

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Филиппова Анна Андреевна

**Разработка метода мультиплексного определения
транскриптов генов бета-лактамаз
у мультирезистентных бактерий *Enterobacteriaceae***

1.5.6 -биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва -2022

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Егоров Алексей Михайлович

академик РАН, профессор, доктор биологических наук

Рубцова Майя Юрьевна

доцент, кандидат химических наук

Официальные оппоненты:

Дзантиев Борис Борисович

доктор химических наук, профессор, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики, заведующий лабораторией иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Зверева Мария Эмильевна

доктор химических наук, профессор химического факультета кафедры химии природных соединений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования МГУ имени М.В. Ломоносова

Сидоренко Сергей Владимирович

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий Отделом медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «13» декабря 2022 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E.mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/505192856/>

Автореферат разослан «11» ноября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Глобальное распространение мульти- и пан-резистентных бактерий, устойчивых к действию нескольких и даже практически всех классов антибактериальных препаратов (АБП), является следствием эволюции бактерий, вызванным широким использованием современных антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве. В результате применяемые в клинической практике методы антибиотикотерапии становятся неэффективными. Особую угрозу представляет распространение грамотрицательных бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью, у которых имеются мультикопийные плазмиды с несколькими приобретенными генами резистентности.

Эволюция резистентности госпитальных бактериальных экосистем, связанная с применением различных стратегий антибиотикотерапии, привела к возникновению явления гетерорезистентности, обусловленного формированием смешанной популяции резистентных и чувствительных к АБП бактерий. Гетерорезистентность характеризует фенотипическую эволюцию перехода от чувствительного штамма к резистентному внутри одной популяции бактерий. Экспрессия генов резистентности в штаммах, проявляющих антибиотико-гетерорезистентный фенотип, является одним из факторов, приводящих к неэффективности лечения [1].

Бета-лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы) являются наиболее часто используемыми АБП для лечения инфекционных заболеваний, в том числе нозокомиальных [2, 3]. Основным механизмом резистентности грамотрицательных бактерий является гидролиз амидной связи бета-лактамного кольца антибиотика, который осуществляется ферментами - бета-лактамазами (БЛ). Они образуют суперсемейство из более чем 2700 ферментов [4, 5], разделяющихся по своему строению на четыре молекулярных класса (А, В, С и D). Ферменты классов А, В, С содержат в активном центре серин, а ферменты класса В являются металло-гидролазами и содержат один или два иона цинка. Быстрое распространение устойчивости бактерий обусловлено локализацией генов, кодирующих БЛ, на мобильных генетических элементах. Они могут содержать гены нескольких БЛ с различающейся субстратной специфичностью, что приводит к формированию мультирезистентного фенотипа.

Изучение влияния АБП на индукцию экспрессии генетических детерминант резистентности представляет актуальную фундаментальную задачу для понимания механизмов развития устойчивости микроорганизмов к АБП и возникновения гетерорезистентности. В литературе описаны единичные эффекты индукции транскрипции генов БЛ под действием АБП [6, 7, 8]. Влияние различных классов антибиотиков на одновременную экспрессию генов БЛ разных типов у мультирезистентных бактерий еще мало изучено.

Для изучения механизмов антибиотикорезистентности и влияния АБП на изменение экспрессии генов БЛ у мультирезистентных к антибиотикам бактерий необходимо разработать количественный метод определения специфичных мРНК БЛ в бактериальных транскриптах. Метод, позволяющий определять концентрации транскриптов генов, должен обладать высокой специфичностью и чувствительностью, широким динамическим диапазоном, позволяющим определять как низкие, так и высокие уровни экспрессии генов. В связи с разнообразием БЛ, обуславливающих резистентность бактерий к бета-лактамам, метод определения транскриптов генов должен обладать высокой производительностью, селективностью и возможностью одновременного определения мРНК нескольких типов генов БЛ в одном анализе.

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы опубликованы результаты ряда исследований по изучению транскриптов отдельных генетических детерминант резистентности с использованием полуколичественных методов определения мРНК (ПЦР в режиме реального времени и РНК-секвенирование) и

качественных изменений в транскриптомах бактерий с использованием биочипов высокой плотности (одновременный анализ десятков тысяч генов). В нескольких работах изучено влияние отдельных бета-лактамовых антибиотиков в узком диапазоне концентраций на индукцию экспрессии генов БЛ у клинических штаммов. Разработан метод биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией на основе пероксидазы хрена для качественного определения (идентификации) генов БЛ разных классов и типов.

Целью работы являлась разработка метода мультиплексного количественного определения мРНК БЛ разных классов на основе колориметрических биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией и его применение для анализа индукции транскриптов генов БЛ у клинических штаммов Enterobacteriaceae под действием бета-лактамов.

Для достижения цели работы поставлены следующие задачи:

- Получение синтетических образцов мРНК клинически значимых БЛ (TEM-, CTX-M-1-, NDM- и OXA-48-типов);
- Оптимизация условий пробоподготовки образцов бактериальных культур для получения ДНК-мишеней БЛ в мультиплексных реакциях обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР;
- Оптимизация условий гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для количественного определения ДНК-мишеней БЛ;
- Дизайн биочипа для одновременного определения концентраций мРНК БЛ разных типов, получение градуировочных кривых методом мультиплексного анализа мРНК БЛ на биочипах с использованием стандартных образцов, определение аналитических характеристик метода;
- Применение метода для изучения транскрипции генов БЛ у клинических штаммов Enterobacteriaceae под действием бета-лактамовых АБП.

Научная новизна. Разработан метод одновременного определения концентраций специфичных мРНК БЛ в мультиплексном анализе на колориметрических биочипах низкой плотности. Принцип количественного определения основан на использовании синтетических стандартных образцов мРНК БЛ, которые проходят все этапы анализа вместе с исследуемыми образцами. Выбор последовательностей специфичных олигонуклеотидных зондов для одновременного определения исследуемых генов на биочипах и условий пробоподготовки ДНК-мишеней из фракции общей бактериальной РНК обеспечили снижение предела обнаружения мРНК и увеличение коэффициента чувствительности. Проведено изучение влияния разных групп бета-лактамов в широком диапазоне концентраций на транскрипцию всех генов БЛ плазмидной локализации у мультирезистентных бактерий семейства Enterobacteriaceae. Для штаммов, культивированных в присутствии меропенема, обнаружено увеличение транскрипции всех плазмидно-кодируемых генов БЛ.

Разработанный метод количественного определения специфичных мРНК может быть использован для изучения механизмов формирования устойчивости бактерий к АБП и поиска новых способов подавления экспрессии БЛ.

Практическая значимость работы. Разработан высокочувствительный количественный метод мультиплексного определения концентраций мРНК четырех клинически значимых БЛ разных классов (TEM-, CTX-M-1-типов (класс А), NDM-типа (класс В), OXA-48-типа (класс D) на колориметрических биочипах с ферментативной детекцией. Дизайн биочипов в лунках 96-луночного планшета позволяет существенно увеличить производительность метода. Показана применимость метода для определения индукции транскриптов генов БЛ у клинических штаммов Enterobacteriaceae, культивированных в присутствии бета-лактамовых антибиотиков, концентрации которых соответствуют используемым в клинической практике. Разработанный метод может быть использован для контроля экспрессируемых генов БЛ мультирезистентными к АБП

штаммами в клинических микробиологических лабораториях в качестве дополнения к существующим микробиологическим методам.

Методология и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились с использованием современных методов молекулярной биологии, физической химии и аналитической биотехнологии. Основные методы исследования, использованные в работе: выделение нуклеиновых кислот РНК и ДНК, реакции ОТ и ПЦР, синтез РНК в реакции транскрипции *in vitro*, гибридизационный анализ на биочипах низкой плотности, иммобилизация олигонуклеотидов на полистироле, колориметрическая детекция пероксидазы, генно-инженерные методы получения рекомбинантных плазмид штаммов-продуцентов БЛ.

