

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ФИЛИППОВА АННА АНДРЕЕВНА

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

1.5.6 -биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

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

Москва – 2022

Оглавление

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 10 |
| Глава 1. Антибиотикорезистентность бактерий | 10 |
| 1.1 Возбудители бактериальных инфекций и АБП для борьбы с ними | 10 |
| 1.2 Механизмы устойчивости к бета-лактамам..... | 11 |
| Глава 2. Бета-лактамазы | 12 |
| 2.1 Классификация бета-лактамаз | 12 |
| 2.2 Распространенность грамотрицательных бактерий, устойчивых к бета-лактамам. | 17 |
| 2.3 Клинически значимые бета-лактамазы различных молекулярных классов..... | 20 |
| 2.3.1 Бета-лактамазы TEM-типа..... | 20 |
| 2.3.2 Бета-лактамазы SHV-типа | 22 |
| 2.3.3 Бета-лактамазы CTX-M-типа | 23 |
| 2.3.4. Бета-лактамазы KPC-типа | 24 |
| 2.3.5 Бета-лактамазы NDM-типа..... | 24 |
| 2.3.6 Бета-лактамазы OXA-типа..... | 25 |
| Глава 3. Действие бета-лактамных препаратов и механизмы индукции генов антибиотикорезистентности бактерий..... | 26 |
| 3.1 Сигнальные пути для проявления антибиотикорезистентности в | 27 |
| 3.2 Механизмы развития приобретенной резистентности бактерий под действием АБП | 31 |
| 3.4 Индукция экспрессии генов бета-лактамаз под действием АБП | 33 |
| 3.5 Методы определения экспрессии генов антибиотикорезистентности | 35 |
| Заключение | 41 |
| МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 43 |
| Реагенты и оборудование..... | 43 |
| Методы исследований | 44 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 54 |
| Глава 4. Получение стандартных образцов мРНК бета-лактамаз..... | 57 |
| Глава 5. Оптимизация условий пробоподготовки образцов РНК для гибридационного анализа на биочипах | 61 |
| 5.1 Выделение общей РНК из бактериальных культур..... | 61 |
| 5.2 Получение меченных биотином ДНК-мишеней бета-лактамаз из образцов РНК .. | 62 |
| 5.2.1 Оптимизация условий получения первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции | 62 |
| 5.2.2 Оптимизация количества циклов ПЦР | 66 |

| | |
|--|-----|
| 5.2.3 Оптимизация условий мультиплексной реакции обратной транскрипции | 68 |
| Глава 6. Оптимизация гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для количественного определения ДНК..... | 69 |
| 6.1 Выбор параметров нанесения олигонуклеотидных зондов на биочип и оптимизация структуры специфичных зондов для генов бета-лактамаз | 69 |
| 6.1.1 Оптимизация параметров печати олигонуклеотидных зондов в лунках 96-луночных планшетов..... | 69 |
| 6.1.2 Структура специфичных олигонуклеотидных зондов для определения бета-лактамаз четырех типов | 72 |
| 6.2 Оптимизация условий колориметрической детекции на биочипах для выявления меченых биотином дуплексов ДНК | 79 |
| 6.2.1 Оптимизация концентрации конъюгата стрептавидин-пероксидаза | 79 |
| 6.2.2 Оптимизация метода обработки цифровых изображений колориметрических биочипов..... | 80 |
| 6.3 Сравнение методов детекции биотина для количественного определения биотинилированных ДНК-мишеней..... | 83 |
| Глава 7. Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз методом гибридизационного анализа на биочипах с использованием стандартных образцов..... | 86 |
| 7.1 Дизайн биочипа | 86 |
| 7.2 Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз методом гибридизационного анализа на биочипах с использованием стандартных образцов..... | 87 |
| 7.3 Определение мРНК генов бета-лактамаз в смесях стандартных образцов | 89 |
| Глава 8. Анализ влияния бета-лактамов на транскрипцию генов бета-лактамаз у клинических штаммов Enterobacteriaceae с разной устойчивостью к АБП..... | 94 |
| 8.1 Выбор бактериальных штаммов и условий их культивирования | 94 |
| 8.2 Рост клинических штаммов в присутствии АБП | 94 |
| 8.3 Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз в транскриптах клинических штаммов Enterobacteriaceae | 98 |
| Заключение..... | 111 |
| ВЫВОДЫ | 114 |
| Список литературы..... | 115 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП – антибактериальные препараты

БЛ – бета-лактамазы

БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГК – гистидинкиназа

ДКРС – двухкомпонентные регуляторные системы

КОЕ – колониеобразующая единица

КЧ – коэффициент чувствительности

МБЛ – металло-бета-лактамазы

МГЭ – мобильные генетические элементы

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МПК – минимальная подавляющая концентрация

НЧ – наночастицы

ОКГ – отрицательный контроль гибридизации

ОТ – обратная транскрипция

ПКГ – положительный контроль гибридизации

ПО – предел обнаружения

ПСБ – пенициллин-связывающий белок

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РО – регулятор ответа

Стр-Пх – стрептавидин-пероксидаза хрена

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ВВЕДЕНИЕ

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-лактаменных 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 (ТЕМ-, СТХ-М-1-, NDM- и ОХА-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-лактамов 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" BIOTECH 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Антибиотикорезистентность бактерий

1.1 Возбудители бактериальных инфекций и АБП для борьбы с ними

Бактериальные инфекции вызывают беспокойство в мировом сообществе из-за повышенной смертности от них [9]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) у 8% пациентов, находящихся в лечебных учреждениях, обнаруживаются внутрибольничные инфекции, связанные с хирургическим вмешательством, инфекциями дыхательных, мочевыводящих путей и кровотока, грибковыми инфекциями, инфекциями центральной нервной системы, пневмониями, аспергиллезом легких и др. [10, 11]. К распространенным условно-патогенным микроорганизмам относятся некоторые виды бактерий: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *E. faecium*, *S. aureus*, метициллин-устойчивый *S. aureus*, *C. difficile* и *A. baumannii* [12]. Для лечения бактериальных инфекций используют АБП, которые подавляют или существенно замедляют рост патогенных клеток, что приводит к гибели бактериальной популяции. Чрезмерное и неконтролируемое использование АБП в медицине и, особенно, в сельском хозяйстве, а также несоблюдение рекомендуемых доз привело к развитию устойчивости бактерий к антибиотикам и возникновению МЛУ – резистентности одновременно к нескольким классам АБП [10, 13]. Широкое распространение антибиотикорезистентности обусловлено наличием генов резистентности, которые часто локализованы на мобильных генетических элементах (МГЭ), способных легко передаваться между различными видами бактерий, что привело к появлению мульти- и пан-резистентных микроорганизмов, подавление роста которых не удастся достичь с использованием стандартных стратегий антибиотикотерапии. Кроме представляющих угрозу бактерий с МЛУ, большую опасность вызывают бактерии, проявляющие фенотипическую гетерорезистентность [14]. При этом типе резистентности бактерии одной популяции могут проявлять различную чувствительность к АБП, что приводит к трудностям при их фенотипической классификации.

Современные бета-лактамы составляют около 65% всех АБП, используемых в клинической практике [2, 15]. Они включают четыре группы: три имеют бициклическую структуру (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы), а четвертая группа имеет моноциклическую структуру (монобактамы) (Рис. 1). Мишенью действия бета-лактамов являются пенициллин-связывающие белки (ПСБ), катализирующие разные процессы синтеза пептидогликана: удлинение гликановых цепей (трансликозилирование), сшивку между двумя гликановыми цепями (транспептидация), гидролиз связи между двумя гликановыми цепями (эндопептидация) и гидролиз связи в дипептиде D-Ala-D-Ala (DD-

карбоксипептидирование) [16, 17]. Механизм этих реакций включает образование стабильного ацил-ферментного комплекса с участием остатка серина в активном центре ПСБ. Бета-лактаманное кольцо антибиотика является структурным аналогом дипептида D-Ala-D-Ala и конкурирует с ним, образуя ковалентный ацил-ферментный комплекс. В результате ингибирования ПСБ нарушается синтез клеточной стенки, и бактериальная клетка погибает [18].

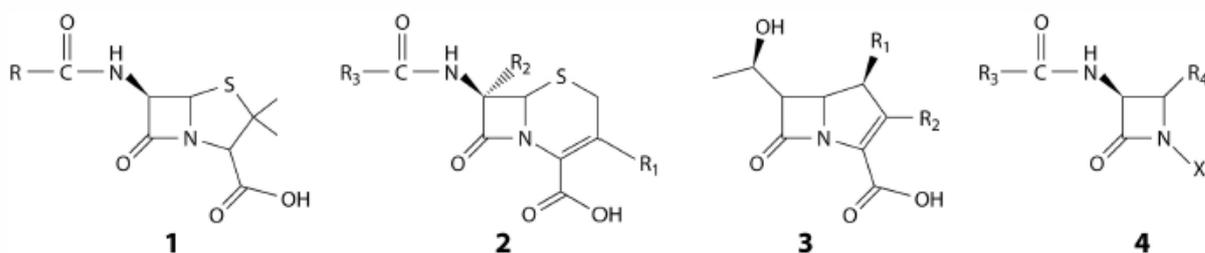


Рис. 1. Структуры четырех групп бета-лактаманых АБП: пенициллинов (1), цефалоспоринов (2), карбапенемов (3) и монобактамов (4) [19].

1.2 Механизмы устойчивости к бета-лактамам

Устойчивость грамотрицательных бактерий к бета-лактамам обусловлена прежде всего синтезом бета-лактамаз (БЛ) - ферментов, принадлежащих к классу гидролаз EC 3.5.2.6 [19, 20]. Данное суперсемейство объединено основной функцией – способностью гидролизовать данные АБП [21]. Сериновые БЛ образуют ковалентный комплекс серина активного центра с молекулой антибиотика (ацил-фермент), при этом происходит разрыв амидной связи в бета-лактаманном кольце антибиотика, что приводит к его инактивации.

К другому механизму устойчивости относятся дефекты в поринах, которые приводят к снижению проницаемости наружной мембраны и затруднению проникновения АБП в бактериальную клетку. У грамотрицательных бактерий бета-лактамы проникают в клетку через наружную мембрану по гидрофильным белкам-каналам (поринам). Порины – класс конститутивно экспрессирующихся ферментов, которые выполняют роль неспецифических или субстрат-специфических диффузионных каналов. Мутации в поринах, изменяющие фермент или снижающие уровень его экспрессии, приводят к меньшей чувствительности бактерий к бета-лактамам.

К третьему механизму относится активный вывод антибиотика из клетки (эффлюкс). Эффлюксные насосы играют роль в адаптации и выживании клеток в стрессовых условиях за счет ограничения антибактериальной активности внутри клеток [21]. Принцип действия основан на выводе антибиотика из клетки, что создает недостаточную терапевтическую концентрацию АБП внутри клетки и приводит к устойчивости.

Модификация мишени действия АБП является основным механизмом устойчивости у грамположительных бактерий. В случае бета-лактамов мишенью их действия являются ПСБ, мутации в которых могут приводить к устойчивости к АБП [21]. Наличие таких мутаций в последовательности гена может приводить к ухудшению или отсутствию связывания АБП с ферментом-мишенью.

Глава 2. Бета-лактамазы

2.1 Классификация бета-лактамаз

По данным [4] суперсемейство БЛ объединяет более 2700 различных ферментов. Для их характеристики используют объединенную функциональную и структурную классификацию (Таблица 1). Структурная классификация базируется на гомологии аминокислотных последовательностей и строения активного центра [4] и разделяет БЛ на четыре молекулярных класса: А, В, С и D (Рис. 2) [4]. БЛ класса А, С и D относятся к сериновым гидролазам, ферменты класса В являются металло-бета-лактамазами. По функциональной классификации БЛ разделяются на функциональные группы на основании их субстратной специфичности и различиях в биохимических свойствах [22].

