

УДК 577.113.5, 577.29, 577.15.08

СКРИНИНГ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ К БЕТА-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОЧИПОВ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

М.М. Уляшова, Г.В. Преснова, Ю.И. Поболелова, А.А. Филиппова, А.М. Егоров, М.Ю. Рубцова*

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

Метод гибридизационного анализа на микрочипах с ферментативной детекцией на основе пероксидазы хрена применен для скрининга возбудителей внутри- и внебольничных инфекций на наличие генов бета-лактамаз, обуславливающих устойчивость возбудителей к бета-лактамам антибиотикам. Показаны преимущества данного метода для экспресс-идентификации генов. Выявлены сходство и различие в генах бета-лактамаз, выявляемых у возбудителей внутри- и внебольничных инфекций. Самым распространенным типом бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) являются бета-лактамазы СТХ-М-типа. Отмечена высокая распространенность бета-лактамаз широкого спектра, особенно бета-лактамазы TEM-1. У внебольничных возбудителей в большей степени идентифицированы гены бета-лактамаз подгруппы СТХ-М-1 (либо индивидуально, либо в сочетании с генами бета-лактамаз TEM-1 и SHV-1). Случаев одновременного выявления нескольких бета-лактамаз БЛРС-типа у внебольничных возбудителей не отмечено. У внутрибольничных возбудителей идентифицировано существенно более разнообразное сочетание генов различных бета-лактамаз: (сочетание бета-лактамаз расширенного и широкого спектра отмечено в 62% случаев, одновременное присутствие БЛРС двух различных типов – в 18% случаев).

Ключевые слова: бета-лактамазы, микрочипы, гибридизация, колориметрическая детекция, пероксидаза хрена.

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются одними из наиболее распространенных возбудителей инфекционных заболеваний, для лечения которых в качестве антибактериальных средств обычно применяют бета-лактамы антибиотиков, составляющие в настоящее время более половины всех используемых в мире антибактериальных препаратов. Однако все чаще встречаются случаи клинической неэффективности лекарственной терапии данным классом антибиотиков вследствие развития устойчивости микроорганизмов к их действию. Устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам становится все более серьезной проблемой во всем мире [1, 2]. В последние годы эта проблема стала еще более угрожающей в связи с распространением панрезистентных микроорганизмов [3]. Увеличение мобильности населения ускоряет распространение резистентных штаммов [4]. В настоящее время проблема устойчивости касается не только внутрибольничных (нозокомиальных), но и внебольничных инфекций [5–7].

Самые распространенные в настоящее время виды резистентности связаны с продукцией

бактериями ферментов бета-лактамаз. Бета-лактамазы представляют собой суперсемейство генетически и функционально различных ферментов, которые объединяет способность разрушать бета-лактамно кольцо. К настоящему времени описано 1300 ферментов [8]. С точки зрения клинической практики наиболее значимыми являются бета-лактамазы молекулярного класса А (TEM-, SHV- и СТХ-М-типы). Многообразие бета-лактамаз молекулярного класса А и их широкое распространение диктуют необходимость разработки высокопроизводительного и быстрого скрининга микроорганизмов на наличие ферментов данного типа. В связи с этим методы генотипирования на олигонуклеотидных микрочипах можно считать перспективными с точки зрения как скорости получения результатов анализа, так и его информативности.

Цель данной работы – использование микрочипов с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена для скрининга ДНК возбудителей внутри- и внебольничных инфекций на наличие генов бета-лактамаз молекулярного класса А.

Экспериментальная часть

Набор праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и аминок-модифицированные олигонуклеотидные зонды были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Образцы ДНК, выделенные из клинических штаммов энтеробактерий-продуцентов, предоставлены НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (г. Смоленск, Россия).

В качестве мембранного носителя для микрочипов использовали нитроцеллюлозу BioTrace NT («Pall Corporation», США). Модификацию мембран осуществляли с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида («Sigma», США) по методике, описанной в [9]. Для иммобилизации олигонуклеотиды растворяли в солевом буфере (160 мМ Na₂SO₄, 130 мМ Na₂HPO₄) до концентрации 20 мкМ и наносили роботом «ХастII™ Arrayer» («LabNEXT Inc.», США) с иглами диаметром 300 мкм на мембраны, после чего их выдерживали в термостате при 60°C в течение 30 мин.