Положения научно-квалификационной работы, выносимые на защиту:

1. Технология колориметрических биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией в сочетании с пробоподготовкой ДНК-мишени из фракции общей РНК бактериальных культур и использованием стандартных образцов мРНК БЛ обеспечивает мультиплексное количественное определение мРНК БЛ разных классов с высокой чувствительностью, воспроизводимостью и производительностью.

2. Использование ген-специфичных праймеров в мультиплексных реакциях ОТ и ПЦР увеличивает эффективность синтеза ДНК-мишени.

3. Биочип, включающий выбранные последовательности специфичных и контрольных олигонуклеотидных зондов, обеспечивает селективное определение мРНК БЛ четырех типов в мультиплексном анализе.

4. Разработанный метод гибридизационного анализа на биочипах применим для определения концентраций специфичных мРНК БЛ у клинических штаммов *Enterobacteriaceae*, культивированных в присутствии бета-лактамов АБП в широком диапазоне концентраций. При культивировании штаммов в присутствии АБП наблюдается разнонаправленное изменение транскрипции генов БЛ. В присутствии меропенема у штаммов *K. pneumoniae* с множественной устойчивостью к АБП наблюдается увеличение транскрипции всех плазмидно-кодируемых генов БЛ.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при ее непосредственном участии на всех этапах исследований под руководством академика РАН, д.б.н., профессора Егорова А.М. и к.х.н., доцента Рубцовой М.Ю. Автор самостоятельно изучила современные литературные данные по теме исследования и на их основании составила обзор литературы. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнила все эксперименты, произвела сбор, обработку и анализ полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом статей, а также представление их в редакции журналов, переписка с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей. Культивирование клинических штаммов грамотрицательных бактерий проводили совместно с к.б.н. Фурсовой Н.К. в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Прямой подсчет наночастиц золота методом сканирующей электронной микроскопии проводили совместно с к.х.н. Пресновой Г.В. (МГУ имени М.В. Ломоносова) и к.ф.-м.н. Пресновым Д. Е. (Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием высокоточного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы представлены на V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Международном Форуме "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" BIOTECHN WORLD (Москва, Россия, 2018), Международной научно-практической конференции "Молекулярная диагностика" (Минск, Республика Беларусь, 2018), II Объединенном

научном форуме, включающем VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Дагомыс, Россия, 2019), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, 2020), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (Москва, Россия 2021), Международном Форуме "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" BIOTECH WORLD (Москва, Россия, 2021).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science/РИНЦ; 1 статья в сборнике и 7 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В. Ломоносова (тема госрегистрации АААА-А21-121011290089-4 и 121041500039-8). Часть результатов получена в рамках грантов РНФ (15-14-00014 и 15-14-00014-П) и РФФИ (Грант 19-34- 50071).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (3 главы), материалов и методов, результатов и обсуждения (5 глав), выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 229 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Принцип метода количественного определения мРНК на биочипах низкой плотности с колориметрической детекцией. Для количественного мультиплексного анализа специфичных мРНК БЛ предложено использовать технологию колориметрических ДНК-биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией, дополнив ее пробоподготовкой биотинилированной ДНК-мишени из фракций общей РНК бактериальных культур. Для осуществления количественного определения мРНК предложено использовать подход, широко используемый в методах аналитической биотехнологии – построение градуировочных кривых с использованием набора стандартных образцов мРНК тех же типов с известными концентрациями.

Принцип метода количественного мультиплексного определения мРНК на биочипах представлен на Рис. 1. Он состоит в параллельном анализе стандартных синтетических образцов мРНК БЛ с известными концентрациями и исследуемых транскриптов бактериальных клеток. На Рис. 1А приведена схема анализа стандартных образцов мРНК: получение биотинилированных ДНК-мишеней методом ОТ и ПЦР; гибридизационный анализ ДНК-мишеней на биочипе с иммобилизованными специфичными олигонуклеотидными зондами; выявление биотина в дуплексах ДНК с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидазы, колориметрическая детекция пероксидазы и построение градуировочных кривых (зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа от концентрации мРНК). Определение мРНК в клинических образцах проводится по той же схеме (Рис. 1 Б): пробоподготовка (выделение фракции общей РНК из бактериальных культур; получение ДНК-мишеней в реакциях ОТ и ПЦР); гибридизация ДНК-мишеней на биочипах с последующим выявлением биотина и количественное определение мРНК БЛ по градуировочным кривым, полученным с использованием стандартных образцов.

В качестве носителей для биочипов использовали лунки 96-луночных планшетов из полистирола, модифицированного бифункциональным ароматическим азидом для ковалентной иммобилизации amino-модифицированных олигонуклеотидов.

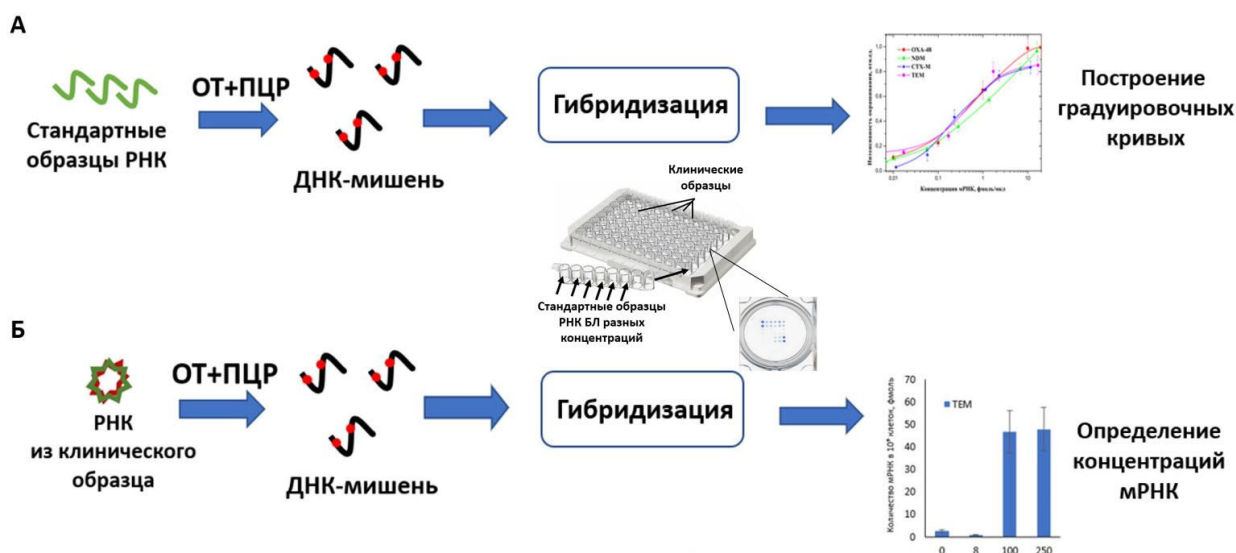


Рис. 1. Принцип метода количественного мультиплексного анализа специфичных мРНК на колориметрических биочипах, расположенных в лунках полистиролового планшета. А) Схема анализа синтетических стандартных образцов мРНК БЛ: получение биотинилированных ДНК-мишеней методом ОТ-ПЦР; гибридационный анализ ДНК-мишеней на биочипе с олигонуклеотидными зондами; выявление биотина в дуплексах ДНК с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза; колориметрическая детекция фермента; построение градуировочных кривых.

Б) Схема анализа РНК-транскриптов бактериальных клеток: выделение общей РНК из бактериальных культур; получение биотинилированных ДНК-мишеней методом ОТ-ПЦР; гибридационный анализ ДНК-мишеней на биочипе с олигонуклеотидными зондами; выявление биотина в дуплексах ДНК с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза; колориметрическая детекция фермента; определение концентрации мРНК по градуировочным кривым.

