540-4543, 2012
IMP-29	HQ438058	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	AAC 56:2187-2190, 2012
IMP-43	AB777500	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		AAC 57:4427-4432, 2013
IMP-45	KJ510410	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазмида	JAC 69:2579-2581, 2014
IMP-51	LC031883	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<b>Подгруппа IMP-11 (6 представителей)</b>				
IMP-11	AB074436			

IMP-16	AJ584652		Хромосома	AAC 48:4693, 2004
IMP-21	AB204557			
IMP-22	DQ361087		Плазида	JAC 63:901-908, 2009
IMP-41	AB753458	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазида	AAC 59:7299-7307, 2015
IMP-44	AB777501	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Плазида	AAC 57: 4427-4432, 2013
<b>Подгрупа IMP-12 (10 представителей)</b>				
IMP-12	AJ420864		Плазида	AAC 47:1522-1528, 2003
IMP-14	AY553332			
IMP-18	AY780674			AAC 50:2272-2273, 2006
IMP-27	JF894248	<i>Proteus mirabilis</i>	Плазида	AAC 60:6418-6421, 2016
IMP-31	KF148593	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		JAC 70:1973-1980, 2015
IMP-32	JQ002629	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
IMP-34	AB715422	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Плазида	Diagn Microbiol Infect Dis 76:119-21, 2013
IMP-35	JF816544	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		JAC 68:1271-1276, 2013
IMP-48	KM087857	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	AAC 60:1067-1078, 2016
IMP-49	KP681694	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Хромосома	AAC 60:1067-1078, 2016

### Тип NDM

Субтип β-лактамаз NDM	Номер в GenBank	Источник выделения	Локализация гена	Ссылка
NDM-1	FN396876	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазида	AAC 53:5046-5054, 2009
NDM-2	JF703135	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазида	JAC 66:260-1262, 2011
NDM-3	JQ734687	<i>Escherichia coli</i>	Плазида	Microb. Drug Resist. 19:100-103, 2013
NDM-4	JQ348841	<i>Escherichia coli</i>	Плазида	AAC 56:2184-2186, 2012.
NDM-5	JN104597	<i>Escherichia coli</i>	Плазида	AAC 55:5952-5954, 2011.
NDM-6	JN967644			
NDM-7	JX262694			
NDM-8	AB744718	<i>Escherichia coli</i>	Плазида	AAC 57:2394-6, 2013.
NDM-9	KC999080	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазида	Int. J. Antimicrob. Agents. 44:90-91, 2014
NDM-10	KF361506	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
NDM-11	KP265939	<i>Escherichia coli</i>		

NDM-12	AB926431	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида	AAC 58:6302-6305, 2014
NDM-13	LC012596	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида	
NDM-14	KM210087			
NDM-15	KP735848	<i>Escherichia coli</i>		
NDM-16	KP862821	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 60:1067-1078, 2016

### Приложение 3. Карбапенемазы молекулярного класса D

Субтип β-лактамаз OXA	Номер в GenBank	Источник выделения	Локализация гена	Ссылка
<b>Подгруппа OXA-23 (17 представителей)</b>				
OXA-23	AJ132105	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 44:196, 2000
OXA-27	AF201828	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 45:583, 2001
OXA-49	AY288523	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	J. Clin. Microbiol. 43:4885-4888, 2005
OXA-102			Хромосома	AAC 52:1252-1256, 2008
OXA-103			Хромосома	AAC 52:1252-1256, 2008
OXA-105			Хромосома	AAC 52:1252-1256, 2008
OXA-133	EU571228	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	-	AAC 53:843-844, 2009
OXA-146	FJ194494	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	AAC 57:848-4855, 2013
OXA-165	HM488986	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-166	HM488987	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-167	HM488988	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-168	HM488989	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-169	HM488990	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-170	HM488991	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-171	HM488992	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	
OXA-225	JN638887	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	J Clin Microbiol Jun. 50:1900-4, 2012
OXA-239	JQ837239	<i>Acinetobacter spp.</i>	-	New Microbes New Infect 2:173-174, 2014
<b>Подгруппа OXA-40 (12 представителей)</b>				
OXA-40	AF509241	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	J. Clin. Micro. 40:4741-4743, 2002
OXA-25	AF201826	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	AAC 45:583, 2001
OXA-26	AF201827	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	AAC 45:583, 2001