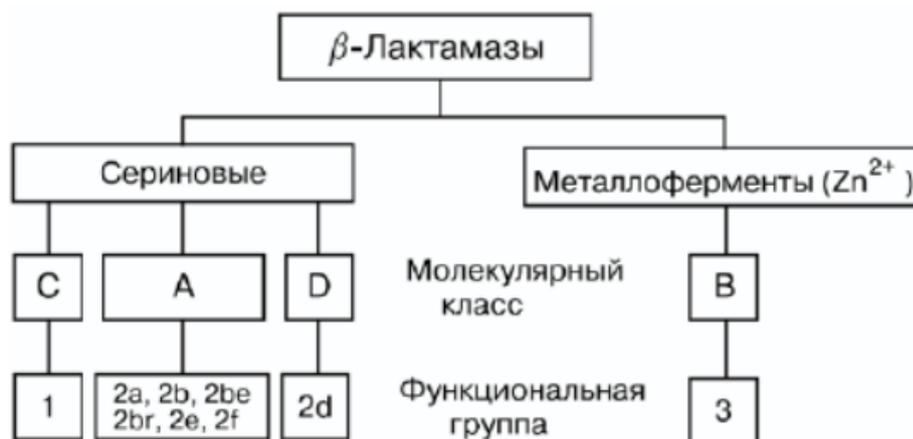


Рис. 2. Классификация БЛ по молекулярным классам и функциональным группам.

Согласно функциональной классификации, существующие БЛ разделены на три группы (Рис. 2, таблица 1). В первую группу входят БЛ класса С AmpC-типа. Отличительной особенностью данной группы является высокая активность в отношении цефалоспоринов и низкая активность в отношении пенициллиновых антибиотиков. Данные ферменты не чувствительны к действию ингибиторов БЛ. Ко второй группе относятся БЛ классов А и D. В подгруппу 2a входят БЛ грамположительных бактерий, которые гидролизуют пенициллиновые бета-лактамы. В подгруппу 2b входят БЛ TEM- и SHV-типов узкого спектра субстратной специфичности, активные в отношении пенициллинов (кроме уреидопенициллинов) и цефалоспоринов I поколения и цефоперазона. К подгруппе 2be

относятся бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), гидролизующие пенициллины и цефалоспорины I-IV поколений: мутантные формы БЛ TEM-1 и SHV-1 и все ферменты CTX-M-типа. Мутантные формы ферментов класса A, способные гидролизовать бета-лактамы с ингибиторами, отнесены в отдельную подгруппу 2br и имеют название ингибитор-резистентные БЛ. Ферменты класса D относятся к функциональной группе 2d, их основным субстратом является оксациллин. Ферменты подгруппы 2e гидролизуют цефалоспорины расширенного спектра (III-IV поколений), 2f – карбапенемы. К 3 группе относятся БЛ класса B, содержащие ионы цинка в активном центре.

Сериновые БЛ состоят из 11 α -спиралей, 5 β -листов и петель нерегулярной структуры, находящихся в компактной белковой глобуле со структурой сэндвич-типа, включающей три $\alpha/\beta/\alpha$ домена, соединенных ионными и водородными связями [23]. Активный центр сериновых БЛ состоит из приближенных в пространстве β -листа (S3) и α -спирали (H2) с консервативными аминокислотными участками (3–4 а.к.). Ключевым каталитическим остатком является серин (Ser70 у БЛ класса A, Ser64 у БЛ класса C, Ser67 у класса D). Эволюционная связь между ПСБ и БЛ состоит в общем структурном фолде, включающем каталитически важные структурные мотивы Ser-X-X-Lys, Ser-X-Asn и Lys-Thr-Gly [24]. Отличие между ПСБ и БЛ заключается в образовании стабильного ацил-ферментного комплекса ПСБ с антибиотиком и нестабильного ацил-ферментного комплекса БЛ с антибиотиком, который подвергается деацилированию с участием фермента.

Механизм гидролиза бета-лактамов сериновыми БЛ включает три этапа (Рис. 3, а) [25]. Сначала молекула антибиотика связывается с активным центром БЛ с активацией гидроксильной группы каталитического серина, которая как нуклеофил действует на карбонильную группу бета-лактамного кольца с образованием тетраэдрического ацилированного интермедиата. Затем происходит образование ацил-ферментного комплекса, в котором серин активного центра ковалентно связан с молекулой антибиотика. На третьем этапе происходит деацилирование комплекса с участием молекулы воды, координированной в активном центре фермента, с высвобождением фермента для следующего каталитического акта. Для активации серина у БЛ TEM-типа класса A необходимо депротонирование остатка Lys73 с образованием водородных связей с аминокислотными остатками Glu166 и Asn170 и молекулой воды (Рис.3, б) [26]. В другом пути депротонирования остатка Lys73 участвует Ser130 [25].

Таблица.1. Объединенная структурная и функциональная классификация бета-лактамаз

| Функциональная группа | Молекулярный класс | Основной субстрат | Действие ингибиторов | | Характеристика | Представители |
|-----------------------|--------------------|---|----------------------------------|------|---|---------------------------------------|
| | | | Клавулановая кислота, тазобактам | ЭДТА | | |
| 1 | C | Цефалоспорины | Нет | Нет | Гидролиз цефалоспоринов I-III поколений | AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e | C | Цефалоспорины | Нет | Нет | Гидролиз цефалоспоринов I-III поколений, преимущественно цефтазидима и оксимино-лактамов | GC1, CMY-37 |
| 2a | A | Пенициллины | Да | Нет | Гидролиз бензилпенициллина | PC1 |
| 2b | A | Пенициллины, цефалоспорины I поколения | Да | Нет | Гидролиз пенициллинов и цефалоспоринов I поколения и цефоперазон | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | A | Цефалоспорины III-IV поколения, монобактамы | Да | Нет | Гидролиз оксимино-бета-лактамов (цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефепим) и азтреонама | TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1 |
| 2br | A | Пенициллины | Нет | Нет | Устойчивость к клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму | TEM-30, SHV-10 |
| 2ber | A | Цефалоспорины III-IV поколения, монобактамы | Нет | Нет | Гидролиз оксимино-бета-лактамов в сочетании с устойчивостью к клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму | TEM-50 |
| 2c | A | Карбенициллин | Да | Нет | Гидролиз карбенициллина | PSE-1, CARB-3 |

| | | | | | | |
|-----|---|--------------------------------|-------------|-----|---|---------------------------|
| 2ce | A | Карбенициллин, цефепим | Да | Нет | Гидролиз карбенициллина, цефепима и цефпирома | RTG-4 |
| 2d | D | Клоксациллин | Варьируется | Нет | Гидролиз клоксациллина или оксациллина | OXA-1, OXA-10 |
| 2de | D | Цефалоспорины III-IV поколения | Варьируется | Нет | Гидролиз клоксациллина, оксациллина и оксиимино-лактама | OXA-11, OXA-15 |
| 2df | D | Карбапенемы | Варьируется | Нет | Гидролизует клоксациллин, оксациллин и карбапенемы | OXA-23, OXA-48 |
| 2e | A | Цефалоспорины III-IV поколения | Да | Нет | Гидролизует цефалоспорины. Ингибируется клавулановой кислотой, но не азтреонамом. | SepA |
| 2f | A | Карбапенемы | Варьируется | Нет | Гидролиз карбапенемов, оксимино-лактамов, цефамицинов | KPC-2, IMI-1, SME-1 |
| 3a | B | Карбапенемы | Нет | Да | Гидролиз широкого спектра действия, включая карбапенемы, но не монобактамы | IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 |
| 3b | B | Карбапенемы | Нет | Да | Гидролиз карбапенемов | CphA, Sfh-1 |

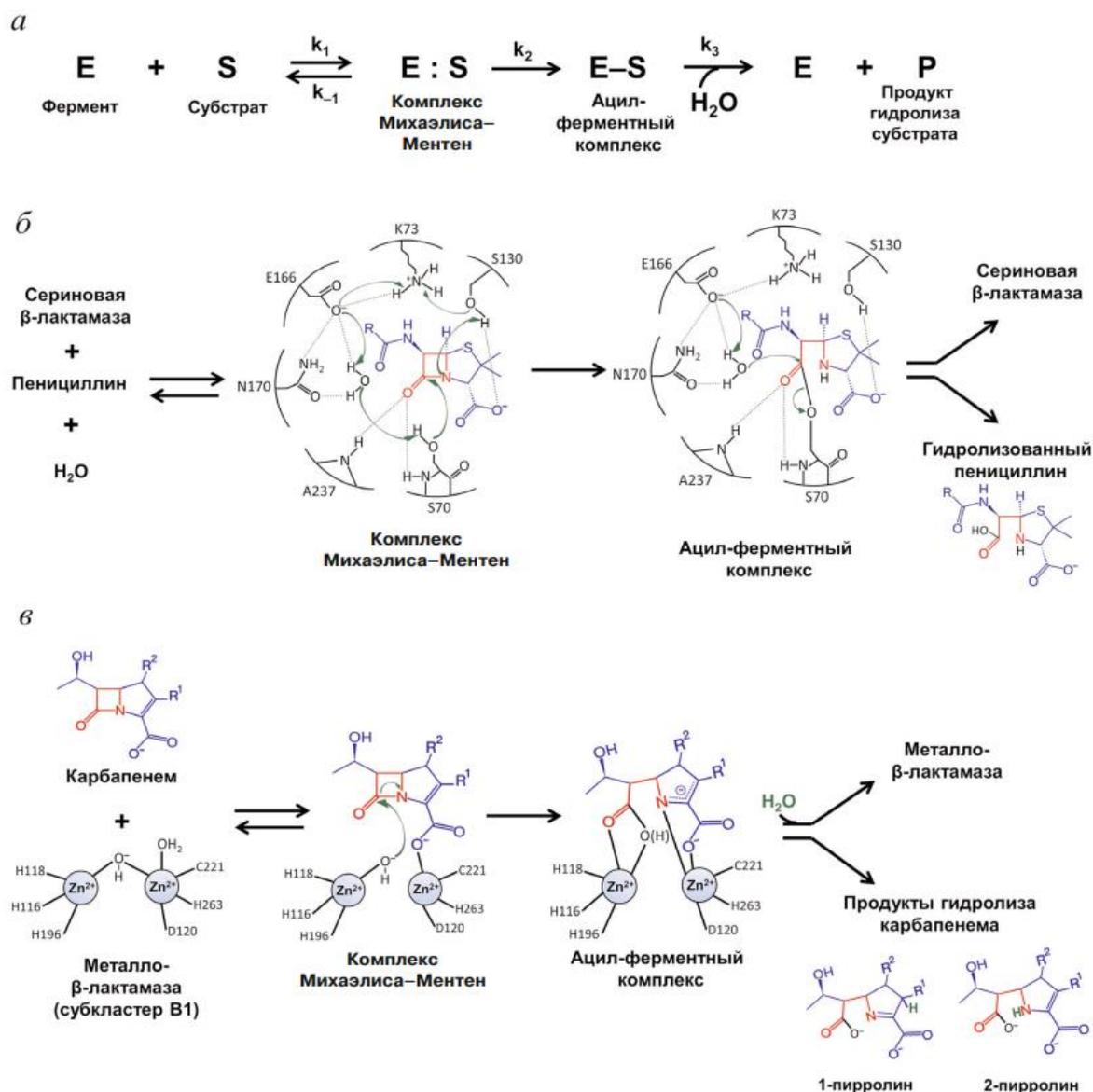


Рис. 3. а – Общая схема гидролиза бета-лактамных антибиотиков ферментами БЛ, б – механизм гидролиза пенициллина БЛ класса А, в – механизм гидролиза карбапенемов МБЛ [27].

Каталитическим серином для БЛ класса С является Ser64, Tyr150 выступает в роли общего основания, важную роль в правильной фиксации молекулы субстрата играет остаток Asn152 (аналог Asn132 у БЛ класса А). У БЛ класса D каталитическим является Ser67. Роль общего основания у этих ферментов выполняет остаток Lys70, занимающий оптимальное положение в структуре фермента для активации молекулы воды, аналогичное Lys73 у ферментов класса А.