Аmplификацию генов бета-лактамаз типа TEM, SHV и CTX-M с одновременным включением биотина в качестве метки осуществляли в процессе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Мультиплексную ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл 5×КАРА2G буфера М, 2 мМ хлорида магния, КАРА2G Fast ДНК-полимераза («КАРА Biosystems», США), 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-биотин («Fermentas», Германия), по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров для каждой группы бета-лактамаз 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 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). Горизонтальный электрофорез продуктов ПЦР проводили в 1%-м агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, pH 8,5) и добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 1,6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Амплифицированные и содержащие метку гены бета-лактамаз растворяли в концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-HCl, 10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, pH 8,0) и добавляли ДНКазу I («Fermentas», Германия) в

количестве 0,5 мЕд на 1 нг ДНК. Фрагментацию проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакцию останавливали, добавляя 3 мМ ЭДТА и инкубируя в течение 10 мин в термостате при 65°C. Размер полученных фрагментов составлял 50–150 п.н.

Перед проведением гибридизации микрочипы отмывали ФСБТ (0,01 М K₂HPO₄; 0,15 М NaCl; 0,05% Твин 20; pH 7,0) 2 раза по 10 мин при комнатной температуре и блокировали в растворе 1%-го бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1%-го казеина («Sigma», США) в ФСБ (0,01 М K₂HPO₄; 0,15 М NaCl; pH 7,0) при 37°C в течение 30 мин. 750 нг меченой фрагментированной ДНК растворяли в гибридизационном буфере (2×SSPE: 0,3 М NaCl; 0,02 М NaH₂PO₄; 0,002 М ЭДТА; pH 7,4), содержащем 1,6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченого биотином (положительный контроль гибридизации). Микрочип помещали в гибридизационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 1,5 ч при 45°C в термомиксере «Thermomixer comfort» («Eppendorf», Германия). После гибридизации проводили отмывку мембран ФСБТ (2 раза по 15 мин при комнатной температуре).

Для детекции результатов гибридизации микрочипы инкубировали в течение 30 мин при 37°C в растворе конъюгата стрептавидин-пероксидазы хрена («Имтек», Россия) с концентрацией 1 мкг/мл в ФСБТ, содержащем 1% БСА. Микрочипы отмывали ФСБТ (10 мин) и ФСБ (10 мин) при комнатной температуре при перемешивании и помещали на 10 мин в субстратный раствор на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и H₂O₂ («НВО Иммунотех», Россия) с добавлением декстран сульфата натрия (Mg = 8000, «Pharmacia», Швеция) до конечной концентрации 0,5 мас.%, после чего их промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе. Мембранные микрочипы сканировали на сканере «Perfection V750 Pro» («Epson», Германия) при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения (TIF) обрабатывали количественно с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0, Германия).

Результаты и обсуждение

Олигонуклеотидный микрочип для диагностики бета-лактамаз расширенного спектра и ингибитор-резистентных бета-лактамаз молекулярного класса А. В настоящее время известно 200 бета-лактамаз TEM-типа, 177

бета-лактамаз SHV-типа и 170 бета-лактамаз СТХ-М-типа (<http://www.lahey.org/studies>). В данные группы ферментов входят бета-лактамазы, имеющие различные спектры субстратной специфичности: бета-лактамазы широкого спектра, гидролизующие только пенициллины и цефалоспорины первого поколения; бета-лактамазы с таким же спектром субстратной специфичности, но устойчивые к действию классических ингибиторов сериновых бета-лактамаз (ИРТ); бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), которые наряду с пенициллинами и ранними цефалоспоридами обладают способностью гидролизовать цефалоспорины последних поколений и монобактамы; бета-лактамазы смешанного типа (СМТ) – ферменты, имеющие расширенный спектр субстратной специфичности, а также проявляющие устойчивость к ингибиторам.

Согласно литературным данным, внутри каждого типа ферментов имеется ограниченное число аминокислотных мутаций, влияющих на спектр их субстратной специфичности. Как правило, данные мутации располагаются в непосредственной близости от активного центра фермента. Для бета-лактамаз TEM-типа установлено, что мутации E104K, R164S/H/C, G238S/D, E240K значительно расширяют спектр субстратной специфичности в отношении цефалоспоринов II–IV поколений, особенно цефтазида. Мутации M69I/L/V, S130G, R244C/T/S/H/L/G, R275L/Q/A, N276D приводят к возникновению устойчивости ферментов к ингибиторам сериновых бета-лактамаз. Для бета-лактамаз SHV-типа известно, что мутации D179A/N/G, G238S/A, E240K расширяют спектр субстратной специфичности в отношении цефалоспоринов II–IV поколений, особенно цефтазида; мутации M69I, S130G, K234R приводят к возникновению устойчивости ферментов к ингибиторам сериновых бета-лактамаз.