OXA-72	EF534256	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	AAC 51:4022-4028, 2007
OXA-139	AM991978	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
OXA-143	GQ861437	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 53:5035-5038, 2009
OXA-160	GU199038	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	AAC 55:429-432, 2011
OXA-182	HM640278	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 68(4): 432-438 2010
OXA-207	JQ838185	<i>Acinetobacter pittii</i>	-	AAC 58:4944-4948, 2014
OXA-231	JQ326200	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	JAC 67:2531-2, 2012
OXA-253	KC479324	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	AAC 58:2704-3708, 2014
OXA-255	KC479325	<i>Acinetobacter pittii</i>	-	AAC 58:2704-3708, 2014
<b>Подгруппа OXA-48 (12 представителей)</b>				
OXA-48	AY236073	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 48:15, 2004
OXA-54	AY500137	<i>Shewanella oneidensis</i>	Хромосома	AAC 48:348, 2004
OXA-162	HM015773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 56:2125-2128, 2012
OXA-163	HQ700343	<i>Enterobacter cloacae</i>	Плазмида	AAC 55:2546-2551, 2011
OXA-181	JN205800	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 55:4896-4899, 2011
OXA-199	JN704570	<i>Shewanella xiamenensis</i>	Хромосома	PLoS ONE 7:E48280, 2012
OXA-204	JQ809466	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	AAC 57:633-636, 2013
OXA-232	JX423831	<i>Escherichia coli</i>	Плазмида	Int J Antimicrob Agents 41: 325-329, 2013
OXA-244	JX438000	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	JAC 68:317-321, 2013
OXA-245	JX438001	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	JAC 68:317-321, 2013
OXA-247	JX893517	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Плазмида	Clin. Microbiol. Infect. 19:E233-E235, 2013
OXA-370	KF900153	<i>Enterobacter spp.</i>	-	AAC 58:3566-67, 2014
<b>Подгруппа OXA-58 (4 представителя)</b>				
OXA-58	AY665723	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 49:202, 2005
OXA-96	DQ519090	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	JAC 59: 627-632, 2007
OXA-97	EF102240	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 52:1613-1617, 2008
OXA-164	GU831575	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Плазмида	AAC 54:5021-5027, 2010
<b>Подгруппа OXA-51 (48 представителей)</b>				
OXA-51	AJ309734	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:15-23, 2005
OXA-64	AY750907	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-65	AY750908	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005

OXA-66	AY750909	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-67	DQ491200	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:15-23, 2005
OXA-68	AY750910	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-69	AY750911	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-70	AY750912	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-71	AY750913	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 11:326, 2005
OXA-75	AY859529	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	AAC 49:4174, 2005
OXA-76	AY949203	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	AAC 49:4174, 2005
OXA-77	AY949202	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	AAC 49:4174, 2005
OXA-78	AY862132	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	
OXA-79	EU019534	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-80	EU019535	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-82	EU019536	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-83	DQ309277	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	FEMS Microbiol. Lett. 258:72, 2006
OXA-84	DQ309276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	FEMS Microbiol. Lett. 258:72, 2006
OXA-86	DQ149247	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 58:537-542, 2006.
OXA-87	DQ348075	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 58:537-542, 2006.
OXA-88	DQ392963	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 59:627-632, 2007
OXA-89	DQ445683	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int. J. Antimicrob Agents 28:110, 2006
OXA-90	AM231719	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	J. Chemotherapy 21:290-295, 2009
OXA-92	DQ335566	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:348-349, 2007
OXA-93	DQ519087	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 59:627-632, 2007
OXA-94	DQ519088	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 59:627-632, 2007
OXA-95	DQ519089	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 59:627-632, 2007
OXA-98	AM279652	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	
OXA-99	DQ888718	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int. J. Antimicrob. Agents 34:285-286, 2009
OXA-104	EF581285	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-106	EF650032	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-107	EF650033	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect.