Ферменты молекулярного класса В содержат один или два иона Zn²⁺ в качестве кофактора и могут гидролизовать три группы бета-лактамов (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы) (Рис. 3, в) [25, 26]. Активный центр МБЛ располагается на дне широкой неглубокой впадины между двумя β листами. У ферментов субкластера В1

ион Zn^{2+} в первом Zn связывающем центре имеет тетраэдрическое окружение с участием остатков His116, His118, His196, во втором – является пентакоординированным с участием остатков His263, Cys221 и Asp120 (рис.3, в) [26, 28]. В координации ионов Zn^{2+} принимают участие две молекулы воды, одна из которых соединяет два иона металла, другая связана со вторым ионом Zn^{2+} . Ионы металла субкластера В3 сохраняют координацию с теми же остатками в первом центре связывания, во втором – цистеин заменен на гистидин. При связывании антибиотика бицинковыми МБЛ происходит координация второго иона Zn^{2+} с карбоксильной группой субстрата, высвобождая ион гидроксида (Рис. 3, в) [26]. Ион металла оттягивает электронную плотность с карбонильного атома кислорода, повышая и стабилизируя положительный заряд на нем. Координированный с ионом Zn^{2+} ион гидроксида является лучшим нуклеофилом, чем молекула воды, он атакует карбонильный атом углерода молекулы антибиотика. Образуется промежуточный продукт с отрицательным зарядом, локализованным в пирролидиновом кольце. Далее происходит протонирование с участием молекулы воды, либо атома С2 с образованием 1 пирролина, либо атома N4 с образованием 2 пирролина. Моноцинковые МБЛ субкластера В2 являются исключительно карбапенемазами: они эффективно гидролизуют только карбапенемы и проявляют низкую активность в отношении пенициллинов и цефаллоспоринов. Это может быть связано с тем, что у данных ферментов остаток His116, консервативный у МБЛ субкластеров В1 и В3, заменен на аспарагин.

2.2 Распространенность грамотрицательных бактерий, устойчивых к бета-лактамам

Эпидемиология устойчивых к АБП бактерий важна в связи с глобальным распространением мульти- и пан-резистентных бактерий. Среди возбудителей бактериальных инфекционных заболеваний ВОЗ выделяет группу микроорганизмов, представляющих наибольшую клиническую опасность [9]. Из них особое беспокойство вызывают *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*. Эти патогены ответственны за большинство внутри- и внебольничных инфекций и часто характеризуются МЛУ. В некоторых регионах мира, называемых «горячими зонами резистентности», доля устойчивых к АБП бактерий превышает 50 % и продолжает увеличиваться [29]. Для борьбы с распространением антибиотикорезистентности создаются международные программы по контролю резистентных бактерий. В 2015 г. ВОЗ была создана «Глобальная система эпидемиологического надзора за устойчивостью к противомикробным препаратам» (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System GLASS) с целью контроля эпидемиологической ситуации и прогнозирования потенциально опасных регионов для предотвращения

вспышек инфекционных заболеваний [30]. В Европе и Центральной Азии организована сеть CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance), направленная на стандартизацию профилактических мер для борьбы с резистентными патогенами и наблюдением эпидемиологической ситуации в различных регионах [29]. Россия включена в обе международные эпидемиологические программы. В России также разработаны и реализуются собственные государственные программы по борьбе с антибиотикорезистентностью «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности» и программа «СКАТ» (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) для медицинских учреждений, направленные на стандартизацию процессов лечения и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [31]. В 2017 г. в России появилась платформа для анализа и сбора региональных данных по антибиотикорезистентности в различных регионах РФ - AMR-map [32]. На данный момент в ней собрана наиболее полная информация о патогенах, распространенных в России, и данных об их чувствительности и генетическом составе детерминант резистентности.

По данным CAESAR и GLASS доля бактерий с МЛУ различается в зависимости от географического положения [29, 30]. Распространенность штаммов с МЛУ в развитых странах ниже, в то время как в развивающихся странах количество таких штаммов значительно увеличено. По данным [29, 30] в 2018 г. в большинстве Европейских стран доли резистентных штаммов составляют от 10% до 25%. Низкий уровень мультирезистентных штаммов отмечен в Японии. Доли между 25% и 50% были обнаружены в Болгарии, Кипре, Италии и Словакии. Доля резистентности, превышающая 50%, наблюдается в Армении, Беларуси, Грузии, Черногории, Северной Македонии, Российской Федерации и Турции [29]. Во многих странах Азии и Африки доля штаммов с МЛУ превышает 75%. Устойчивость к цефалоспорином третьего поколения (цефотаксим/цефтриаксон и цефтазидим), аминогликозидам (гентамицин/тобрамицин) и фторхинолонам (ципрофлоксацин/левофлоксацин/ офлоксацин) распространена среди *E. coli* и *K. pneumoniae*. У *K. pneumoniae* часто наблюдается высокий уровень устойчивости к карбапенемам (имипенем/меропенем) (больше 50 %). Резистентность у *P. aeruginosa* распределена от умеренной до высокой (25-75%), и чаще направлена в отношении карбапенемов (имипенем/меропенем), но данные многих стран по этому микроорганизму не представлены. Также наблюдается значительное распространение резистентных штаммов *Acinetobacter spp.* в медицинских учреждениях разных стран мира [29].

В РФ по данным AMR-map на момент 2022 года бактерии семейства Enterobacteriaceae являются наиболее распространенными микроорганизмами,

вызывающими нозокомиальные инфекции (Рис. 4) [4]. На их долю приходится практически половина случаев внутрибольничных бактериальных инфекций, причем среди возбудителей большую долю занимают представители *K. pneumoniae* и *E. coli*. За последние 15 лет обнаружение представителей *K. pneumoniae* в России значительно увеличилось по сравнению с другими видами грамотрицательных патогенов [15].



Рис. 4. Распространенность бактерий, вызывающих нозокомиальные инфекции в РФ за последние 10 лет по данным AMRmap [32].

Мультирезистентные бактерии, содержащие несколько детерминант резистентности
 Локализация детерминант резистентности на МГЭ приводит к распространению мультирезистентных штаммов бактерий, имеющих одновременно гены нескольких БЛ, в том числе карбапенемаз [33, 34]. Например, обнаружены штаммы с совместным присутствием генов БЛ КРС-типа с ОХА-48; КРС-2 или -3 с МБЛ VIM-2; БЛ КРС- и NDM-1 или IMP; ОХА-48 с МБЛ (NDM- или VIM) реже с IMP. Иногда встречаются мультирезистентные штаммы, содержащие одновременно 3 гена карбапенемаз, например *K. pneumoniae* с БЛ NDM, VIM и ОХА-48 [35]. Мультирезистентные штаммы также могут содержать несколько генов БЛ класса А, в первую очередь, СТХ-М-, TEM- и SHV-типов. По-видимому, присутствие генов БЛ разной специфичности необходимо бактериям для повышения эффективности своих защитных свойств и выживания в присутствии различных АБП [36].

У бактерий семейства Enterobacteriaceae наиболее часто обнаруживают гены БЛ класса А (TEM-; SHV-; CTX-M-типа), класса В (NDM- типа) и класса D (OXA-48-типа). Профиль субстратной специфичности данных БЛ приведен в таблице 2 [15]. Наиболее широкой специфичностью в отношении разных групп бета-лактамов обладают карбапенемазы и МБЛ. Они гидролизуют все группы бета-лактамов, кроме монобактамов. Эффективность гидролиза карбапенемов этими БЛ значительно выше по сравнению с гидролизом цефалоспоринов и пенициллинов. Другие БЛ имеют более узкий субстратный профиль, некоторые из них устойчивы к действию ингибиторов.

2.3 Клинически значимые бета-лактамазы различных молекулярных классов

К клинически значимым относятся БЛ класса А (TEM-, SHV-, CTX-M-; KPC-типа), класса В (NDM-, IMP-, VIM-типа), класса D (OXA-48-типа). Среди БЛ класса А наиболее распространенной является БЛРС CTX-M-15, ферменты TEM- и SHV-типов обнаруживаются достаточно регулярно, хотя прироста распространенности этих БЛ в последние годы не наблюдается [48]. В связи с распространением штаммов, содержащих гены БЛРС класса А, устойчивых к действию пенициллинов и цефалоспоринов, в клинической практике стали чаще применяться карбапенемы, что стимулировало рост эпидемиологии карбапенемаз. В настоящий момент наиболее высокий прирост численности БЛ, детектируемых в клинических штаммах, наблюдается для карбапенемаз. Среди представителей карбапенемаз класса А чаще обнаруживаются KPC-2 и KPC-3, которые встречаются у *K. pneumoniae*. OXA-48 - часто детектируемая карбапенемаза класса D. БЛ NDM-типа – наиболее распространенная МБЛ, среди них фермент NDM-1 регулярно детектируемый. МБЛ IMP-4 и IMP-13 встречаются в штаммах *P. aeruginosa*, однако, распространенность данных БЛ ниже по сравнению с NDM-1 [15]. БЛ VIM-2 редко детектируется, как и БЛ IMP-типа. В России у представителей Enterobacteriaceae обнаруживаются БЛ TEM-, SHV-, CTX-M-типов. Гены карбапенемаз встречаются значительно реже и среди них распространены OXA-48, NDM-1 и KPC-2 [49].

2.3.1 Бета-лактамазы TEM-типа

Бета-лактамазы TEM-типа детектируются у грамотрицательных бактерий и являются основной причиной резистентности к АБП группы пенициллинов и ранних цефалоспоринов [50]. На данный момент известно 243 различных варианта ферментов БЛ

Таблица 2. Характеристика субстратной специфичности клинически значимых БЛ.

| Класс БЛ | Название | Клинически значимые ферменты | Субстратный профиль | Действие ингибиторов | Км, мкМ | | | |
|----------|--------------------|------------------------------|--|---|------------------|-------------------|----------------|------------------|
| | | | | | Ампициллин | Цефтазидим | Меропенем | Азтреонам |
| А | Пенициллиназа | TEM-1 | Пенициллины, цефалоспорины I-II поколения | Клавулановая кислота, тазобактам | 38 ± 18 [37] | 4,300 [38] | - | 1430 [39] |
| А | Пенициллиназа | SHV-1 | | | 23 ± 0,4 [40] | 142 ± 3 [40] | - | - |
| А | БЛРС | СТХ-М-15 | Пенициллины, цефалоспорины I-IV поколения, монобактамы | Клавулановая кислота, тазобактам, авибактам | 15 ± 2 [41] | 1064 ± 25 [42] | - | 14 ± 0.5 [42] |
| А | Карбапенемаза | KPC-2 | Все бета-лактамы | Авибактам, релебактам, ваборбактам | 226 ± 68 [43] | 217 ± 6 [44] | 16 ± 3 [44] | 389 ± 5 [44] |
| В | МБЛ, карбапенемазы | NDM-1 | Все пенициллины, цефалоспорины I-IV поколения, карбапенемы | | 110±23 [45] | 100±19 [45] | 57±9 [45] | - |
| Д | Карбапенемазы | OXA-48 | Пенициллины, оксациллин/клоксациллин, карбапенемы | Авибактам | 400±50 [46] | 9900 ±740 [47] | 10 [46] | - |

ТЕМ-типа [50]. Ключевые аминокислотные замены группируются вокруг активного центра фермента, изменяя фенотип штамма и приводя к формированию БЛРС, но мутации могут встречаться и в других положениях. К ключевым заменам, участвующим в приобретении фенотипа БЛРС, относятся (по нумерации Амблер): Gly238 и Glu240, которые расположены на В3 β-складчатом листе; Arg164 расположенный в начале омега-петли, и Glu104, расположенный напротив Gly238 и Glu240 [37, 50]. Некоторые из более поздних вариантов БЛ ТЕМ-типа имеют изменения в субстратной специфичности по сравнению с другими БЛРС. Например, ТЕМ-184 (аминокислотные замены Gln6Lys, Glu104Lys, Ile127Val, Arg164Ser и Met182Thr) гидролизует азтреонам более эффективно, чем цефтазидим или цефотаксим. Ингибитор-резистентные варианты содержат замены в положениях Met69, Ser130, Arg244, Arg275 и Asn276.

Гены, кодирующие ТЕМ-1, ТЕМ-2 и их производные БЛРС, обычно переносятся Tn1-, Tn2- или Tn3-подобными транспозонами (Рис. 5а) [50]. Ген, кодирующий ТЕМ-3, располагается на Tn1, ТЕМ-10 - на Tn2, ТЕМ- 24 – на Tn1 [51]. Транспозоны Tn2 и Tn3 могут содержать как ТЕМ-20, так и ТЕМ-52 [52]. Во всех случаях эти структуры транспозонов встроены в плазмиды [53]. 67% плазмид, несущих гены БЛ ТЕМ-типа, принадлежат типу IncA/C [54].