Все бета-лактамазы СТХ-М-типа являются БЛРС и характеризуются тем, что проявляют значительно более высокую активность в отношении цефотаксима и цефтриаксона по сравнению с цефтазидом. Однако в последнее время накапливается все больше данных о том, что продуценты СТХ-М бета-лактамаз могут проявлять высокую устойчивость к цефтазиду вследствие аминокислотных мутаций P167T/S и D240G. Ранее нами был разработан олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов TEM, SHV и СТХ-М бета-лактамаз и определения нуклеотидных замен в них, являющихся причиной вышеречисленных аминокислотных мутаций [9].

Данный микрочип позволяет идентифицировать наличие у микроорганизмов 94,8% типов генов БЛРС, 97,8% генов ИРТ бета-лактамаз и 100% генов СМТ бета-лактамаз молекулярного класса А, известных на настоящий момент. Дополнительно для идентификации на микрочипе были включены аминокислотные мутации, значимые для распознавания субтипов ферментов, широко распространенных на территории РФ: мутация L35Q в SHV бета-лактамазах, мутации A26T, V230G, E253A в бета-лактамазах подгруппы СТХ-М-2 и мутация A231V в бета-лактамазах подгруппы СТХ-М-9.

Микрочип для идентификации генов БЛРС и ИРТ бета-лактамаз молекулярного класса А содержит два типа олигонуклеотидных зондов: олигонуклеотидные зонды для идентификации типа гена бета-лактамазы и олигонуклеотидные зонды для определения ключевых мутаций внутри каждой группы ферментов. Дизайн групп (подгрупп) специфических зондов осуществлялся на основе консервативных участков генов всех ферментов, принадлежащих к каждой группе. Для детекции нуклеотидных замен в генах, приводящих к определяемым аминокислотным мутациям, создавались наборы зондов, содержащие от 2 до 7 олигонуклеотидов. Последовательность одного из данных олигонуклеотидов соответствовала нуклеотидной последовательности фермента «дикого типа» (WT – wild type), являющегося родоначальником каждой группы/подгруппы бета-лактамаз (TEM-1, SHV-1, СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8, СТХ-М-9). Остальные олигонуклеотиды в наборах (один или несколько) были комплементарны участкам генов, кодирующих мутантные по данной позиции формы ферментов (MT – mutant type). Последовательности таких олигонуклеотидов выбирались таким образом, чтобы мутантные нуклеотиды находились в центре, что увеличивает специфичность распознавания нуклеотидных мутаций. В связи с тем, что мутации в позициях бета-лактамаз 275, 276 TEM, а также бета-лактамаз 238, 240 SHV близко расположены, для их определения использовали единые наборы зондов – T_275/276 и S_238/240 соответственно. Длина зондов варьировала от 18 до 28 нуклеотидов, GC-состав – от 32,1 до 76,2%, температура плавления зондов находилась в диапазоне 60,9–77,6°C. Дизайн практически всех наборов зондов, кроме C1_167 и C9_167, был выполнен по прямой цепи. Последовательности нескольких наборов зондов содержали искусственные замены в GC-богатых участках для снижения устойчивости вторичных структур

зондов или вероятности неспецифической гибридизации. Их введение в последовательности зондов T_244, S_234, C2_240 и C9_240 позволило значительно улучшить специфичность определения мутантных форм. Наборы зондов T_130 и S_35 содержали LNA-модифицированные нуклеотиды в позициях нуклеотидных мутаций. Их введение в олигонуклеотиды повысило эффективность их гибридизации с комплементарным участком ДНК-мишени. Одновременно с этим наблюдалось снижение специфичности гибридизации, однако оно было незначительным и не влияло на правильность определения типа гена.