2. Получение стандартных образцов мРНК бета-лактамаз

В качестве объектов исследования выбраны четыре типа БЛ, относящихся к наиболее клинически значимым: СТХ-М (субкластер СТХ-М-1, молекулярный класс А), ТЕМ (молекулярный класс А), NDM (молекулярный класс В) и ОХА (субкластер ОХА-48, молекулярный класс D). Синтетические образцы мРНК получали в реакции транскрипции *in vitro*, в которой мРНК синтезируется на основе матрицы соответствующей ДНК с использованием фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы Т7. Для этого использовали штаммы *E. coli* – продуценты четырех вариантов рекомбинантных БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-116, NDM-1 и ОХА-48), каждый из которых является представителем выбранных типов генов. Данные штаммы содержат плазмиды рЕТ 24 ВL21 с клонированными полноразмерными генами БЛ с участками промотора и терминатора бактериофага Т7 (Рис. 2А).

Участки плазмид, включающие последовательность гена соответствующей БЛ, а также промотор и терминатор Т7, амплифицировали методом ПЦР (Рис. 2 Б, дорожка №1). Полученные ампликоны использовали в качестве матрицы в реакции транскрипции *in vitro* с ДНК-зависимой РНК-полимеразой Т7. Размер и чистоту полученных образцов мРНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле (Рис. 2 Б). Основным продуктом

реакции являлась одноцепочечная мРНК БЛ, которая включала полноразмерный ген БЛ и участки промотора и терминатора (дорожка № 2 на Рис. 2Б). Примесь ДНК-матрицы удаляли обработкой ДНКазой. Полноту удаления контролировали методом электрофореза по отсутствию синтезируемого продукта ПЦР. Расчетные размеры длины мРНК находятся в диапазоне 959 – 1121 н. в зависимости от типа БЛ. Синтетические образцы мРНК соответствуют полноразмерным генам БЛ TEM-1, CTX-M-116, NDM-1 и OXA-48.

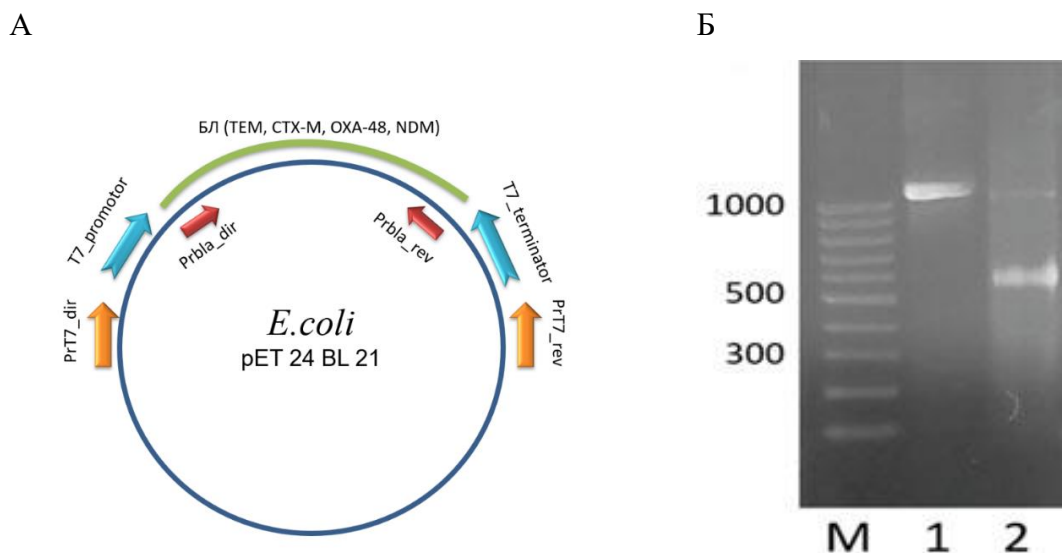


Рис 2. А) Строение фрагмента плазмид рЕТ 24 BL21, использованных для получения мРНК БЛ TEM-, CTX-M-, NDM- и OXA-48-типов. Б) Электрофореграмма продуктов отдельных стадий синтеза мРНК БЛ TEM-1: (1) двухцепочечный ПЦР-продукт размером 1140 п.о. - фрагмент плазмиды рЕТ 24 BL 21; (2) – одноцепочечная РНК гена БЛ TEM-1 размером 1095 о., полученная в реакции транскрипции *in vitro* с примесью ДНК-матрицы размером 1140 п.о.

3. Оптимизация условий пробоподготовки образцов общей РНК для гибридизационного анализа на биочипах

Задачей этапа пробоподготовки является получение ДНК-мишеней для гибридизационного анализа из фракции общей бактериальной РНК. ДНК-мишени получали в последовательных реакциях синтеза первой цепи кДНК в реакции ОТ и амплификации гена БЛ методом ПЦР. От выхода ДНК-мишени зависит чувствительность разрабатываемого метода, поэтому необходимо оптимизировать условия, в которых синтез ДНК-мишени осуществляется с максимальной эффективностью. Для этого сравнили выход ДНК-мишеней БЛ TEM-1 при использовании для синтеза кДНК набора праймеров случайного состава длиной 10 оснований в комбинации с олиго-dT концевым праймером и ген-специфичного для этого типа БЛ праймера. В качестве образца использовали фракцию общей РНК, выделенную из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ TEM-1 (концентрация клеток 1×10^7 КОЕ/мл). Полученные кДНК амплифицировали в реакции ПЦР, размер и состав продуктов амплификации анализировали методом электрофореза. Результат, полученный с использованием набора случайных праймеров, принимали за «1» (Рис. 3А). Показано, что использование ген-специфичного праймера позволяет увеличить

выход продукта реакций ОТ+ПЦР в 3,5 раза, что объясняется направленным синтезом кДНК нужной специфичности и отсутствием синтеза нецелевых продуктов.

На следующем этапе работы изучали условия мультиплексной реакции ОТ для синтеза кДНК с использованием смеси четырех ген-специфичных праймеров БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-116, NDM-1, ОХА-48). В качестве матрицы использовали смесь стандартных образцов мРНК БЛ в одной концентрации (10 нМ). Для контроля использовали реакцию ОТ с одним типом праймера соответствующей БЛ. Далее полученные кДНК использовали в качестве матриц специфичных реакций ПЦР, выход ампликонов оценивали методом электрофореза. Сравнение эффективности совместного синтеза четырех типов кДНК в одной реакции ОТ со специфичными реакциями синтеза кДНК из мРНК каждого типа (Рис. 3Б) не выявило снижения эффективности ни для одного из генов БЛ.