2.3.2 Бета-лактамазы SHV-типа

БЛ SHV-типа (Sulphydryl-variable) впервые обнаружена в *K. pneumoniae* как хромосомно-кодируемый фермент [55]. Плазмидно-кодируемая SHV-1 была обнаружена в изоляте *E. coli* в 1970-х годах [56]. На сегодняшний день известно 228 вариантов последовательностей БЛ SHV-типа [50]. Первой БЛРС данного типа стала SHV-2. Данный фермент отличается от SHV-1 одной аминокислотной заменой Gly238Ser [57]. БЛ SHV-2 имеет повышенную активность при гидролизе цефотаксима, цефтазидима и цефтриаксона. Ключевые замены встречаются в положениях 35, 179, 238, 240 для фенотипа 2be и в положении 69 для фенотипа 2br [58]. Замена серина в положении 238, имеет решающее значение для эффективного гидролиза цефтазидима, тогда как замена Lys в остатке 240 имеет значение для эффективного гидролиза цефотаксима.

Существует семь типов плазмидных репликонов, которые преимущественно несут ген SHV плазмидной локализации: IncA/C, IncF, IncHI2, IncI1, IncL/M, IncN и IncX3 [59]. Различные варианты генов БЛ SHV были обнаружены в каждом из этих типов плазмид, за исключением IncX3, в котором был обнаружен только ген SHV-12 [60]. Также ген БЛ SHV-2 обнаружен в конструкции бактериофага P1 в *E. coli* [61]. Распространена инсерционная последовательность IS26, фланкирующая гены БЛ SHV типа и выполняющая

функцию мобилизации этого гена внутри плазмиды (Рис. 5б) [50]. Интактные копии IS26 были обнаружены в плаزمидах и хромосомах различных видов бактерий [62].

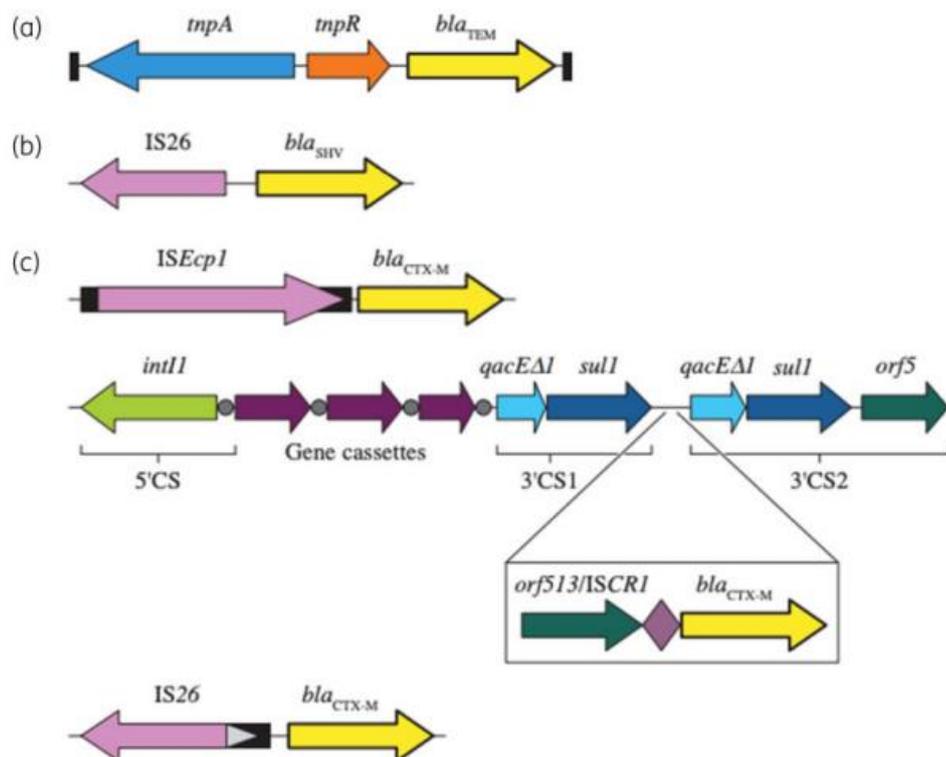


Рис. 5. Генетические структуры, содержащие гены, кодирующие БЛ класса А. Генетические структуры с генами БЛ (а) TEM-типа, (б) SHV-типа, (с) CTX-M-типа. [50].

2.3.3 Бета-лактамазы CTX-M-типа

Ферменты БЛ CTX-M-типа впервые были описаны в конце 1980-х в Германии [63]. К настоящему времени существует более 220 различных ферментов этого типа. По гомологии аминокислотных последовательностей их разделяют на пять субкластеров: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 и CTX-M-25 [64], внутри которых ферменты высокогомологичны. Основными субстратами этих ферментов являются оксиминоцефалоспорины (III поколение), поэтому все они относятся к фенотипу БЛРС. Ранние варианты CTX-M эффективно гидролизуют цефотаксим и цефтриаксон, некоторые мутантные формы характеризуются повышенной гидролитической активностью в отношении цефтазидима. К ним относятся CTX-M-15 (субкластер CTX-M-1) и CTX-M-27 (субкластер CTX-M-9) [65], у которых мутирует остаток 240 [66]. Другим ключевым остатком, мутации которого меняют субстратную специфичность ферментов данного типа, является остаток 167.

Гены БЛ CTX-M-типа имеют плазмидную локализацию и часто встречаются на плаزمидах Inc11 типа с транспозицией *ISEcp1-blaCTX-M*. Элемент *ISEcp1* детектируется с генами БЛ CTX-M-типа, относящихся к группам 1, 2 и 9. (Рис. 5 с) [67].

Последовательности, окружающие *ISEcp1* и ген *CTX-M*, указывают на то, что транспозиция отвечает за мобилизацию гена *CTX-M* и способствует их распространению [67]. Также гены *CTX-M* могут быть обнаружены на 3'-конце интегронов класса 1 между двумя элементами *qacED1/sul1* (Рис. 5 с) [68]. Структура *ISCR1* мобилизует гены БЛ. Структуры, содержащие ген *CTX-M*, включая комбинации с участием *IS26*, можно наблюдать в нескольких сочетаниях, скорее всего связанных с множественными рекомбинационными обменов [69]. Элементы, содержащие гены БЛ *CTX-M*-типа, обычно переносятся конъюгативными плазмидами. БЛ субкластера *CTX-M-15* также встречается на плазмидах *IncF* типа. А гены БЛ субкластера *CTX-M-1* могут детектироваться на плазмидах *IncN* и *IncI1*, гены БЛ *CTX-M-3* - на плазмидах *IncL/M* и *IncI1* типа, гены БЛ *CTX-M-9* располагается на плазмидах *IncHI2* [70].

С начала 2000-х ферменты БЛ *CTX-M* типа стали наиболее распространенным типом БЛРС во всем мире, включающим в первую очередь ферменты субкластеров *CTX-M-1* и *CTX-M-9*. В субкластере *CTX-M-1* наиболее распространенной является *CTX-M-15*, за которой следуют *CTX-M-3* и *CTX-M-1*, а в субкластере *CTX-M-9* наиболее распространены *CTX-M-9* и *CTX-M-14* [50]. В настоящее время наиболее широко распространенными в мире БЛ *CTX-M*-типа являются *CTX-M-15* и *CTX-M-14* [71].

2.3.4. Бета-лактамазы КРС-типа

Карбапенемаза из *Klebsiella pneumoniae* КРС-2 была первым обнаруженным представителем данного типа [72]. Всего к настоящему времени идентифицировано 9 вариантов БЛ данного типа. Профиль субстратной специфичности БЛ КРС-типа включает все классы бета-лактамов (пенициллины, цефалоспорины I-IV поколений, карбапенемы, монобактамы).

Карбапенемазы КРС, как правило, локализованы на плазмидах [73]. Также ген БЛ КРС-типа интегрирован в профаг в штамме *K. pneumoniae* ST258, который легко передается другим штаммам путем трансдукции. Гены БЛ КРС-типа встречаются на плазмидах типа *IncF*, *IncFIA*, *IncX* и *IncN* [74]. *IncX3* является преобладающей подгруппой плазмид, содержащей ген БЛ КРС [75, 76]. *IncX6* ассоциирует гены БЛ КРС-2 и БЛ КРС-3 в Китае [77]. КРС-экспрессирующие *Enterobacter spp.*, локализованные на плазмидах подгруппы *IncX7*, обнаружены в США [78].

2.3.5 Бета-лактамазы NDM-типа

БЛ NDM-1 была впервые обнаружена в 2008 г. в штамме *K. pneumoniae* в Нью-Дели (Индия) [79]. К настоящему времени описано 24 варианта ферментов NDM-типа [80], которые способны гидролизовать большинство бета-лактамов, включая карбапенемы, но не

монобактамы [81]. На данный фермент не действуют ингибиторы БЛ, такие как авибактам, клавуланат, сульбактам и тазобактам. Аминокислотные замены встречаются в 17 положениях, мутантные формы фермента обычно содержат от 1 до 5 аминокислотных замен по сравнению с NDM-1. Замена Met154Leu является наиболее распространенной и наблюдается у 10 вариантов ферментов данного типа.

БЛ NDM-типа имеют плазмидную локализацию и встречаются на плаزمидах IncF, Inc FIB, IncFII и IncX в *E. coli* и *K. pneumoniae* [82, 83]. Более крупные плазмиды, такие как pPMK1-NDM (304,5 т.п.о.) и pNDM-EcoGN568 (166,7 т.п.о.) обычно содержат и другие детерминанты резистентности, включая гены БЛ других классов [84]. Другие плазмиды IncF, включая pEh1A, pNDM-Ec1GN574, pKOH NDM-1 и pCRCB-101_1, ответственны за распространение БЛ NDM-1 среди других видов бактерий, таких как *C. freundii*, *Enterobacter hormaechei* и *Klebsiella michiganensis* [84-86]. Согласно недавним исследованиям, IncX3 является преобладающей подгруппой плазмид, содержащей ген KPC вместе с геном NDM [75, 76]. Гены БЛ NDM-1 и NDM-5 чаще всего ассоциированы с IncX3. Плазмиды IncX3 включают pEc2A (74,8 кб), pM213_X3 (43,5 кб), pNDM-NJ-IncX3 (39,5 т.п.о.) и pKW53T-NDM (46,1 т.п.о.) [87].

2.3.6 Бета-лактамазы ОХА-типа

БЛ класса D также называют оксациллиназами из-за их способности гидролизовать оксациллин более эффективно, чем бензилпенициллин [88]. Некоторые БЛ ОХА-типа инактивируют цефалоспорины и карбапенемы [89]. В настоящее время описано более 750 представителей БЛ ОХА-типа [90]. Карбапенемазы ОХА-типа разделены на 5 субкластеров согласно идентичности аминокислотных последовательностей: ОХА-23; ОХА-40; ОХА-48; ОХА-51; ОХА-58. Среди них подгруппа ОХА-48 является наиболее распространенной.

ОХА-48-подобный фермент впервые был зарегистрирован в 2004 г. в клиническом изоляте *K. pneumoniae* в Стамбуле, Турция [91]. Субкластер включает следующие ферменты: ОХА-48, ОХА-162, ОХА-181, ОХА-204, ОХА-232, ОХА-244, ОХА-245, ОХА-247, ОХА-436, ОХА-484 и ОХА-519 [90]. ОХА-48-подобные ферменты имеют идентичность 87% внутри субкластера и низкую гомологию с субкластерами ОХА-10, ОХА-23 и ОХА-1, которая составляет менее 50%, 46%, 36% и 21%, соответственно. Гены БЛ ОХА-48-типа чаще всего локализованы на плазмидах типа IncX, IncL/M, реже встречаются на IncF и IncY [92].