Для изготовления микрочипа в качестве носителя использовали нитроцеллюлозу. На микрочипе площадью около 1 см² были иммобилизованы 75 олигонуклеотидных зондов в виде трех блоков (для бета-лактамаз TEM, SHV и CTX-M): 7 зондов для идентификации групп/подгрупп ферментов и 68 зондов для определения мутаций в бета-лактамазах (8 мутаций в TEM, 7 мутаций в SHV, 2 мутации в CTX-M-1, 5 мутаций в CTX-M-2 и 3 мутации в CTX-M-9). Каждый олигонуклеотид наносился на микрочип в трех повторах. Помимо специфических зондов каждый микрочип содержал 3 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). Во все зонды были введены дополнительные спейсеры на 5'-конце, удаляющие зонд от поверхности носителя, что позволяет снизить стерические затруднения при гибридизации и повышает доступ-

ность зонда для ДНК-мишени. Было установлено, что оптимальным является использование спейсера из 13 тимидиновых остатков.

Процесс идентификации генов бета-лактамаз методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе состоял из следующих этапов (рис. 1): выделение бактериальной ДНК из клинического образца; амплификация гена бета-лактамазы в процессе мультиплексной ПЦР с одновременным включением метки; гибридизация меченной биотином ДНК со олигонуклеотидными зондами на поверхности микрочипа; детекция результатов гибридизации. В результате реакции гибридизации на поверхности микрочипа образуются дуплексы ДНК, меченные биотином. Биотин выявляли конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (ПХ), которую затем детектировали колориметрически по накоплению нерастворимого окрашенного продукта ферментативной реакции. В результате в зонах микрочипа, где произошла гибридизация исследуемой ДНК, наблюдается образование окрашенных пятен.

Оптимизация условий амплификации генов бета-лактамаз TEM-, SHV- и CTX-M-типов, а также условий гибридизации и ферментативной детекции на микрочипах была выполнена с использованием контрольных охарактеризованных штаммов микроорганизмов, продуцирующих разные типы бета-лактамаз. Амплификацию всех типов генов изучаемых бета-лактамаз проводили в формате одной мультиплексной ПЦР с шестью парами праймеров. В результате амплификации происходит синтез ПЦР-продуктов длиной 850–870 п.н., соответствующих полноразмерным генам TEM, SHV и CTX-M бета-лактамаз. Выход продуктов, достаточный для последующего гибридизационного анализа (750 нг ДНК), достигался за 20 циклов ПЦР. Благодаря использованию ДНК-полимеразы ново-

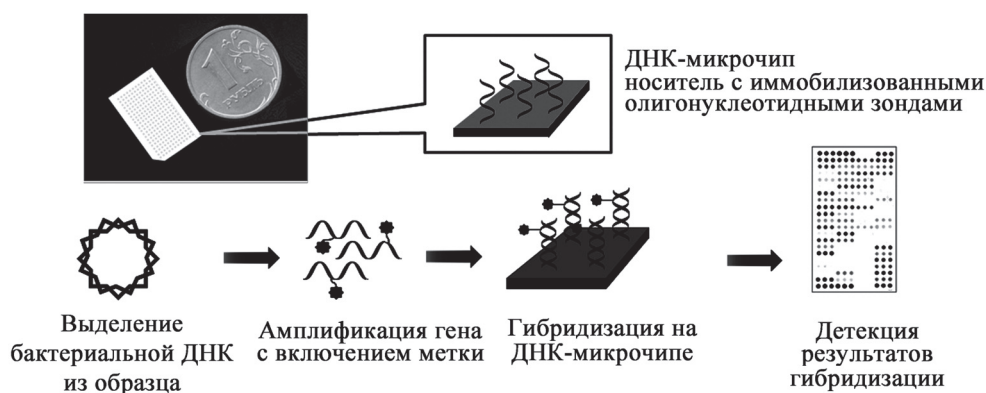


Рис. 1. Схема метода проведения гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе с колориметической детекцией

го поколения KAPA2G Fast («КАРА Biosystems», США) существенно сократилась длительность основных стадий ПЦР, особенно стадии элонгации (5 с вместо 60 с) [10]. В результате общее время амплификации не превышало 40 мин. Для включения биотина в качестве метки в реакционную смесь добавляли биотинилированный дезоксиурацилтрифосфат. Его концентрация была оптимизирована таким образом, чтобы на каждые 100 нуклеотидов амплифицируемого гена встраивалось 5–7 молекул метки. Чувствительность данного метода составляла 50–100 копий гена на одну ПЦР.