				13:1137-1138, 2007
OXA-108	EF650034	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-109	EF650035	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-110	EF650036	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-111	EF650037	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-112	EF650038	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Clin. Microbiol. Infect. 13:1137-1138, 2007
OXA-113	EF653400	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 60:1174-1176, 2007
OXA-115	EU029998	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int J Antimicrob Agents. 33:520-4, 2009
OXA-128	EU375515	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	JAC 63:828-830, 2009
OXA-130	EU547445	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	J. Chemother. 21:290-295, 2009
OXA-131	EU547446	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	J. Chemother. 21:290-295, 2009
OXA-132	EU547447	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	J. Chemother. 21:290-295, 2009
OXA-138	EU670845	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Хромосома	AAC 54:4575-4581, 2010
OXA-144	FJ872530	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	
OXA-148	GQ853679	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int. J. Antimicrob. Agents 38(4): 314-318, 2011
OXA-149	GQ853680	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int. J. Antimicrob. Agents 38:314-318, 2011
OXA-150	GQ853681	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Хромосома	Int. J. Antimicrob. Agents 38:314-318, 2011

**Приложение 4. Анализ образцов ДНК, выделенной из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов на олигонуклеотидных микрочипах**

Музейный №	Микроорганизм	VIM	NDM	OXA	TEM	SHV	CTX-M	Вывод
1609	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	14 образцов: гены карбапенемаз и БЛРС не обнаружены, 5 образцов: пенициллиназы TEM-1 и SHV-1
1610	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	
1765	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	
1766	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	
101	<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	
1581	<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	
1691	<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	
1621	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
1705	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
75	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
85	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
139	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
347	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
941	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	
686	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	-	
835	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	-	
308	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	-	
975	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	-	
994	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	-	
594	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	12 образцов: 1 ген карбапенемазы (тип VIM или NDM)
595	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
509	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
510	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
557	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
558	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
621	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
622	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
477	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	

602	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
1707	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Подгруппа VIM-2	-	-	-	-	-	
1758	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	-	
547	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-23+OXA-51	-	-	-	10 образцов: ген 2 карбапенемаз типа OXA
1622	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-40+OXA-51	-	-	-	
1666	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-40+OXA-51	-	-	-	
1692	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-40+OXA-51	-	-	-	
1706	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-40+OXA-51	-	-	-	
1707	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-40+OXA-51	-	-	-	
386	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-58+OXA-51	-	-	-	
816	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-58+OXA-51	-	-	-	
1671	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-58+OXA-51	-	-	-	
1777	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	Подгруппа OXA-58+OXA-51	-	-	-	
741	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	CTX-M-3-like	3 образца: ген 1 БЛРС (CTX- M)
886	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	CTX-M-15-like	
819	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	CTX-M-14-like	
726	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	SHV-5-like (238/240SK)	-	13 образцов: ген 1 БЛ (TEM- 1 или SHV-1) + 1 БЛРС (CTX-M или SHV-5)
1067	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
1040	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
968	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
965	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
905	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-14-like	
1022	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
856	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-3-like	
909	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-15-like	
693	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	WT	-	CTX-M-3-like	
974	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	CTX-M-15-like	
135	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	CTX-M-15-like	
136	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT	CTX-M-15-like	
1061	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT	CTX-M-15-like	3 образца: ген 2 БЛ (TEM-1+ SHV-1) + 1 БЛРС (CTX- M-15)
949	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT	CTX-M-15-like	
859	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT	CTX-M-15-like	



249	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-9-like	1 образец: ген 2 БЛРС (SHV-5+CTX-M-9)
202	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-15-like	4 образца: ген 1 БЛ (TEM-1 или SHV-1) + 2 БЛРС (SHV-5+CTX-M)
249	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	WT	SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-14-like	
513	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	WT	SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-3-like	
1248	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	WT+SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-14-like	
717	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT+SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-15-like	3 образца: ген 2 БЛ (TEM-1+ SHV-1) + 2 БЛРС (SHV-5+CTX-M-15)
202	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT+SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-15-like	
690	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	WT	WT+SHV-5-like (238/240SK)	CTX-M-14-like	