Глава 3. Действие бета-лактамовых препаратов и механизмы индукции генов антибиотикорезистентности бактерий

Скорость роста бактериальных клеток регулируется скоростью синтеза клеточной стенки. Бета-лактамы, действуя на различные ПСБ, вызывают нарушения в биосинтезе клеточной стенки, что приводит к лизису и блокированию способности деления и гибели клеточной популяции [93]. Предполагается, что потеря жизнеспособности бактериальных клеток также связана со скоростью синтеза компонентов клеточной стенки. В медленно растущих культурах количество АБП, связанного с ПСБ Ia/b, уменьшается пропорционально скорости роста. Это снижение связывания изменяет функции ПСБ Ia и Ib и приводит к быстрому лизису и гибели бактериальных клеток [94]. Для характеристики процессов действия АБП на бактерии используют стандартные микробиологические методы, основанные на анализе роста бактериальной популяции в культуре в присутствии различных концентраций АБП. Результатом является определение значений минимальных подавляющих концентраций (МПК) - концентраций АБП, при которой рост бактериальных клеток полностью подавлен. Для классификации бактериальных штаммов как чувствительных или резистентных к АБП используют пограничные значения МПК, определенные Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам [95].

Влияние субингибирующих концентраций АБП (ниже значений МПК) на бактериальные клетки еще недостаточно изучено, однако известно, что они могут индуцировать развитие адаптивной приобретенной антибиотикорезистентности. Известно, что селективное давление антибиотиков в субингибирующих концентрациях может приводить к повышению значений МПК у бактериальной популяции, антибиотики могут играть роль сигнальных молекул для индукции некоторых процессов: изменения уровней экспрессии генов, вирулентности и формирования биопленки, вызывая общие или специфические системы ответа на действие стрессовых условий [96-98]. Этот эффект может быть связан с мутагенезом, вызванным действием АБП, или с индукцией изменений в генетических элементах, на которых локализованы гены резистентности [99].

У бактерий под действием АБП может происходить формирование гетерорезистентного фенотипа, при котором внутри одной популяции сосуществуют бактерии с разным уровнем чувствительности к одному препарату. При использовании АБП в концентрациях ниже МПК происходит селекция внутри популяции клеток: часть чувствительных к антибиотику бактерий погибает, в то время как остальные адаптируются к стрессовым условиям с приобретением разных генетических мутаций [97, 98]. Часть мутаций вызваны хромосомными или плазмидными дупликациями и приводят к

изменениям в фенотипе бактериальной популяции [100, 101]. Также возможно сочетание нескольких механизмов резистентности внутри одной субпопуляции. Гетерорезистентность чаще всего проявляется к препаратам, которые применяются в клинической практике от 10 до 20 лет, в то время как к препаратам, применяющимся в течение более длительного времени, бактерии проявляют резистентность. По данным [102] 50% изолятов клинических штаммов имеют гетерорезистентность к меропенему, дорипенему и цефепиму и устойчивы к препаратам более длительного применения (пенициллины, ранние цефалоспорины). Предполагают, что гетерорезистентность является промежуточным адаптивным процессом перехода популяции штамма от чувствительного к резистентному.

Экспрессия генов резистентности в штаммах, проявляющих антибиотико-гетерорезистентный фенотип, является одним из потенциальных факторов, приводящих к неэффективности терапии [1, 103]. Авторы [104] установили, что почти 30% штаммов, которые были фенотипически определены как чувствительные, оказались резистентными или гетерорезистентными, что свидетельствует о необходимости использования современных молекулярно-генетических методов в дополнение к микробиологическим для изучения и характеристики таких популяций.

3.1 Сигнальные пути для проявления антибиотикорезистентности в бактериальной клетке

Двухкомпонентные регуляторные системы (ДКРС) являются основным механизмом, с помощью которого бактерии реагируют на изменения в окружающей их среде. ДКРС обычно состоят из двух белков, скоординированное действие которых обеспечивает регуляцию индукции генов, определяющих защитные механизмы клетки [105]. Регулирующее действие, реализуемое с участием ДКРС, часто включает активацию различных механизмов защиты от антибиотиков: синтез ферментов, разрушающих и модифицирующих антибиотики, модификацию клеточной поверхности, снижение проницаемости и усиление вывода антибиотиков из клетки и развитие альтернативных форм антибиотикорезистентности, включая образование биопленок.

ДКРС состоят из двух белков: сенсорной гистидинкиназы (ГК) и регулятора ответа (РО) (Рис. 6). ГК, как правило, представляет собой гомодимерный трансмембранный белок, который имеет гистидин-содержащий фосфотрансферный домен и АТФ-связывающий домен. РО является мультидоменным белком, содержащим домен-получатель и эффекторный домен, часто обладающий ДНК-связывающей активностью. РО локализуется в цитоплазме. При стимуляции сигналом окружающей среды ГК аутофосфорилируется, перенося фосфатную группу с АТФ на консервативный остаток гистидина. Затем

фосфатная группа переносится с ГК на консервативный аминокислотный остаток PO, как правило, аспартат. В фосфорилированном PO происходят конформационные изменения, активирующие его эффекторный домен. Этот домен, в свою очередь, действует в качестве фактора транскрипции, влияя на экспрессию генов посредством связывания со специфическими участками хромосомной ДНК или других косвенных механизмов (Рис. 6).

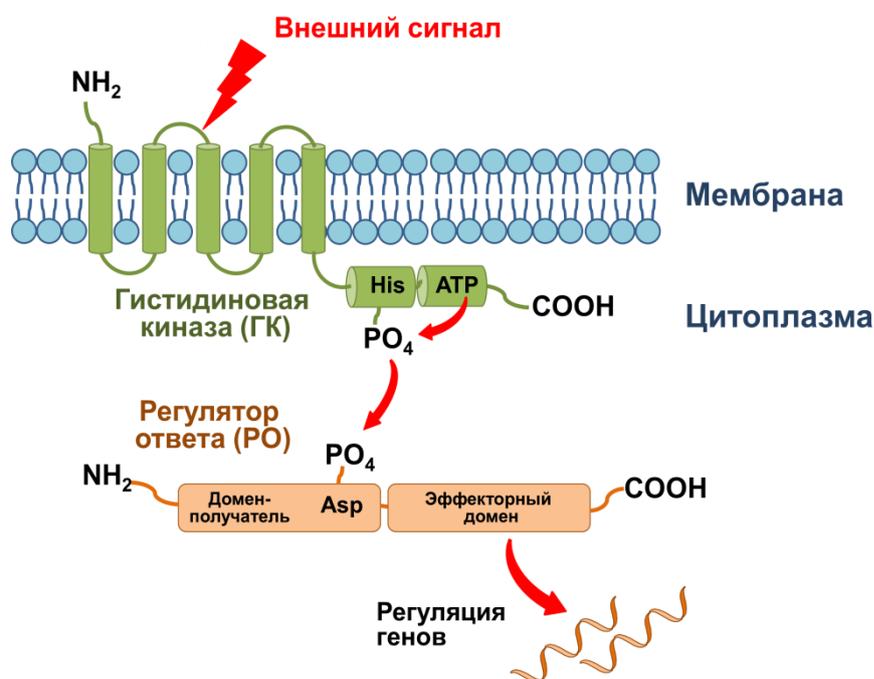


Рис. 6. Схема двухкомпонентной регуляторной системы.

В процессе адаптивного роста бактериальных клеток участвуют несколько внутриклеточных регуляторов: PhoP; PhoB; CitB; OmpR; NarL; CpxR; UhpA; RstA; EvgA; KdpE; TorR; UvrY; QseB; ArcA. Регуляторы PhoP, PhoB и OmpR являются наиболее важными для бактериального клеточного цикла репликации и деления бактериальных клеток [106]. Регуляторы адаптивного роста обнаружены у различных видов бактерий, например, H-NS у *E. coli* [107], PhoPQ у Enterobacteriaceae [108], CbrAB у *Pseudomonas aeruginosa* [109] и EnvZ-OmpR у других грамотрицательных бактерий [110].

ДКРС для регуляции ввода и вывода АБП

Ряд ДКРС вызывают клеточные реакции в ответ на изменения окружающей среды, включающие недостаточное питание, колебания температуры, целостность мембраны и окислительный стресс. Одним из наиболее известных ДКРС у грамотрицательных бактерий является EnvZ/OmpR, который встречается у *E. coli*, *A. baumannii*, *Yersinia* и *S. enterica* [111, 112]. EnvZ — это ГК, которая в первую очередь воспринимает изменения молярности среды и передает сигнал PO OmpR, чтобы регулировать уровни экспрессии поринов внешней мембраны OmpC и OmpF в соответствии с уровнями определенных химических веществ. У *E. coli* ДКРС EnvZ/OmpR контролирует дифференциальную экспрессию поринов внешней

мембраны OmpF и OmpC, через которые осуществляется пассивная и неспецифическая диффузия низкомолекулярных гидрофильных веществ, в том числе антибиотиков [113].

У *P. aeruginosa* ДКРС CzcRS и CopRS реагируют на присутствие металлов в окружающей среде. CzcS обнаруживает цинк, кобальт, кадмий и медь, а CopS — медь. Оба PO, CzcR и CopR, подавляют экспрессию порина OmpD. В результате антибиотики группы карбапенемов, используемые для лечения инфекций с МЛУ, не могут проникать в клетку и, соответственно, получить доступ к целевым ПСБ [114, 115]. Другая сенсорная киназа *P. aeruginosa* SagS, активирует PO BlrR через циклический ди-GMP [116]. *K. pneumoniae* кодирует две ДКРС: CpxAR и PhoBR, которые подавляют экспрессию порина KpnO, уменьшая чувствительность к некоторым антибиотикам [117, 118]. Гомолог CpxAR в *E. coli* действует идентично, понижая экспрессию поринов OmpF и OmpC [119, 120] и одновременно активируя оперон mag, который увеличивает экспрессию эффлюкса AcrAB-TolC [121]. *A. baumannii* имеет по крайней мере две ДКРС, которые активируют эффлюксные насосы. Первая, AdeRS, активирует AdeABC, а вторая, BaeSR, активирует AdeABC вместе с двумя системами эффлюкса AdeIJK и MacAB-TolC [122, 123]. В *E. coli* BaeSR действует сходным образом, активируя кластер генов mdtABCD [124, 125].

ДКРС для регуляции ферментов, модифицирующих антибиотики

Ряд ДКРС регулируют экспрессию генов БЛ и, следовательно, они важны для формирования устойчивости к бета-лактамам. Примером такой системы является BlrAB, которая играет важную роль в регуляции экспрессии генов трех БЛ у *Aeromonas spp*: карбапенемазы класса В (CphA), цефалоспорины класса С (Cep) и пенициллиназы класса D (Amp) [126], CreBC у *E. coli* и *P. aeruginosa* является регулятором экспрессии генов БЛ и других генов [127, 128]. Было показано, что степень гомологии между CreBC и BlrAB является достаточно высокой и составляет около 70%. CreB (BlrA) действует как PO, подключенный к сенсорной киназе CreC (BlrB). Большинство сенсорных киназ грамотрицательных бактерий реагируют на изменение концентрации антибиотика в периплазме или цитоплазме либо непосредственно, либо через некоторый дополнительный белковый компонент [129]. Показано, что BlrAB, как и CreBC специфически реагируют на ингибирование низкомолекулярных ПСБ (например, ПСБ4) некоторыми бета-лактамами [130]. В ряде исследований было показано, что регуляторы ответа систем BlrAB и CreBC запускают экспрессию БЛ путем распознавания определенных сигнальных последовательностей, расположенных в промоторе гена БЛ, при этом чем больше этих последовательностей, тем выше уровень экспрессии гена [131].

Li с соавторами установили механизм регуляции экспрессии хромосомной карбенициллин-гидролизующей БЛ класса А (CARB) у *Vibrio parahaemolyticus* [132]. Было

показано, что ген, кодирующий данную БЛ, является частью регулона новой ДКРС (VbrK/VbrR). Сенсорная гистидинкиназа VbrK связывается непосредственно с бета-лактамым антибиотиком и передает сигнал на регулятор ответа VbrR, который контролирует экспрессию гена БЛ CARB. Данный механизм был подтвержден следующими данными: делеция VbrK или VbrR значительно понижает экспрессию БЛ и устраняет устойчивость к бета-лактамам; активация VbrK специфически запускается бета-лактамыми антибиотиками; единичные аминокислотные замены в сенсорном домене VbrK изменяют его специфичность к бета-лактамам. При связывании бета-лактама с сенсорным доменом VbrK происходят конформационные изменения, которые приводят к более тесной ассоциации с доменом АТФазы и последующему фосфорилированию остатка гистидина. Таким образом, бактерии могут быстро реагировать на присутствие бета-лактамов в окружающей среде еще до того, как клеточная стенка бактерии будет повреждена. Такое прямое распознавание бета-лактамов гистидинкиназой может представлять собой эволюционный механизм защиты от бета-лактаменных антибиотиков.