Скрининг клинических образцов на наличие генов бета-лактамаз молекулярного класса А. Разработанный ДНК-микрочип был использован для скрининга образцов ДНК, выделенных из внутрибольничных ($n = 128$) и внебольничных ($n = 110$) штаммов энтеробактерий в Российской Федерации. Для всех образцов была получена ДНК с 6 наборами праймеров, меченная в процессе мультиплексной ПЦР. По результатам ПЦР образцы были разделены на отрицательные и положительные по наличию или отсутствию ампликона с размером, соответствующим гену бета-лактамаз молекулярного класса А. Для каждого полученного ПЦР-продукта проведены два независимых эксперимента по гибридизации на мембранных микрочипах.

Тип гена бета-лактамаз определяли с помощью идентификационных зондов. Для определения БЛРС и отнесения их к определенной подгруппе использовали определение отдельных мутаций. Мутации во всех исследуемых позициях определялись однозначно: 90% ММ-зондов показали значения, не превышающие 0,6; для 10% ММ-зондов значения RI_{MM} находились в диапазоне 0,6–0,7. Преимуществом разработанного метода гибридизационного анализа на микрочипах является успешная идентификация смеси генотипов бета-лактамаз, которые принадлежат не только к разным типам генов, но и к смеси двух генов, относящихся к одному генетическому типу. На рис. 2 приведены результаты тестирования двух штаммов микроорганизмов, один из которых продуцирует только пенициллиназы TEM-1 и SHV-1, а другой – смесь пенициллиназ TEM-1 и SHV-1 и двух БЛРС (SHV-2 и CTX-M-3). Обе смеси генов ферментов достоверно определяли на микрочипе. Сравнение профилей гибридизации показывает появление двух сигналов комплементарной гибридизации в позиции S_238/240 SHV бета-лактамаз, что свидетельствует о наличии как гена фермента дикого типа SHV-1, так и гена бета-лактамазы SHV-2, имеющего мутацию в данной позиции.

Наличие гибридизационных сигналов для зондов, идентифицирующих гены ферментов подгруппы CTX-M-1 и мутации в них, подтвердили продукцию фермента CTX-M-3 во втором образце.

Результаты идентификации различных субтипов бета-лактамаз молекулярного класса А, полученные при скрининге ДНК внутрибольничных и внебольничных штаммов энтеробактерий на микрочипах с ферментативной детекцией, представлены на рис. 3. В выборках внутрибольничных и внебольничных возбудителей гены бета-лактамаз были выявлены в 125 и 103 образцах соответственно.

В выборке внутрибольничных инфекций 72,0% из 125 штаммов содержали гены TEM-бета-лактамаз, 53,6% – гены SHV-бета-лактамаз и 87,2% – гены бета-лактамаз CTX-M-типа, в выборке внебольничных инфекций 64,0% из 103 штаммов содержали гены TEM-бета-лактамаз, 35,0% – гены SHV-бета-лактамаз и 92,0% – гены бета-лактамаз CTX-M-типа. Распределение по подгруппам у CTX-M-бета-лактамаз было следующим: у внутрибольничных возбудителей: $bla_{CTX-M-1}$ (81,6%), $bla_{CTX-M-2}$ (3,7%) и $bla_{CTX-M-9}$ (14,7%); у внебольничных возбудителей: $bla_{CTX-M-1}$ (90,5%) и $bla_{CTX-M-9}$ (9,5%).

Результаты тестирования клинических образцов совпадают с ситуацией, актуальной для России (исследование РЕВАНШ, проводимое НИИ Антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, 2007 г.). Среди БЛРС в значительной степени преобладают бета-лактамазы CTX-M-типа. Следует отметить высокую распространенность бета-лактамаз широкого спектра, особенно бета-лактамазы TEM-1 (73,6 и 64,1% у внутрибольничных и внебольничных штаммов соответственно). Этот факт еще раз подтверждает, что для диагностики типа антибиотикорезистентности недостаточно проводить идентификацию гена бета-лактамазы на уровне групповой принадлежности, необходимо определять наличие ключевых мутаций, влияющих на субстратную специфичность ферментов.

Бета-лактамаза типа CTX-M-15 является преобладающей БЛРС в России. Данная тенденция наблюдается среди как внутрибольничных, так и внебольничных штаммов энтеробактерий. В нашем исследовании 60% генов БЛРС идентифицировались как CTX-M-15 (в пределах группы CTX-M-бета-лактамаз доля CTX-M-15 составляла 85%).