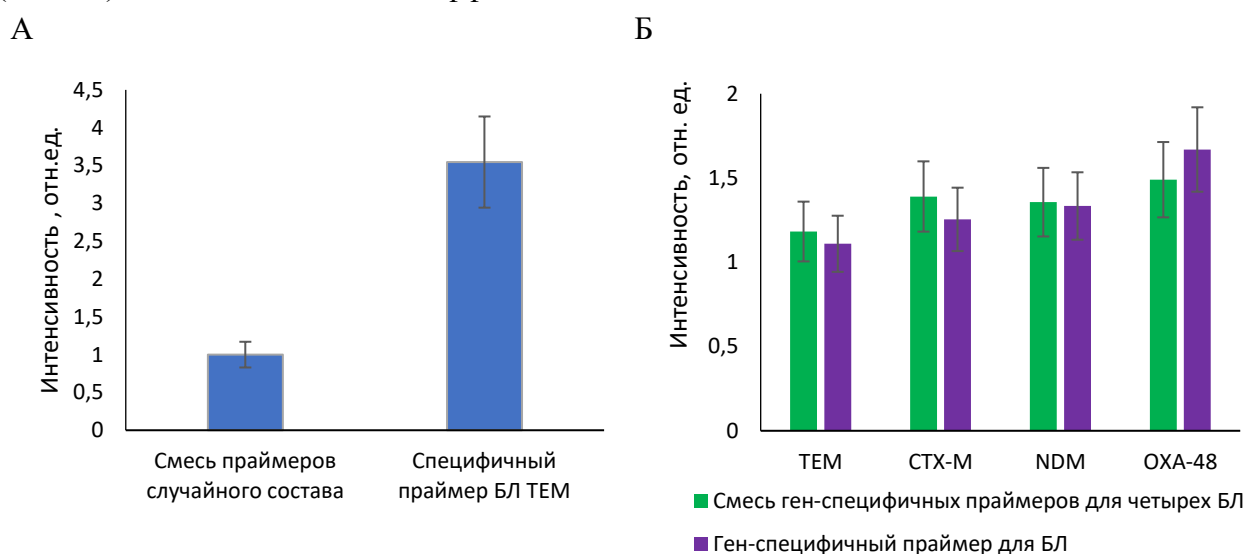


Рис. 3. А) Относительный выход ампликона гена БЛ ТЕМ-1 в реакциях ОТ+ПЦР. Реакцию ОТ проводили с использованием смеси праймеров случайного состава длиной 10 оснований и олиго-dT праймеров или ген-специфичного праймера для БЛ ТЕМ-типа. В качестве матрицы использован образец общей РНК, выделенный из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ ТЕМ-1 (1×10^7 КОЕ/мл). Б) Относительный выход ампликона гена БЛ в реакциях ОТ+ПЦР при проведении реакции ОТ в присутствии смеси ген-специфичных праймеров 4х типов (зеленые столбцы) или одного ген-специфичного праймера (фиолетовые столбцы). В качестве матриц использованы стандартные образцы мРНК в концентрации 10 нМ.

4. Оптимизация гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для количественного определения ДНК

Для выбора структуры специфичных олигонуклеотидных зондов были собраны и проанализированы нуклеотидные последовательности генов БЛ, относящихся к ТЕМ- и NDM- типам, а также к субкластерам СТХ-М-1 и ОХА-48. На основании выравнивания последовательностей генов БЛ каждого типа определяли их консервативные участки, не содержащие замен. Для каждой группы генов БЛ было выбрано несколько участков, на их основе выбрали структуру нескольких вариантов зондов для каждого типа БЛ длиной от 16 до 28 оснований. Зонды были протестированы в гибридизационном анализе ДНК-мишеней

разных БЛ (TEM-1, CTX-M-15, NDM-1 и OXA-48), полученных в реакции ПЦР из образцов ДНК, выделенных из штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных БЛ данных типов. Для дальнейшей работы были выбраны олигонуклеотидные зонды, обеспечивающие наиболее высокие значения интенсивностей окрашивания при одинаковой концентрации ДНК-мишени.

Для мультиплексного определения специфичных мРНК генов БЛ разработали дизайн биочипа, расположенного в лунке 96-луночного полистиролового планшета (Рис. 4). Биочип включает пять типов специфичных олигонуклеотидных зондов для определения клинически значимых генов БЛ разных молекулярных классов (TEM-, SHV- и CTX-M-типа (класса А), NDM-типа (класс В), OXA-48 типа (класс D)) и 2 контрольных зонда положительный и отрицательный контроли гибридизации (ПКГ и ОКГ), последовательности которых не встречаются у бактерий. Контрольные зонды используются для проверки корректности проведения стадии гибридизации и нормирования результатов гибридизации, для этого в каждую гибридизационную смесь добавляется меченный биотином олигонуклеотид, комплементарный по структуре зонду ПКГ. Корректность результатов гибридизации определяется наличием окрашивания в зонах с ПКГ и отсутствием окрашивания в зонах с ОКГ. Специфичные зонды нанесены в 6 повторах, контрольные зонды - в 3 повторах. Биочип включает 36 зон, размещенных в виде матрицы 6 x 6, имеет размер 3 x 3 мм (внутренний диаметр лунки - 8 мм). Диаметр каждой зоны составляет 0,3 мм, расстояние между их центрами – 0,5 мм.



Рис. 4. Схема расположения специфичных и контрольных олигонуклеотидных зондов на биочипе в лунке 96-луночного планшета. На биочипе иммобилизованы специфичные олигонуклеотидные зонды для идентификации БЛ TEM-, SHV-, CTX-M-типа (класс А), NDM-типа (класс В), OXA-48 типа (класс D) и два контрольных зонда (положительный и отрицательный контроли гибридизации), последовательности которых не встречаются у бактерий.

Для изучения специфичности олигонуклеотидных зондов для определения генов БЛ проводили гибридизацию разных ДНК-мишеней (TEM-1, CTX-M-15, NDM-1 и OXA-48), каждую на отдельном биочипе. Значения интенсивностей окрашивания зон со специфичными зондами нормировали на значение интенсивности окрашивания положительного контроля (Рис. 5).

Все выбранные специфичные зонды четырех типов БЛ характеризовались высокой специфичностью в отношении генов того же типа, неспецифичная гибридизация всех ДНК-мишеней с зондами некомплементарной структуры была незначительной (Рис. 5 А-Г). Высокая специфичность выбранных олигонуклеотидных зондов позволяет использовать их

в технологии биочипов для одновременного определения нескольких типов генов БЛ в одном анализе (Рис. 5Д).