ДКРС для альтернативных форм резистентности

Несколько видов *Streptococcus*, включая *S. pyogenes*, *S. mutans* и *S. pneumoniae*, используют ДКРС VicKR для активации механизма формирования биопленки в ответ на внешние сигналы окружающей среды [133, 134]. У *S. mutans* в формировании биопленок участвуют две другие ДКРС: ComDE и hk11/tr11 [135, 136]. У *P. aeruginosa* в формировании биопленок также участвуют несколько ДКРС [137]: SagS отвечает за переход от функционирования клетки в планктонной культуре к иммобилизованному состоянию на поверхности, активируя вторую ДКРС, VfiSR, которая необходима для образования биопленки. SagS одновременно активирует PO BrlR для усиления эффлюксных насосов внутри биопленки, значительно повышая устойчивость клеток к лекарственным препаратам [138, 139]. CreBC активируется при реакции ингибирования ПСБ4 бета-лактамом и отвечает образованием биопленки [140]. ДКРС GacSA у *P. aeruginosa* необходима для образования биопленки и уникальна среди других систем GacSA тем, что она не может автофосфорилироваться. Вместо этого GacS должна активироваться киназой сенсора RetS, которая действует как киназа и фосфатаза к GacS [141, 142]. Еще несколько ДКРС, включая систему Roc1, Rcs/Pvr, PrgAB и PilRS, регулирующих экспрессию чашевидных фимбрий и/или пилей IV типа, необходимых для поверхностной адгезии для образования биопленок у *P. aeruginosa* [143, 144]. ДКРС BfmRS у *A. baumannii*, усиливает продукцию биопленки [145, 146]. ДКРС Rcs необходима для образования биопленок у *E. coli*, *Proteus mirabilis* и *S. enterica Typhimurium* и других видов бактерий [147, 148].

3.2 Механизмы развития приобретенной резистентности бактерий под действием АБП

Существует несколько механизмов развития приобретенной антибиотикорезистентности бактерий [97]. Первый связан с увеличением количества копий генов резистентности плазмидной или хромосомной локализации, индуцированного действием АБП. Другим механизмом является мутагенез: точечные мутации в генах могут изменить субстратную специфичность ферментов, участвующих в реализации антибиотикорезистентности. В связи с неоднородностью бактериальной популяции под действием селективного давления АБП, штаммы дикого типа будут подавлены, в то время как штаммы, продуцирующие мутантные варианты ферментов, станут преобладающими в популяции, которая будет иметь резистентный фенотип [98]. Этот механизм меньше проявляется при использовании АБП в концентрациях, превышающих значение МПК, так как чувствительные клетки обычно погибают до того, как изменится их фенотип. Ошибки во время трансляции, возникающие из-за образования дефектных ДНК-полимераз, также могут приводить к фенотипическим изменениям и уменьшению скорости роста бактериальных клеток [98].

ДКРС через сигнальные пути активирует в бактериях систему SOS-ответа, направленную на сохранение жизнеспособности бактерий под действием внешних факторов, в том числе АБП. Система SOS-ответа бактерий включает набор совместно регулируемых генов, которые индуцируются в ответ на повреждение ДНК [149, 150]. Данная система широко распространена у бактерий и способствует клеточному выживанию путем восстановления поврежденных геномов. У *E. coli* система SOS-ответа состоит из более чем 40 генов и регулируется белком-репрессором LexA (Рис. 7). После разрыва одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК активируются RecA. В результате взаимодействия активированного RecA с белком LexA, разрушается его связь с ДНК, снижая биосинтез SOS-ответа. Гены, регулируемые LexA, включают сам *lexA*, который служит для восстановления и устранения повреждений, *uvrABC*, который участвует в удалении нуклеотидов, *hcsA*, необходимый для гомологичной рекомбинации, и гены, кодирующие несколько трансфузионных ДНК-полимераз: *dinA* (кодирует pol II), *dinB* (кодирует pol IV) и *umuDC* (кодирует pol V). Трансфузионные полимеразы поддерживают целостность хромосом, обеспечивая репликацию для исправления повреждений, но они также способствуют мутагенезу, вводя замены оснований с высокой частотой.

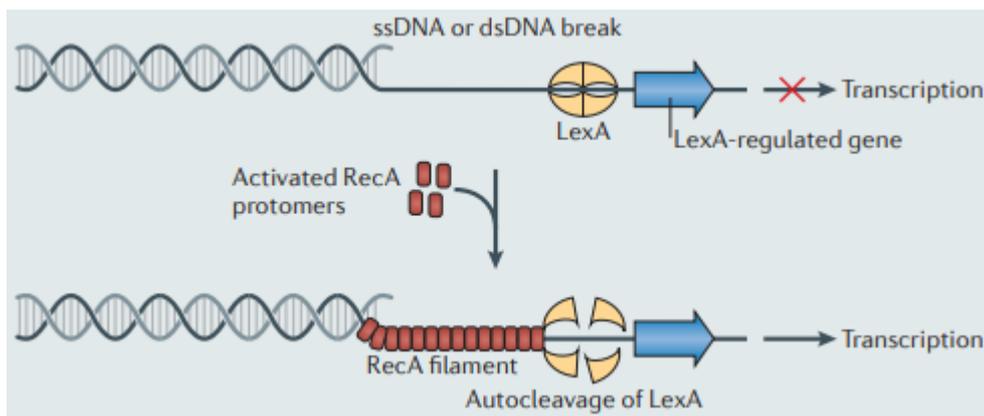


Рис. 7. Система SOS-ответа у *E. coli*, регулируемая белком-репрессором LexA.

Индукция SOS-ответа, вызванная появлением в среде антибиотиков, часто опосредует горизонтальный перенос генов (Рис. 8). Показано, что при действии фторхинолонов на *E. coli* активируется SOS-ответ, приводящий к индукции профага, кодирующего ген шига-токсина. Увеличение экспрессии гена токсина способствует его передаче чувствительным бактериям [151]. Аналогично фторхинолоны активируют SOS-ответ в *S. aureus*, который индуцирует профаги [152]. На участие системы SOS-ответа в горизонтальной передаче генов указывает распространение в популяциях клеток интегративных конъюгативных элементов (ICE) [153]. У *S. aureus* индукция SOS-ответа субингибирующими концентрациями антибиотиков также была показана увеличением скорости транспозиции IS256.

АБП также могут влиять на рекомбинацию генетических элементов. Субингибирующие концентрации АБП индуцируют внутриврохромосомную рекомбинацию между идентичными последовательностями в *E. coli* (через путь RecBCD или путь RecFOR) [154]. Рекомбинация с участием интегронов класса I также индуцируется антибиотиками. Эти генетические элементы часто встречаются у грамотрицательных бактерий и кодируют детерминанты антибиотикорезистентности - генные кассеты под контролем одного промотора [155]. Кассеты, которые находятся ближе всего к промотору, экспрессируются на более высоком уровне. Изменения в порядке кассет, осуществляемые с помощью сайт-специфической рекомбинации, позволяют бактериям изменять уровни экспрессии отдельных генетических кассет [155]. Перегруппировки генетических кассет были обнаружены у чувствительного штамма *P. aeruginosa*, во время антибиотикотерапии цефалоспорином и метронидазолом, что привело к изменению фенотипа бактериального штамма. Этот механизм объясняет этапы перехода фенотипически чувствительного штамма к резистентному [156].

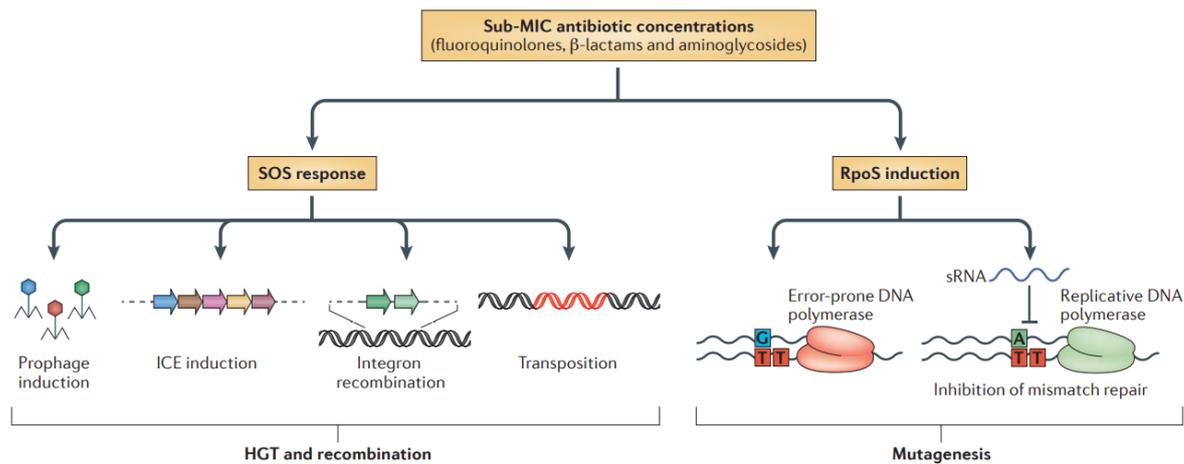


Рис. 8. Влияние субингибирующих концентраций антибиотиков на развитие резистентности посредством индукции SOS-ответа и регулона RpoS, что приводит к генетическим изменениям, связанным с перемещением подвижных элементов (индукция профагов, интегративных конъюгативных элементов ICE и транспозонов), активации рекомбиназ (интеграз и транспозаз) и увеличению скорости мутагенеза во время репликации хромосом [98]

3.4 Индукция экспрессии генов бета-лактамаз под действием АБП

Гены БЛ могут локализоваться на плаزمидах независимо как отдельные объекты или встречаться в составе сложных интегров. Основным фактором, влияющим на изменение экспрессии генов антибиотикорезистентности бактерий, является действие антибиотиков [157, 158]. Антибиотики в субингибирующих концентрациях могут изменять количество копий гена. Максимальное среднее количество приобретенных копий гена зависит от штамма и антибиотика и варьируется в диапазоне от 5 до 13 [159]. Показано, что количество копий может значительно увеличиваться при использовании концентраций, близких к МПК и $\frac{1}{2}$ МПК для АБП различных классов.

В работе [8] изучено влияние АБП группы цефалоспоринов (цефотаксима, цефтазидима и цефтриаксона в дозе 2,0 мг/мл) на изменение экспрессии гена БЛ СТХ-М-15 штамма *E. coli*. В ходе исследования отмечено увеличение экспрессии гена в 1,4 раза в присутствии цефотаксима, в 0,6 раз - цефтазидима, в 1,8 раз - цефтриаксона. В исследовании [157] показано, что уровень экспрессии гена СТХ-М-1 в штамме *E.coli*, увеличивается пропорционально увеличению концентрации цефотаксима, в присутствии которого, культивируется бактериальный штамм. Влияние ампициллина и цефтриаксона в концентрации 100 мг/л на экспрессию генов БЛ в мультирезистентных штаммах *K. pneumoniae*, содержащих несколько детерминант антибиотикорезистентности изучено

авторами работы [7]. Экспрессия хромосомно-кодируемого гена БЛ SHV-1 практически не изменялась, отмечено снижение экспрессии гена БЛ TEM-типа при культивировании в присутствии ампициллина, цефтреаксон снижал экспрессию генов TEM-типа в некоторых образцах до 1,7 раз. Для генов БЛ CTX-M в присутствии ампициллина в одном случае наблюдали увеличение экспрессии в 2,5 раза в остальном изменения были незначительными. При культивировании бактерий в присутствии цефтриаксона наблюдали увеличение экспрессии гена БЛ CTX-M в 2,7 раз у того же штамма, в котором экспрессию этого же гена индуцировал ампициллин и отсутствие значительных изменений экспрессии у других штаммов. Для гена OXA-48 авторы [7] отметили у одного штамма снижение экспрессии в 2,8 раза, в остальных штаммах изменения были незначительными. При изучении влияния меропенема в концентрациях до 4 мг/л, наблюдали увеличение экспрессии (до 4 раз) гена БЛ OXA-48 штамма *E.coli* [160]. В других работах показали, что при действии меропенема в той же концентрации, увеличивалась экспрессия гена БЛ NDM-1 штамма *E.coli* в 14-100 раз, величина изменения экспрессии гена зависела от типа плазмиды [161, 162]. Другими авторами было показано, что при культивировании штамма *P. aeruginosa* в присутствии меропенема в концентрации 1 мг/л экспрессия гена БЛ NDM не изменялась, при этом происходила активация экспрессии эффлюксных насосов MexAB – OprM [163]. Изучение действия другого бета-лактама группы карбапенемов – имепенема в концентрации 0,5 мг/л на штаммы *A. baumannii* показало, что он может вызывать индукцию экспрессии хромосомно-локализованных генов БЛ OXA-51, OXA-95, AmpC, значительное увеличение транскрипции мРНК вызвано транспозицией инсерционной вставки ISba1 [164].