По данным исследований, SHV-12 – это самый частый вариант группы БЛРС SHV-типа

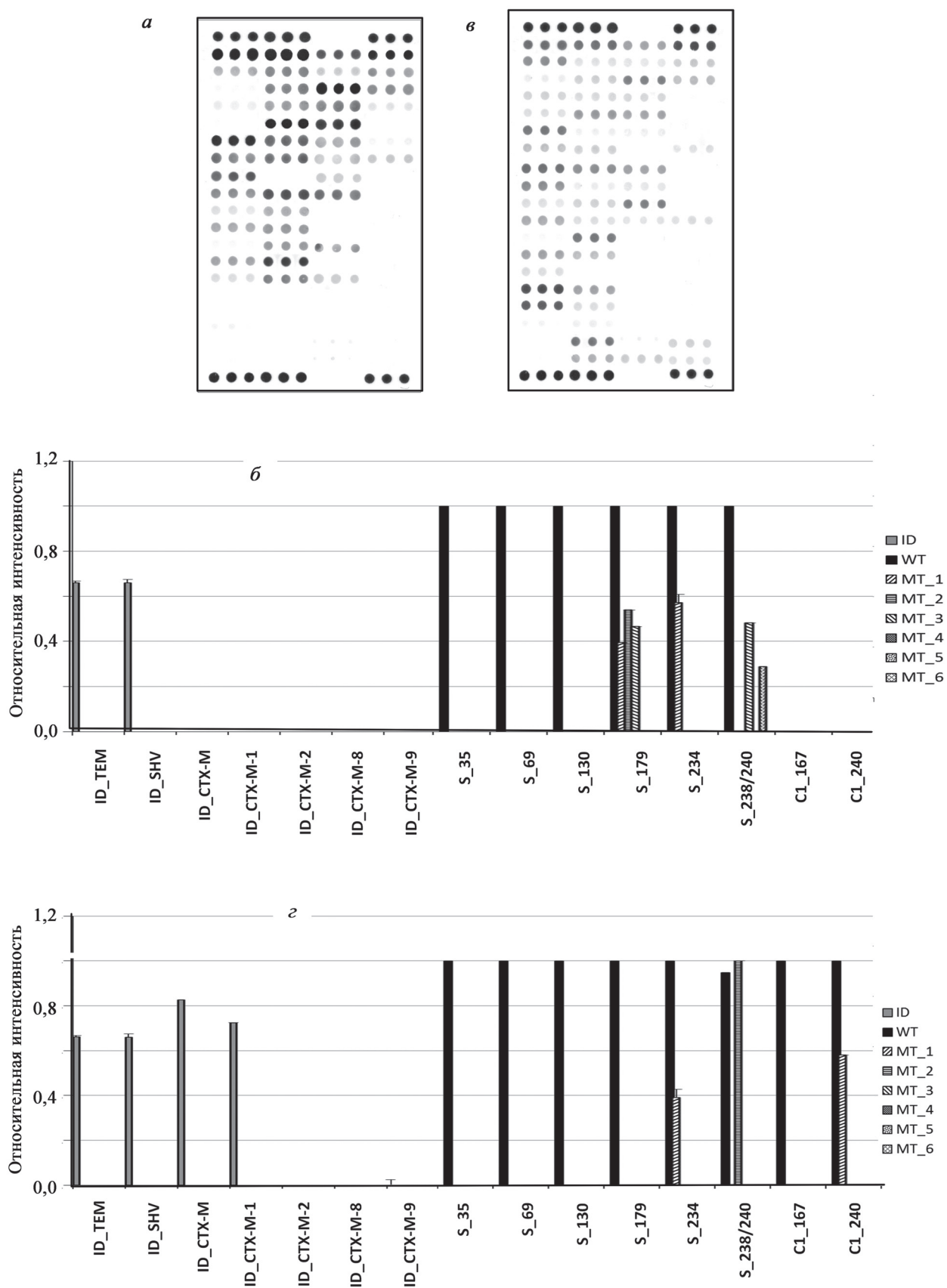


Рис. 2. Вид микрочипа и результат гибридизации 750 нг ДНК, амплифицированной из штамма: *а, б* – *Escherichia coli* (продуцента бета-лактамаз TEM-1 и SHV-1), *в, г* – *Klebsiella pneumoniae* (продуцента бета-лактамаз TEM-1, SHV-1, SHV-2 и CTX-M-3). Представлены только интенсивности сигналов гибридизации, значительно отличавшиеся от фонового сигнала