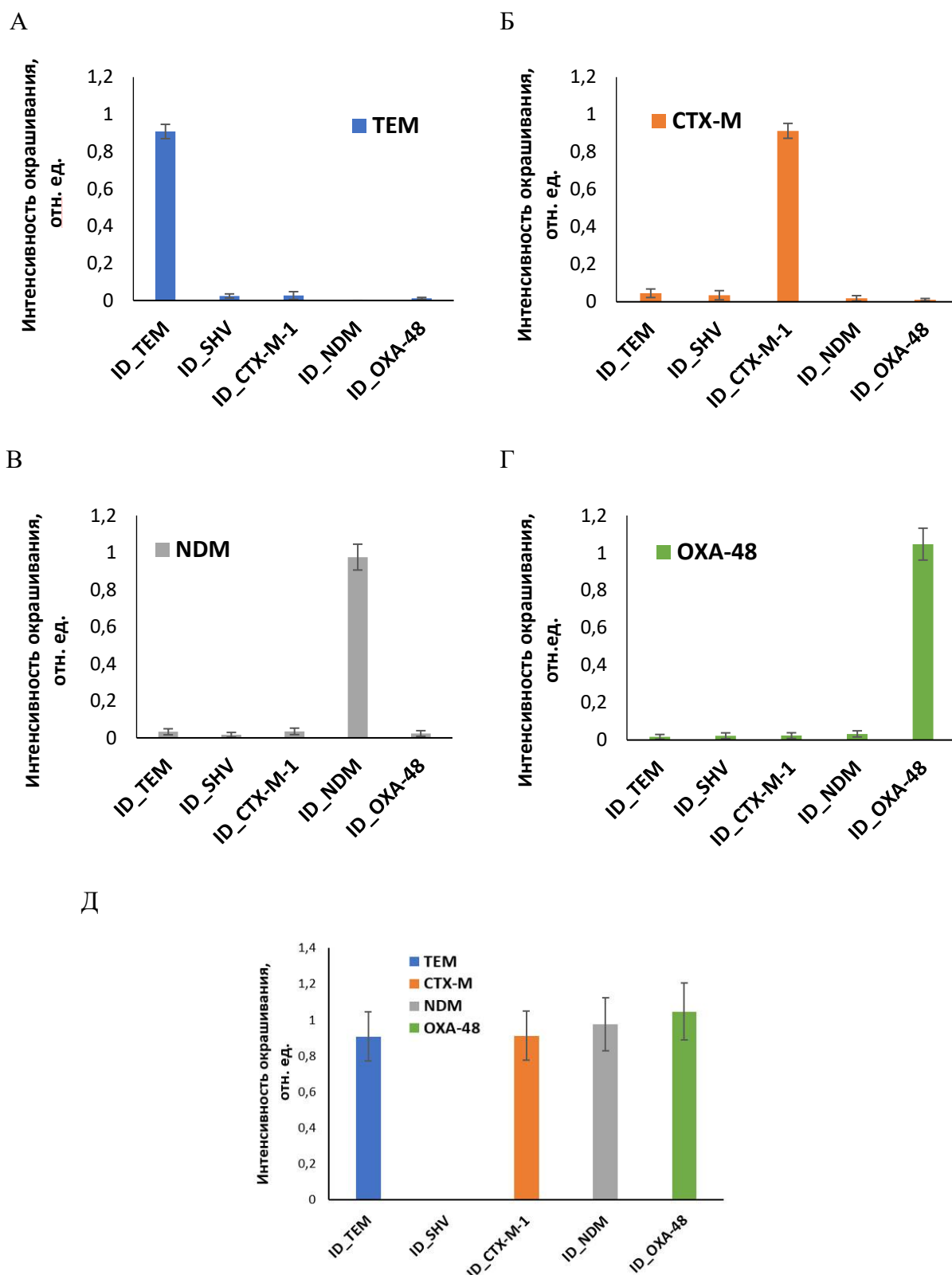


Рис. 5. Относительная интенсивность окрасивания зон одного биочипа после гибридизации ДНК-мишеней (400 нг в лунке), амплифицированных из образцов ДНК клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантных БЛ TEM-1, CTX-M-15, NDM-1, OXA-48, с олигонуклеотидными зондами разной специфичности. А-Г – гибридизация ДНК-мишени одной специфичности, Д – одновременная гибридизация смеси 4х генов БЛ разных типов.

5. Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз методом гибридизационного анализа на биочипах с использованием стандартных образцов

Для количественного определения мРНК генов БЛ использовали наборы стандартных образцов синтетических мРНК каждого типа с концентрациями в диапазоне от 0,01 до 20 нМ. Из них получали кДНК и затем меченные биотином ДНК-мишени в последовательных мультиплексных реакциях ОТ и ПЦР. Биотинилированные ДНК-мишени гибридизовали на биочипах, расположенных в лунках 96-луночных планшетов. Гибридизационная смесь включала биотинилированную ДНК-мишень, полученную из стандартного образца, и биотинилированный контрольный олигонуклеотид (для гибридизации с зондом ПКГ). Для повышения воспроизводимости анализа каждую смесь тестировали в двух повторах (в двух лунках планшета). Значения интенсивностей окрашивания зон, соответствующих специфичным сигналам для каждого типа зондов (усредненное значение из 6 повторов), нормировали на значения интенсивностей окрашивания зон ПКГ (усредненное значение из 3 повторов). На основании этих данных строили градуировочные кривые относительных интенсивностей окрашивания от концентрации мРНК каждого типа БЛ (Рис. 6).

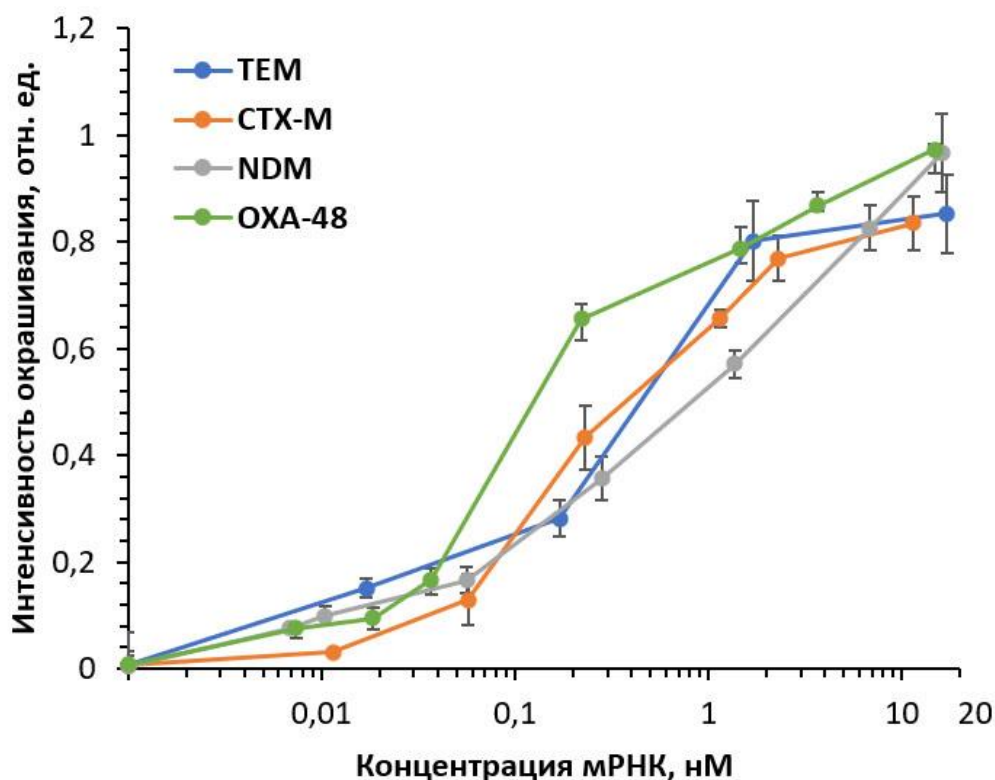


Рис. 6. Градуировочные кривые интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа от концентрации стандартных образцов мРНК БЛ четырех типов.

Пределы обнаружения мРНК составили: 7 ± 1 пМ (ТЕМ-1), $5 \pm 0,7$ пМ (СТХ-М-116), $6,0 \pm 0,9$ пМ (NDM-1), 7 ± 1 пМ (ОХА-48). Относительное стандартное отклонение не превышало 15%. Диапазоны определяемых концентраций мРНК и диапазон интенсивностей окрашивания зон биочипа оказались близкими для всех типов исследованных генов БЛ (Рис. 6), что важно для их одновременного определения.

6. Анализ влияния бета-лактамов на транскрипцию генов бета-лактамаз у клинических штаммов Enterobacteriaceae с разной устойчивостью к АБП

6.1 Выбор бактериальных штаммов и условий их культивирования

На следующем этапе провели апробацию разработанного метода для определения мРНК генов БЛ в клинических штаммах Enterobacteriaceae с разным уровнем чувствительности к АБП. Данную часть работы выполняли в сотрудничестве с Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Были выбраны шесть штаммов, выделенных из клинического биологического материала (моча, аспират) от пациентов лечебных учреждений г. Москвы. В Таблице 1 представлены результаты определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) четырех групп бета-лактамовых АБП (пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов и карбапенемов) в отношении выбранных штаммов с использованием стандартных микробиологических методов.

Таблица 1. Характеристика клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae, использованных в работе.

Вид бактерий	Штамм	МПК, мг/л				Фенотип резистентности	Плазмидно-локализованные гены БЛ	Класс БЛ
		Пенициллин	Цефалоспорин	Карбапенем	Монобактам			
		AMP*	CAZ*	MER*	AZT*			
<i>E. coli</i>	B-1350/18	256	0,5	0,25	0,5	R	<i>bla</i> _{TEM-1}	A
<i>K. pneumoniae</i>	B-1088/17	≥256	1	0,25	0,25	R	<i>bla</i> _{TEM-1}	A
<i>K. pneumoniae</i>	B-1639/16	≥256	64	32	≥256	MDR	<i>bla</i> _{OXA-48}	D
<i>K. pneumoniae</i>	B-1781/16	≥256	≥256	128	128	MDR	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{NDM-1}	A, B
<i>K. pneumoniae</i>	B-2125/17	≥256	256	128	≥256	MDR	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-48}	A, D
<i>E. coli</i>	B-2607/18 (контроль)	4	0,25	0,25	0,25	-	-	-

* AMP - ампициллин; CAZ - цефтазидим; MER - меропенем; AZT – азтреонам; R - резистентный; MDR - множественно резистентный

Два штамма (*E.coli* B-1350/18 и *K. pneumoniae* B-1088/17) характеризовались устойчивостью только к одной группе бета-лактамов – пенициллинам (далее они будут называться монорезистентные), три штамма (*K. pneumoniae* B-1639/16, *K. pneumoniae* B-1781/16 и *K. pneumoniae* B-2125/17) были мультирезистентными и характеризовались устойчивостью ко всем группам бета-лактамов, контрольный штамм *E.coli* B-2607/18 был чувствительным ко всем бета-лактамам. Методом гибридизационного анализа на биочипах у выбранных штаммов были идентифицированы гены БЛ класса А (TEM-1, CTX-M-15), класса В (NDM-1) и класса D (OXA-48) в разных сочетаниях (Таблица 1).