Zhao с соавторами в своей работе изучали регуляцию экспрессии клинически значимых пенициллиназ, БЛРС и карбапенемаз под действием цефотаксима и пенициллина у 68 штаммов *K. pneumoniae*. Было показано, что экспрессия ферментов TEM-1, CTX-M-14, SHV-11 и OXA-1 (но не KPC-2) в значительной степени индуцируется данными АБП. После обработки клонантелом (салициланилидный антигельминтик, который является ингибитором бактериальных гистидинкиназ) уровни мРНК, соответствующие вышеперечисленным ферментам, резко уменьшались, поэтому авторы заключили, что экспрессия генов БЛ TEM, SHV, CTX-M и OXA у клинических штаммов *K. pneumoniae* может быть индуцибельной и вероятнее всего регулируется посредством ГК-зависимых ДКРС [165].

Инсерционные последовательности семейства IS представляют собой наиболее часто встречающуюся вставку перед генами БЛ, которая может выполнять регуляторную роль в экспрессии данных генов [166-168]. Эти последовательности представляют собой

небольшие мобильные генетические элементы, включающие один или два гена транспозазы, и делятся на группы в зависимости от типа ключевых аминокислот в активном центре транспозаз и механизма транспозиции. Он может быть консервативным, когда IS вырезается у донора и вставляется реципиенту, или репликативным по принципу копирования и вставки. У грамотрицательных бактерий описаны примеры инсерционных последовательностей, объединенных с прилегающей областью, включающей один или несколько генов устойчивости, а также сильный промотор, управляющий экспрессией передаваемого гена. Инсерционные последовательности могут перемещать гены устойчивости в составе единого составного транспозона - фрагмента ДНК, ограниченного двумя копиями этих последовательностей.

Примеры, описанные выше, показывают, что концентрации антибиотиков ниже МПК могут индуцировать экспрессию генов БЛ, что приводит к клинически значимым изменениям и фенотипической резистентности. Ключевой вопрос, который остается без ответа, являются ли эти эффекты результатом действия антибиотиков, функционирующих как сигнальные молекулы, которые опосредуют адаптивные реакции. Поэтому актуальной задачей является получение экспериментальных данных о количественной связи между концентрацией антибиотика и клеточным ответом. Это позволит изолированно изучать ингибирующие эффекты связывания молекулы АБП с мишенью [96].

3.5 Методы определения экспрессии генов антибиотикорезистентности

Для изучения мультирезистентных к антибиотикам бактерий активно используются микробиологические и молекулярно-генетические методы. Для фенотипической характеристики бактериальных штаммов чаще всего используют диско-диффузионный метод и метод серийных разведений [169]. Основным недостатком данных методов при применении в клинической практике является невозможность определения типа БЛ и вероятность ложноотрицательных результатов (характеристика штамма, содержащего ген БЛ, как чувствительный). Кроме того, время анализа для некоторых видов бактериальных культур является достаточно длительным, что делает их неэффективными для быстрого обнаружения БЛ [170].

Молекулярно-генетические методы обладают наибольшей чувствительностью и специфичностью для обнаружения генов устойчивости и могут быть применены как к культивируемым изолятам, так и непосредственно к клиническим образцам. Данные методы позволяют получить точную информацию о наличии генов резистентности, в том числе у мультирезистентных штаммов, которые могут содержать несколько генов резистентности одновременно. К настоящему моменту разработано большое количество коммерческих наборов для обнаружения наиболее часто встречающихся генов

резистентности, в том числе в мультиплексном режиме [171]. Однако, использование методов идентификации наличия генов резистентности для изучения механизмов антибиотикорезистентности недостаточно, поскольку специфический генотип устойчивости может частично или полностью не коррелировать с фенотипом штамма, так как наличие гена резистентности не всегда приводит к фенотипической резистентности [97]. В последние годы появились данные об обнаружении генетических детерминант резистентности у некоторых штаммов, которые по результатам микробиологических тестов являются чувствительными к АБП. Так, у чувствительных штаммов *K.pneumoniae* обнаружены гены БЛРС (SHV-27, 38, 41, 42 и CTX-M-3, 15, 24) [172], у штамма *E. coli*, чувствительного к меропенему - ген КРС-2 [173], у штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, чувствительных к карбапенемам - гены ОХА-48 [174], IMP-6 [175], VIM и NDM-1 [176]. Эти факты свидетельствуют о расхождении результатов микробиологических методов, характеризующих фенотип бактериальных штаммов, и идентификационных молекулярно-генетических методов. Это обуславливает необходимость разработки новых методов определения индукции транскрипции генов резистентности для изучения механизмов антибиотикорезистентности бактерий.

Методы определения экспрессирующихся генов в большинстве основаны на использовании в качестве образца фракции общей РНК, получения из нее библиотек кДНК (комплементарной ДНК) в реакции ОТ и последующем определении последовательности ДНК с использованием уже разработанных технологий. Для увеличения концентрации исследуемых генов используют ПЦР. Первые методики исследования РНК-транскриптов были основаны на разделении продуктов амплификации методом электрофореза с использованием дополнительных программ для анализа цифровых изображений [177-180], однако чувствительность и точность этих методов оказалась низкой.

РНК-секвенирование

Для определения полноразмерных последовательностей экспрессируемых генов и изучения новых генов используют технологии РНК-секвенирования. Они применяются для изучения структуры РНК, механизмов процессов трансляции, анализа дифференциальной экспрессии генов, включая механизмы экспрессии генов в единичных клетках [181]. Для обогащения фракции общей РНК проводят отбор поли-dATP содержащих мРНК с помощью магнитных или целлюлозных бусин, на которых иммобилизованы праймеры, содержащие олиго-dTTP-участки [182]. Библиотеки кДНК секвенируют с использованием высокопроизводительных платформ, например Illumina. Анализ результатов включает выравнивание нуклеотидных последовательностей, сборку транскриптома, нормализацию

и статистический анализ значимости изменений в уровнях экспрессии отдельных генов или выбранной группы генов [183].

РНК-секвенирование применяется для анализа экспрессии генов антибиотикорезистентности. В работе [184] изучали влияние имипенема на уровень экспрессии карбапенемаз KPC-2. В другой работе определяли уровень экспрессии гена БЛ NDM у гипервирулентного штамма *K.pneumoniae* [185].

Основным недостатком РНК-секвенирования являются возможные ошибки, возникающие в процессе реакции ОТ. Трудоемкость обработки и анализа результатов в данном методе существенно выше, чем в других. Существенной сложностью представляется выбор референсного генома для нормировки результатов. Эффективность секвенирования длинных РНК-транскриптов с поли-А концом снижается в зависимости от удаленности гена от полинуклеотидной последовательности, что приводит к заниженным результатам и не позволяет определять слабо экспрессированные гены.

В настоящее время появились технологии мономолекулярного прямого секвенирования РНК (англ. Direct RNA Sequencing, DRSTM), развиваемые компанией Helicon [186]. Этот метод предполагает секвенирование РНК с использованием массово-параллельных технологий без дополнительной модификации образца в реакциях ОТ, лигирования, амплификации и др.

ПЦР в режиме реального времени

Наиболее распространенным методом определения индукции экспрессии генов является метод ПЦР-РВ, описано его применение для определения экспрессирующихся генов БЛ различных типов (NDM-, CTX-M-, SHV-, OXA-48-типов и др.) [8, 157, 158, 162, 163, 164, 188, 189]. Метод позволяет детектировать накопление продукта амплификации по активности флуоресцентных меток. Для мониторинга флуоресценции во время реакции используют неспецифические красители, включая SYBR Green, Eva Green и др., а также специфические последовательности праймеров, которые могут содержать флуоресцентные красители. Количественную оценку проводят по определению порогового цикла (Ct) - количества циклов реакции амплификации, которое требуется для получения флуоресцентного сигнала, значимо отличающегося от фонового [190]. Метод характеризуется меньшим коэффициентом вариации по сравнению с оценкой по конечной точке, которая принята в стандартной ПЦР. Основным отличительным преимуществом ПЦР в режиме реального времени является простота выполнения, отсутствие дополнительных манипуляций с ампликоном после окончания реакции, совместимость с реакцией ОТ, однако эффективность определения мРНК при этом снижается. Для определения относительного изменения уровня экспрессии используют контрольный

образец сравнения уровень экспрессии, в котором принимают за «1», а остальные значения выражают в виде относительных изменений относительно него. Для получения относительных уровней в ПЦР-РВ был разработан метод ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), который учитывает среднюю эффективность амплификации и значения циклов отрыва исследуемого гена и референсного в изучаемом образце и контрольном образце [191].

Несмотря на распространенность данного метода, он обладает рядом сложностей в своей реализации: низкая воспроизводимость результатов при низких концентрациях ДНК-матрицы, фоновая флюоресценция образца, вследствие чего возникают трудности определения низко экспрессирующихся генов. Использование неспецифичных интеркалирующих красителей, например SYBR Green I, не позволяет специфично выявить образовавшийся продукт. Чистоту и специфичность оценивают по наличию только одного пика у кривой плавления. В методе ПЦР РВ длина фрагмента амплификации ограничена и не превышает 200-300 оснований, что связано с эффективностью амплификации и может приводить к ошибкам при амплификации фрагментов генов, которые были получены от деградированной РНК. Для количественного определения мРНК необходимо знать эффективность реакции ПЦР, однако она может существенно варьироваться в зависимости от концентрации ампликона [192]. Выбор референсного гена, экспрессия которого не меняется в условиях эксперимента также представляется сложной задачей. Согласно требованиям, предъявляемым для проведения количественного определения РНК методом ПЦР-РВ, конститутивность экспрессии референсного гена должна быть подтверждена экспериментально [193]. Однако, в литературе часто используются референсные гены без подтверждения независимости их экспрессии в условиях эксперимента, что может стать источником ошибок и некорректных выводов. Метод ПЦР РВ существенно ограничен в мультиплексности, что связано с количеством флуорофоров достоверно различимых в одной реакции [194].

Гибридизационный анализ на биочипах

Одновременное определение большого количества генов стало возможно после появления микрочипов высокой плотности, характеризующихся высокой мультиплексностью анализа [195]. В 1995 году с помощью данной технологии был получен первый геном прокариотического организма [196]. В период с 1996 по 2004 год были получены последовательности геномов *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Arabidopsis thaliana*, а также геном мыши и человека [196].

Биочипы представляют собой носитель небольшой площади, на который нанесены в определенном порядке короткие специфичные олигонуклеотидные зонды, комплементарные участкам последовательностей определяемых генов [197, 198]. Впервые

технология биочипов высокой плотности с использованием коротких олигонуклеотидных зондов была применена компанией Affymetrix. Существуют различные технологии идентификации нуклеотидных последовательностей, наиболее распространенной является аллель-специфическая гибридизация исследуемой ДНК-мишени с одним или несколькими иммобилизованными зондами. Технология биочипов высокой плотности, включающих десятки тысяч олигонуклеотидных зондов, показала свою эффективность в профилировании мРНК, мониторинга экспрессии большого количества генов и даже целых геномов [198, 199]. Технология биочипов оказалась достаточно эффективной для определения качественных изменений в уровнях экспрессии множества генов [200]. Эксперимент состоит в одновременном тестировании двух образцов, один из которых является образцом сравнения. В методе используются два флуоресцентных красителя, что позволяет определить соотношение уровней мРНК у двух образцов одновременно. Для увеличения специфичности анализа для идентификации каждого гена используют до 10 различных олигонуклеотидных зондов. Результатом высокопроизводительного сравнительного анализа на биочипах высокой плотности является определение изменения экспрессии наборов генов (увеличение или подавление экспрессии). Результат анализа при этом не является количественным. Биочипы применялись для изучения механизмов действия АБП на клетки и изменение экспрессии определенных генов [198, 201, 202].