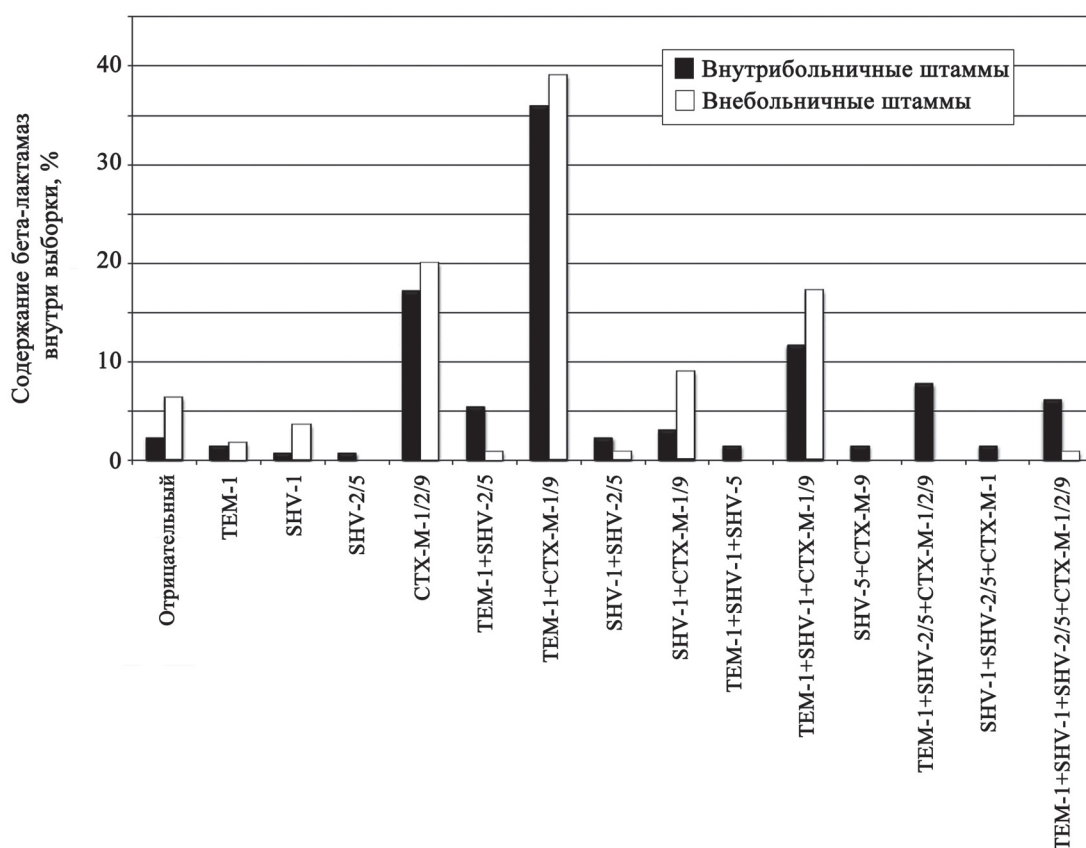


Рис. 3. Комбинации различных субтипов бета-лактамаз молекулярного класса А, продуцируемых внутрибольничными и внебольничными штаммами энтеробактерий, выявленные при скрининге на микрочипах с ферментативной детекцией

у возбудителей внутрибольничных инфекций, главным его продуцентом являются штаммы *K. pneumoniae*. Мы наблюдали такую же тенденцию: 85% генов БЛРС SHV-типа у образцов ДНК внутрибольничных штаммов идентифицировались как SHV-12.

Сравнение результатов тестирования генов бета-лактамаз у разных возбудителей показывает, что у внебольничных возбудителей наиболее часто идентифицированы гены бета-лактамаз подгруппы СТХ-М-1 (либо индивидуально, либо в сочетании с генами бета-лактамаз ТЕМ-1 и SHV-1). Случаев выявления одновременно двух бета-лактамаз БЛРС-типа у внебольничных возбудителей не отмечено. У внутрибольничных возбудителей идентифицировано существенно более разнообразное сочетание генов различных бета-лактамаз: сочетание бета-лактамаз расширенного и широкого спектра отмечено в 62% случаев, одновременное присутствие БЛРС двух различных типов – в 18% случаев.