Клинические штаммы культивировали в присутствии бета-лактамов АБП и в их отсутствие. В качестве представителей АБП выбрали по одному представителю каждой группы бета-лактамов: ампициллин (группа пенициллинов), цефтазидим (цефалоспорины III поколения), меропенем (карбапенем) и азтреонам (монобактам). Каждый АБП использовали в 3-4 концентрациях, с учетом значения МПК. Концентрации АБП составили: для ампициллина - 8, 100 и 250 мг/л; для цефтазидима - 5, 20, 60 и 250 мг/л; для меропенема - 5, 10, 30 и 120 мг/л; для азтреонама - 5, 60, 120 и 250 мг/мл. Выбранные значения соответствовали разным диапазонам концентраций бета-лактамов в крови человека при лечении и субингибирующим концентрациям, близким к подавляющим рост бактерий. Каждое культивирование проводили в течение 4 ч в 3-х повторах. Количество клеток, выросших в течение выбранного времени в присутствии выбранных концентраций АБП, находилось в диапазоне от 1×10^7 до $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл в зависимости от типа и концентрации АБП. У монорезистентных штаммов (*E. coli* В-1350/18 и *K. pneumoniae* В-1088/17) рост бактериальных клеток был подавлен при культивировании в присутствии цефтазидима, меропенема и азтреонама. При культивировании штаммов *K. pneumoniae* В-1639/16, *K. pneumoniae* В-1781/16 и *K. pneumoniae* В-2125/17 в присутствии меропенема в концентрациях 30 и 120 мг/л рост клеток был также подавлен.

6.2 Определение специфических мРНК генов бета-лактамаз в транскриптах клинических штаммов Enterobacteriaceae

Из образцов культивированных бактериальных штаммов выделяли фракции общей РНК и в них определяли концентрации специфических мРНК генов БЛ четырех типов с использованием биочипов по градуировочным кривым со стандартными образцами. Всего было получено и проанализировано 49 образцов РНК-транскриптов, выделенных из клинических штаммов, каждый в трех повторах.

В образце общей РНК контрольного штамма *E. coli* В-2607/18, культивированного в отсутствие АБП, окрашивание специфических зон биочипов отсутствует и, соответственно, нет синтеза мРНК генов БЛ. Роста клеток данного штамма в присутствии АБП не наблюдали. Это свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов при использовании разработанного метода.

Для стандартизации полученных данных рассчитывали количество специфических мРНК генов БЛ, синтезированных в 10^9 бактериальных клеток, на основании значений концентраций мРНК, определенных по градуировочным кривым, по формуле:

$$n_{\text{кл.мРНК}} = \frac{C_{\text{РНК}} \times V_{\text{РНК}}}{n_{\text{кл}}} \times 10^9 \text{ кл} \quad (1),$$

где $n_{\text{кл.мРНК}}$ - количество специфических мРНК в 10^9 бактериальных клеток; $C_{\text{РНК}}$ - концентрация мРНК гена БЛ, определенная по градуировочной кривой; $V_{\text{РНК}}$ - объем образца общей РНК, выделенной из бактериальной культуры; $n_{\text{кл}}$ - общее количество бактериальных клеток в среде культивирования.

В Таблице 2 представлены результаты определения количеств специфических мРНК генов БЛ в образцах РНК-транскриптов клинических штаммов, культивированных в присутствии АБП разных групп.

Таблица 2. Количество специфичных мРНК генов БЛ (TEM-1, CTX-M-15, OXA-48 и NDM-1) в 1×10^9 клеток клинических штаммов, культивированных в присутствии бета-лактамов АБП.

Условия культивирования, АБП /концентрация (мг/л)	<i>E. coli</i> В-1350/18 Моно-	<i>K. pneumoniae</i> В-1088/17 Моно-	<i>K. pneumoniae</i> В-1639/16 Мульти-	<i>K. pneumoniae</i> В-1781/16 Мульти-	<i>K. pneumoniae</i> В-2125/17 Мульти-				
	Количество мРНК генов БЛ в 1×10^9 клеток, фмоль								
Без АБП (контроль)	TEM-1 2,8	TEM-1 2,0	OXA-48 0,6	TEM-1 0,6	CTX-M-15 0,6	NDM-1 0,3	TEM-1 2,4	CTX-M-15 0,5	OXA-48 0,2
Пенициллины									
Ампициллин 8 мг/л	1,0	0,8	0,4	0,5	0,5	0,3	0,8	2,0	0,4
Ампициллин 100 мг/л	46,7	Нет роста	0,3	0,2	0,8	0,4	0,8	0,5	0,6
Ампициллин 250 мг/л	48,0	Нет роста	9,67	0,2	0,4	0,4	1,2	0,5	4,0
Цефалоспорины III поколения									
Цефтазидим 5 мг/л	Нет роста	Нет роста	8,0	0,8	1,4	0,2	0,4	1,2	0,2
Цефтазидим 20 мг/л	Нет роста	Нет роста	3,6	6,0	6,0	0,4	0,4	0,5	0,4
Цефтазидим 60 мг/л	Нет роста	Нет роста	1,0	0,03	3,2	0,04	0,1	1,5	1,2
Цефтазидим 250 мг/л	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2,8	10,0	0,03	0,1	0,1	0,3
Карбапенемы									
Меропенем 5 мг/л	Нет роста	Нет роста	66,7	1,6	7,2	0,05	60,0	12,0	7,2
Меропенем 10 мг/л	Нет роста	Нет роста	12,0	3,5	2,5	1,3	12,0	20,0	0,6
Монобактамы									
Азтреонам 5 мг/л	Нет роста	Нет роста	1,20	0,004	0,6	0,04	2,4	1,0	0,06
Азтреонам 60 мг/л	Нет роста	Нет роста	13,3	0,004	8,0	0,2	2,4	1,7	0,1
Азтреонам 120 мг/л	Нет роста	Нет роста	20,0	0,5	Нет данных	2,0	0,8	17,3	0,3
Азтреонам 250 мг/л	Нет роста	Нет роста	13,3	4,0	200,0	2,4	0,003	1,7	Нет данных

В клетках монорезистентных штаммов при индукции ампициллином выявлена только транскрипция гена БЛ TEM-1. В клетках штамма *E. coli* В-1350/18 транскрипция гена БЛ TEM-1 увеличивалась при увеличении концентрации ампициллина. В клетках штамма *K. pneumoniae* В-1088/17 при концентрации ампициллина 8 мг/л транскрипция гена БЛ TEM-1 уменьшалась, более высокие концентрации антибиотика полностью подавляли рост этого штамма.

Наиболее широкий диапазон изменения количеств мРНК под действием различных бета-лактамов наблюдался в клетках мультирезистентных штаммов для генов БЛ TEM-1, ОХА-48 и СТХ-М-15.

В клетках штамма *K. pneumoniae* В-1639 в присутствии разных бета-лактамов обнаружено увеличение транскрипции мРНК гена ОХА-48, причем наибольшее увеличение происходило в присутствии меропенема.

В клетках штамма *K. pneumoniae* В-1781 наблюдали увеличение транскрипции мРНК гена СТХ-М-15 в присутствии всех бета-лактамов; мРНК гена TEM-1 - в присутствии цефтазидима и меропенема; мРНК гена NDM-1 - в присутствии меропенема.

В клетках штамма *K. pneumoniae* В-2125 также обнаружено увеличение транскрипции мРНК гена СТХ-М-15 в присутствии всех бета-лактамов; мРНК гена ОХА-48 - в присутствии ампициллина, цефтазидима и меропенема, мРНК гена TEM-1 - в присутствии меропенема.

Зависимость транскрипции мРНК генов БЛ от концентрации АБП имела нелинейный характер: в большинстве случаев при использовании цефтазидима, меропенема и азтреонама наблюдали максимальное увеличение транскрипции мРНК генов БЛ при концентрациях АБП, в которых рост клеток был существенно подавлен.

Для подробного анализа влияния различных АБП на транскрипцию мРНК генов БЛ рассчитывали относительное изменение количества специфичных мРНК как отношение мРНК, определенного при культивировании бактериального штамма в присутствии данного АБП, к количеству мРНК в отсутствие АБП, по формуле (2):

$$k = \frac{n_{\text{АБП}}}{n_{\text{Без АБП}}} \quad (2),$$

где k – относительное изменение количества синтезируемых мРНК генов БЛ; $n_{\text{АБП}}$ – количество мРНК гена БЛ, синтезируемое в 10^9 клеток в присутствии АБП; $n_{\text{Без АБП}}$ – количество мРНК гена БЛ, синтезируемое в 10^9 клеток в отсутствие АБП.

Результаты определения относительных изменений количеств мРНК генов БЛ показаны в Таблице 3. Отсутствие изменения уровня транскрипции наблюдали в 12 транскриптах генов БЛ, в 31 транскриптах генов БЛ наблюдали снижение уровня транскрипции, причем в 5 из них снижение было значительным (от 20 до 1000 раз), в остальных случаях наблюдали увеличение транскрипции генов БЛ (до 330 раз).

В клетках мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* ампициллин активировал транскрипцию мРНК гена БЛ ОХА-48 или СТХ-М-15. Транскрипция мРНК гена БЛ TEM-1 была подавлена (Таблица 3).

Таблица 3. Относительное изменение количества синтезируемых мРНК генов БЛ у клинических штаммов при культивировании в присутствии бета-лактамов АБП. Зеленый соответствует отсутствию изменений количества мРНК; голубой – сниженно; красной – увеличено.

Условия культивирования, АБП /концентрация (мг/л)	<i>K. pneumoniae</i> В-1639/16 Мульти-		<i>K. pneumoniae</i> В-1781/16 Мульти-		<i>K. pneumoniae</i> В-2125/17 Мульти-		
	ОХА-48	ТЕМ-1	СТХ-М-15	NDM-1	ТЕМ-1	СТХ-М-15	ОХА-48
Ген БЛ	1	1	1	1	1	1	1
Без АБП (контроль)	1	1	1	1	1	1	1
Пенициллины							
Ампициллин 8 мг/л	0,6	0,8	0,8	0,9	0,3	3,8	2,0
Ампициллин 100 мг/л	0,4	0,3	1,3	1,1	0,3	1,0	3,0
Ампициллин 250 мг/л	15,0	0,3	2,0	1,1	0,5	1,0	20,0
Цефалоспорины III поколения							
Цефтазидим 5 мг/л	12,5	1,3	2,3	0,5	0,2	2,3	0,8
Цефтазидим 20 мг/л	5,6	10,0	10,0	1,1	0,2	0,9	2,0
Цефтазидим 60 мг/л	1,6	0,05	5,3	0,1	0,05	2,9	6,0
Цефтазидим 250 мг/л	Нет роста	4,7	16,7	0,09	0,05	0,2	1,6
Карбапенемы							
Меропенем 5 мг/л	104,2	2,7	12,0	0,2	25,0	23,1	36,0
Меропенем 10 мг/л	18,7	5,8	4,2	3,9	5,0	38,5	3,0
Монобактамы							
Азтреонам 5 мг/л	1,9	0,007	1,0	0,1	1,0	1,8	0,3
Азтреонам 60 мг/л	20,8	0,007	13,3	0,7	1,0	3,3	0,5
Азтреонам 120 мг/л	31,2	0,9	Нет данных	6,2	0,3	33,3	1,3
Азтреонам 250 мг/л	20,8	6,7	333,3	7,5	0,001	3,3	Нет данных

Цефтазидим активировал транскрипцию мРНК гена БЛ СТХ-М-15; при повышении концентрации антибиотика происходило повышение уровня транскрипции мРНК гена БЛ ОХА-48, иногда в сочетании с транскрипцией мРНК гена СТХ-М-15, при этом транскрипция мРНК генов БЛ ТЕМ-1 и NDM-1 была подавлена (Таблица 3).

Азтреонам активировал транскрипцию мРНК генов БЛ СТХ-М-15 и ОХА-48. Транскрипция мРНК гена ТЕМ-1 была подавлена, увеличение транскрипции мРНК гена NDM-1 наблюдалось только при высоких концентрациях антибиотика (Таблица 3).

Меропенем увеличивал транскрипцию мРНК всех генов БЛ плазмидной локализации, имеющих у мультирезистентных штаммов (Таблица 3), и его можно использовать для анализа активации транскрипции мРНК генов различных БЛ в бактериальных штаммах.

Полученные результаты показали возможность использования разработанного нами метода мультиплексного гибридизационного анализа на биочипах для количественного определения специфичных мРНК генов БЛ в транскриптах бактериальных штаммов в широком диапазоне концентраций АБП. Анализ полученных данных свидетельствует о разнонаправленном влиянии АБП на транскрипцию мРНК генов разных БЛ мультирезистентными бактериями.

Таким образом, использование метода количественного определения мРНК генов БЛ на биочипах позволило провести комплексный мультифакторный анализ влияния разных групп бета-лактамов в разных концентрациях на штаммы, несущие плазмидно-кодируемые гены БЛ разных классов. Это позволило получить новые данные об изменениях уровней транскрипции мРНК генов БЛ. Применение мультиплексного гибридизационного анализа мРНК на биочипах с использованием стандартных образцов соответствующих мРНК генов БЛ разных типов позволило количественно охарактеризовать как увеличение, так и уменьшение транскрипции мРНК генов БЛ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод количественного определения специфичных мРНК генов бета-лактамаз на колориметрических биочипах низкой плотности с использованием синтетических стандартных образцов. Стандартные образцы мРНК проходят все стадии анализа на биочипах в лунках 96-луночных планшетов одновременно с исследуемыми образцами, что позволяет существенно повысить воспроизводимость и производительность метода.
2. Оптимизирована методика мультиплексной реакции обратной транскрипции для одновременного синтеза первой цепи кДНК бета-лактамаз четырех типов (TEM-, CTX-M-1-, NDM-, OXA-48-). Показано увеличение эффективности синтеза кДНК при использовании специфичных для бета-лактамаз праймеров.
3. Разработан биочип для определения концентраций специфичных мРНК четырех типов клинически значимых бета-лактамаз (TEM-, CTX-M-1-типов (класс A), NDM- типа (класс B), OXA-48-типа (класс D)) с использованием стандартных образцов каждого типа. Пределы обнаружения составили: мРНК TEM-типа – 7 ± 1 пМ, мРНК CTX-M-1-типа – $5 \pm 0,7$ пМ, мРНК NDM-типа - $6,0 \pm 0,9$ пМ, мРНК OXA-48-типа – 7 ± 1 пМ.
4. Изучено влияние бета-лактамов разных групп (ампициллина, цефтазидима, меропенема и азтреонама) в широком диапазоне концентраций на изменение транскрипции мРНК генов бета-лактамаз у клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae.
5. Для монорезистентных штаммов Enterobacteriaceae, характеризующихся устойчивостью к бета-лактамам группы пенициллинов, показана транскрипция плазмидно-кодируемого гена бета-лактамазы TEM-1. Другие группы бета-лактамов полностью подавляют рост монорезистентных штаммов.
6. Для мультирезистентных бактерий *K. pneumoniae* показано, что разные группы бета-лактамов индуцируют различный спектр транскриптов плазмидно-кодируемых генов бета-лактамаз. Транскрипция мРНК генов бета-лактамаз у разных штаммов зависит от типа и концентрации бета-лактаманного антибиотика.
7. Показано, что меропенем в низких концентрациях вызывает увеличение транскрипции всех плазмидно-кодируемых генов бета-лактамаз (в $2,5-10^4$ раза в зависимости от типа гена) у штаммов *K. pneumoniae*. Меропенем может быть использован как активатор транскрипции специфичных мРНК для изучения экспрессии генов бета-лактамаз у мультирезистентных штаммов.