Методика гибридационного анализа на микрочипах позволила провести экспресс-анализ

микроорганизмов на наличие генов БЛРС и/или ИРТ бета-лактамаз молекулярного класса А. Весь анализ занимает не более 4 ч (0,5 ч – выделение бактериальной ДНК; 0,7 ч – амплификация генов бета-лактамаз с одновременным включением метки; 0,3 ч – фрагментация полученных ПЦР-продуктов; 1,5 ч – гибридизация с последующей отмывкой; около 1 ч – колориметрическая детекция результатов гибридизации). Для сравнения – фенотипическое определение продукции БЛРС занимает 24–48 ч и больше зависит от типа бактериальной культуры.

Таким образом, метод гибридационного анализа на микрочипах с ферментативной детекцией применен для скрининга ДНК возбудителей внутри- и внебольничных инфекций на наличие генов бета-лактамаз. Показаны преимущества данного метода для экспресс-идентификации генов, обуславливающих устойчивость возбудителей к бета-лактамам антибиотикам. Выявлены сходство и различие в генах бета-лактамаз, выявляемых у возбудителей внутри- и внебольничных инфекций.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carlet J., Collignon P., Goldmann D., Goosens H., Gysens I.C. et al. // *Lancet*. 2011. Vol. 378. P. 369.
2. Baquero, F., Tedim, A.P., Coque, T.M. // *Front Microbiol*. 2013. Vol. 4. P. 1.
3. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014 World Health Organization (<http://www.who.int/drugresistance/en/>)
4. Van der Bij A., Pitout J.D.D. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. Vol. 67. P. 2090.
5. Tang S., Apisarnthanarak A., Hsu L.Y. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2014. Vol. 78. P. 3.
6. Rodríguez-Baño J., Alcalá J.C., Cisneros J.M., Grill F., Oliver A. et al. // *Arch. Intern. Med.* 2008. Vol. 168. P. 1897.
7. Kresken M., Pfeifer Y., Hafner D., Wresch R. et al. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014. Vol. 44. P. 295.
8. Bush K. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2013. Vol. 1277. P. 84.
9. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2010. Vol. 26. P. 1252.
10. Poblelova, Yu.I., Ulyashova, M.M., Rubtsova, M.Yu., and Egorov, A.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. Vol. 79. P. 566.

Поступила в редакцию 01.03.16

SCREENING OF BACTERIAL GENES RESPONSIBLE FOR RESISTANCE TO BETA-LACTAM ANTIBIOTICS USING MICROARRAYS WITH ENZYMIC DETECTION

M.M. Ulyashova, G.V. Presnova, Yu.I. Poblelova, A.A. Filippova, A.M. Egorov, M.Yu. Rubtsova*

(Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

The method of hybridization analysis on microarrays with enzymatic detection based on horseradish peroxidase was applied for screening the pathogens of nosocomially-acquired and community-acquired infections for the presence of genes of beta-lactamases, causing resistance to beta-lactam antibiotics. The advantages of this method for the rapid identification of genes were shown. Similarities and differences in the distribution of beta-lactamase genes for nosocomially-acquired and community-acquired infections were revealed. The most common ESBL type was CTX-M type of beta-lactamases. The high prevalence of beta-lactamase TEM-1 was detected. Beta-lactamase subgroup CTX-M-1 alone or in combination with genes of beta-lactamases TEM-1 and SHV-1 was most frequently identified for community-acquired infections. No cases of simultaneous detection of multiple ESBLs for community-acquired pathogens have been detected. Much more varied combinations of beta-lactamases were identified for nosocomially-acquired infections: a combination of ESBL and other beta-lactamases - in 62% of strains, the simultaneous presence of two different types of ESBLs – in 18% of strains.

Key words: beta-lactamases, microarrays, hybridization, colorimetric detection, horseradish peroxidase.

Сведения об авторах: Уляшова Мария Морисовна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mmulyashova@gmail.com); Преснова Галина Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (gresnova@gmail.com); Пoblelova Юлия Илдаровна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (poblelovayulia@gmail.com); Филиппова Анна Андреевна – студентка химического факультета МГУ (iiffii@mail.ru); Егоров Алексей Михайлович – гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. биол. наук (alex.m.egorov@gmail.com); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com).