Список использованной литературы

1. Tan K., Nguyen J., Nguyen K., et al. Prevalence of the carbapenem-heteroresistant phenotype among ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates // *J Antimicrob Chemother.* – 2020. – V. 75. – № 6. – P. 1506-1512.
2. De Angelis G., Del Giacomo P., Posteraro B., et al. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae* // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – № 14. – P. 5090.
3. Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2018. – V. 115. – № 15. – P. 3463.
4. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2018. Vol. 62. – №10. – P. 1-20.
5. Bonomo R.A. β -lactamases: a focus on current challenges // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2017. Vol. 7. – № 1. – P. 1-16.
6. Paul D., Dhar D., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Transcriptional Analysis of IncF_{repB}-Mediated *bla*_{OXA-48}-Positive Plasmid Characterized from *Escherichia coli* ST448 // *Microb Drug Resist.* – 2021. – V. 27. – № 5. – P. 596-601.
7. Fursova A.D., Fursov M.V., Astashkin E.I., et al. Early Response of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes Expression in Classical, Hypervirulent, and Hybrid hvKp-MDR *Klebsiella pneumoniae* on Antimicrobial Stress // *Antibiotics (Basel).* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 7.
8. Maurya A.P., Chanda D.D., Bora D., Das Talukdar A., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Transcriptional Response of Multiple ESBL Genes Within *Escherichia coli* Under Oxyimino-Cephalosporin Stress // *Microb Drug Resist.* – 2017. – V. 23. – № 2. – P. 133-138.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus, РИНЦ:

1. Рубцова М.Ю., Филиппова А.А., Фурсова Н.К., Григоренко В.Г., Преснова Г.В., Уляшова М.М., Егоров А.М. Количественное определение мРНК бета-лактамаз в РНК-транскриптах резистентных к антибиотикам бактерий с использованием колориметрических биочипов // *Журнал аналитической химии.* – Т. 77. – № 5. – С. 393-405. (Rubtsova M.Yu., **Filippova A.A.**, Fursova N.K., Grigorenko V.G., Presnova G.V., Ulyashova M.M., Egorov A.M. Quantitative determination of beta-lactamase mRNA in the RNA-transcripts of antibiotic-resistant bacteria using colorimetric biochips // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2022. – V. 77. – № 5. – P. 519-530. [Импакт-фактор WoS = 1,237]).
2. **Филиппова А.А.**, Преснова Г.В., Григоренко В.Г., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Метод обработки цифровых изображений колориметрических биочипов для количественного определения генов антибиотикорезистентности бактерий // *Биотехнология.* – 2021. – Т. 37. – №5. – С. 123-131. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,5].
3. Presnova G.V., Presnov D.E., **Filippova A.A.**, Tsiniaikin I.I., Ulyashova M.M., Rubtsova M.Y. Multiplex Digital Quantification of β -Lactamase Genes in Antibiotic-Resistant Bacteria by Counting Gold Nanoparticle Labels on Silicon Microchips // *Biosensors.* – 2022. – V. 12. – № 4. – P. 256. [Импакт-фактор WoS = 5,743]
4. Уляшова М.М., Преснова Г.В., Поболелова Ю.И., **Филиппова А.А.**, Егоров А.М., Рубцова М.Ю. Скрининг бактериальных генов, ответственных за устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, с использованием микрочипов с ферментативной

детекцией // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. -2016. - Т.57. - № 4. – С. 245-252. (Ulyashova M.M., Presnova G.V., Pobolelova Y.I., **Filippova A.A.**, Egorov A.M., Rubtsova M.Yu. Screening of bacterial genes responsible for resistance to beta-lactam antibiotics using microarrays with enzymatic detection // Moscow University Chemistry Bulletin. - 2016. – V. 71. – P. 236-242. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,8])

5. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Фурсова Н.К. Экспрессия генов бета-лактамаз у бактерий, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам // Бактериология, 2020, Т. 5, № 3, с. 34-46. [Импакт- фактор РИНЦ 0,308].

Статья в сборнике

Филиппова А.А., Рубцова М.Ю., Фурсова Н.К., Новикова Т.С., Добрякова Н.В., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Егоров А.М. Полуколичественный метод определения уровня экспрессии генов бета-лактамаз TEM-типа на основе биочипов низкой плотности // Сборник трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика. – 2021. – Т. 2. - С. 74-75.

Публикации по докладам на научных конференциях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Поболелова Ю.И., Игнатенко О.В., **Филиппова А.А.**, Егоров А.М. Платформа олигонуклеотидных биочипов с ферментативной детекцией для диагностики устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам // Acta Naturae. – 2016. – Т. 2. - № Спецвыпуск. - С. 133. [Импакт-фактор WoS = 2,204]

2. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Преснова Г.В., Добрякова Н.В., Уляшова М.М., Егоров А.М. Метод определения уровня экспрессии генов бета-лактамаз на биочипах для контроля антибиотикорезистентности бактерий // Acta Naturae. – 2019. – Т. 1. - № Спецвыпуск. - С. 188. [Импакт-фактор WoS = 2,204]

Тезисы докладов научных конференций

1. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Фурсова Н.К., Преснова Г.В., Уляшова М.М., Григоренко В.Г., Егоров А.М. Гибридизационный анализ на колориметрических биочипах для количественного определения генов бета-лактамаз у бактерий, устойчивых к антибиотикам // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2021. - Т. 19. - С. 252-254.

2. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Фурсова Н.К., Егоров А.М. Гибридизационный анализ на колориметрических биочипах для количественного определения мРНК бета-лактамаз // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021». – 2021. - С. 1205.

3. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Фурсова Н.К., Егоров А.М. Определение экспрессии генов бета-лактамаз на биочипах у бактерий, резистентных к бета-лактамам антибиотикам // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020». – 2020. - С.1601.

4. **Филиппова А.А.**, Рубцова М.Ю., Лев А.И., Фурсов М.В., Фурсова Н.К., Преснова Г.В., Григоренко В.Г., Егоров А.М. Идентификация экспрессируемых генов бета-лактамаз у грамотрицательных бактерий, устойчивых к антибиотикам // Сборник трудов международной научно-практической конференции "Молекулярная диагностика". – 2018. - С. 70-71.

5. Рубцова М.Ю., Преснова Г.В., **Филиппова А.А.**, Уляшова М.М., Егоров А.М. Олигонуклеотидные биочипы с наночастицами золота в качестве метки для идентификации генетических детерминант антибиотикорезистентности // Материалы международного форума "Биотехнология: состояние и перспективы развития". – 2018. - С. 570-571.

Сокращения, принятые в тексте. АБП - антибактериальные препараты, БЛ - бета-лактамаза, МПК – минимальная подавляющая концентрация, ОКГ – отрицательный контроль гибридизации, ОТ - обратная транскрипция, ПКГ -положительный контроль гибридизации, ПЦР – полимеразная цепная реакция.