Перспективным направлением развития технологии биочипов стала разработка биочипов низкой плотности, содержащих ограниченное количество (до нескольких десятков) специфичных олигонуклеотидных зондов. Такие биочипы разработаны для идентификации генов бета-лактамаз, в том числе в нашей лаборатории [203, 204]. Для определения генов БЛ разработаны коммерчески доступные тест-системы с использованием биочипов низкой плотности: компания Check-Points Health B.V. разработала автоматизированную платформу ДНК-микрочипов включающую несколько тест-систем: Check KPC/ESBL, Check-MDR CT101, CT102, CT103 и CT103XL. Check-MDR CT103 (Check-Points, Wageningen, Нидерланды) идентифицирует гены БЛРС TEM-, SHV- и CTX-M- типов, БЛ AmpC-типа (CMY-2, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR и CMY-1-подобный/MOX) и карбапенемаз (KPC, OXA-48, VIM, IMP и NDM) [205]. Check-MDR CT102 позволяет обнаруживать наиболее распространенные гены БЛ CTX-M типа [206]. Показана хорошая чувствительность и специфичность обнаружения генов БЛ в культивируемых штаммах [207].

Биочипы AMR Direct Flow Chip, позволяют обнаруживать гены карбапенемаз класса А, включая GES, SME, KPC, NMC/IMI, карбапенемаз класса В, включая SIM, GIM, SPM, NDM, VIM, IMP, карбапенемаз класса D, включая OXA23-типа, OXA24-типа, OXA48-типа,

ОХА51-типа, ОХА58-типа, БЛРС SHV, БЛРС СТХ-М, *S. aureus* mecA и гены vanA и vanB [208, 209]. Время анализа составляет 4 часа.

Sepsis Flow Chip – платформа для одновременного быстрого обнаружения подавляющего большинства патогенов кровотока, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии и грибы, а также генетические детерминанты антибиотикорезистентности: СТХ-М, SHV, SME, KPC, NMC/IMI, GES, IMP, GIM, VIM, SPM, SIM, NDM, ОХА-23, ОХА-24, ОХА-48, ОХА-51 и ОХА-58, mecA, vanA/B. Чувствительность и специфичность анализа для идентификации бактерий составляет 93,3% и 100% соответственно, а чувствительность и специфичность определения детерминант генетической устойчивости к антибиотикам составляет 93,6% и 100% соответственно. [210, 211].

В нашей лаборатории разработана технология биочипов низкой плотности с колориметрической ферментативной детекцией с использованием пористых мембранных носителей и стекла. Принцип определения генов основан на аллель-специфичной гибридизации со специфичными олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности биочипов. Разработаны колориметрические биочипы с разными наборами олигонуклеотидных зондов для идентификации клинически значимых генов БЛ классов А, В и D и ключевых точечных мутаций у БЛ класса А [212], БЛРС и ингибитор резистентных БЛ класса А [203], карбапенемаз классов А, В и D [213]. Технология биочипов низкой плотности является перспективной для разработки метода количественного определения мРНК в мультиплексном анализе, так как характеризуется высокой специфичностью мультиплексного анализа и производительностью.

Заключение

Распространение бактерий, характеризующихся МЛУ к разным группам бета-лактамовых АБП, представляет большую опасность в клинической практике, поскольку этот класс препаратов относится к наиболее часто применяемым для лечения различных инфекций, в том числе нозокомиальных. Устойчивость к данному классу АБП у грамотрицательных бактерий также является самой распространенной. Она обусловлена продукцией БЛ – суперсемейства ферментов, гидролизующих антибиотик и обладающих широкой субстратной специфичностью. Мультирезистентные штаммы могут одновременно содержать несколько типов плазмидно-кодируемых генов БЛ. Появление случаев идентификации генов БЛ у чувствительных к АБП штаммов свидетельствует о расхождении результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов диагностики устойчивых к антибиотикам патогенов.

Генетическая регуляция детерминант резистентности бактерий имеет сложный характер и зависит от условий окружающей среды. АБП могут индуцировать изменение фенотипа бактериального штамма посредством регуляторных механизмов, в которых задействованы в том числе гены антибиотикорезистентности. Появление популяций, проявляющих гетерорезистентный фенотип со смешанной чувствительностью внутри одной популяции, осложняет изучение механизмов резистентности на основании интерпретации результатов идентификации генов резистентности и фенотипической характеристики бактериальных штаммов. Поэтому актуальной является задача изучения влияния разных групп бета-лактамовых АБП в широком диапазоне концентраций на изменение транскрипции мРНК генов БЛ разных классов у мультирезистентных бактерий. Для этих целей необходимы мультиплексные высокоспецифичные методы количественного определения специфичных мРНК в бактериальных транскриптах. Существующие технологии определения мРНК являются полуколичественными и обладают недостаточной мультиплексностью. Необходимым требованиям может соответствовать технология мультиплексного гибридационного анализа на биочипах низкой плотности.

В нашей лаборатории ранее разработан метод идентификационного (качественного) анализа ДНК БЛ на биочипах низкой плотности с колориметрической детекцией. Данный метод отличается высокой специфичностью при определении генов разных типов и достаточно высокой мультиплексностью.

Для реализации цели работы – разработки метода мультиплексного количественного определения специфичных мРНК БЛ разных классов предложено использовать технологию

колориметрических биочипов низкой плотности, дополнив ее этапом пробоподготовки, включающей последовательные реакции ОТ и ПЦР. Для осуществления принципа количественного анализа предлагается использовать наборы синтетических стандартных образцов мРНК с разной концентрацией. Они будут проходить все этапы анализа вместе с исследуемыми образцами, и результаты будут использованы для построения калибровочных кривых. Использование синтетических стандартов позволит избежать сложностей, возникающих у существующих методов определения мРНК (ПЦР РВ и РНК-секвенирования). Отсутствие необходимости определения эффективности реакции ПЦР позволит снизить ошибки в области низких концентраций мРНК, отсутствие необходимости выбора референсного гена или генома также существенно упростит процедуру анализа и позволит сравнивать количество мРНК в штаммах различных бактерий. Размещение биочипов в лунках 96-луночного планшета позволит существенно увеличить производительность метода. Применимость разработанного метода будет изучена при исследовании транскриптов плазмидно-кодируемых генов БЛ в клетках мультирезистентных бактерий семейства Enterobacteriaceae при их культивировании в присутствии различных групп бета-лактамов АБП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты и оборудование

Реагенты

В работе использовали следующие реактивы: дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, наборы ДНК маркеров с длиной 50-1500 п.н., ДНКазу I, T4 ДНК-лигазу, рестриктазы NdeI и EcoRI («Thermo Fisher Scientific», Германия), Taq-ДНК полимеразу, набор «РНК-экстран» для выделения общей РНК из бактериальных клеток («Синтол», Россия), MMLV-ревертазу, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midiprep 2.0 («Евроген», Россия), ДНК зависимую РНК-полимеразу T7 («Биолабмикс», Россия), dUTP-16-биотин («ДНК-синтез», Россия), конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена («Имтек», Россия), субстратный раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и пероксида водорода («Иммунотех», Россия), колонки «QIAquick» для очистки ПЦР продуктов («Qiagen», Германия), питательную среду LB («Becton Dickinson», США), агарозу, бычий сывороточный альбумин, казеин, бактотриптон, дрожжевой экстракт, декстрансульфат натрия (M_n = 8000) («Sigma», США), Твин 20 («Ferak Berlin», Германия), тритон X-100 («MP Biomedicals», США), додецилсульфат натрия (SDS) («Serva», Германия), ЭДТА, ледяную уксусную кислоту, концентрированную соляную кислоту, неорганические соли калия и натрия, этанол («Мосреактив», Россия).

96- и 384-луночные планшеты (Greiner Bio-one Maxisorb, Германия).

Олигонуклеотидные праймеры; аминок-модифицированные олигонуклеотидные зонды; контрольные биотинилированные ДНК-мишени синтезированы компанией «Синтол» (Москва, Россия).

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 0,02 ед. pH. Центрифугирование проводили на центрифугах miniSpin и 5810R («Eppendorf», США). Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре UV-1602 (Shimadzu, Япония) и NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), облучение ультрафиолетом проводили на УФ-транслюминаторе (VilberLourmat, Германия).

Реакции транскрипции *in vitro*, обратной транскрипции (ОТ) и гибридизации проводили в термомиксере Thermomixer Comfort («Eppendorf», Германия).

ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler («Bio Rad», США). Для визуализации продуктов амплификации ДНК в агарозном геле использовали комплект

оборудования для горизонтального гель-электрофореза Sub Cell GT и PowerPack Basic («Bio Rad», США).

Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на спектрофотометре UV-1602 (Shimadzu, Япония).

Печать биочипов проводили на роботе XactII™ Microarray System (LabNextInc., США) с использованием игл с диаметром отверстия 300 мкм.

Биочипы в лунках 96-луночных полистироловых планшетов сканировали на сканере высокого разрешения Perfection V750 Pro (Epson, Германия) с разрешением 4800 dpi. Цветные изображения биочипов получали в формате TIFF файлов (16 bit). Перевод цветных изображений в градации серой палитры осуществляли с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS3. Количественные значения интенсивностей определяли с использованием программного обеспечения ScanArray Express (версия 3.0).

Бактериальные штаммы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α , BL21(DE3), плазмидный вектор pET-24 («Novagen», США). Лабораторные штаммы *E. coli* - продуценты БЛ TEM-1, TEM-2, TEM-12, TEM-18, TEM-129, TEM-160, CTX-M-116, NDM-1, OXA-48 содержали плазмиду pET 24d с клонированными генами соответствующих БЛ под контролем промотора бактериофага T7 со средним уровнем копийности [214].

Клинические штаммы грамотрицательных бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций (*E. coli* B-1350/18, *E. coli* B-2607/18, *K. pneumoniae* B-1088/17, *K. pneumoniae* B-1639/16, *K. pneumoniae* B-2125/17, *K. pneumoniae* B-1781/16) получены из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦПМБ, Оболенск, Россия). Они выделены из клинического материала (моча, эндотрахеальный аспират) отделения нейрореанимации г. Москвы. Видовая идентификация выполнена в ГНЦПМБ (Оболенск, Россия) на оборудовании VITEK-2 Compact (bioMerieux, Франция) и MALDI Biotyper (Bruker, Германия), результаты интерпретированы согласно EUCAST v.10.0 [95]. Генотипирование бактериальных штаммов на наличие генов БЛ проводили методом гибридизационного анализа на биочипах низкой плотности по методике [212].

Методы исследований

Буферные растворы

Для приготовления буферных растворов навеску кристаллического компонента буфера растворяли в соответствующем объеме дистиллированной воды, до получения

необходимой молярной концентрации. Для получения нужного рН добавляли по каплям, соответственно, 30% HCl, 30% KOH или 30% NaOH.

В работе использовали следующие буферные растворы:

Буфер для печати биочипов (2×) (0,31 М Na₂SO₄, 0,25 М Na₂HPO₄);

Буфер для гибридизационного анализа (20×) (3 М NaCl, 0,2 М NaH₂PO₄, 0,02 М ЭДТА, рН 7,4);

Буфер для проведения электрофореза ТАЕ (50×) (0,4 М Трис, 0,02 М уксусная кислота, 0,05М ЭДТА, рН 8,0);

Фосфатный буфер для отмывки PBS (0,01 М KH₂PO₄, 0,15 М NaCl, рН 7,0)

Культивирование бактерий

Бактерии культивировали в трех повторах на жидкой питательной среде LB при температуре 37°C, время культивирования лабораторных штаммов составляло 18-24 часов в присутствии 50 мг/л канамицина, клинических штаммов – 18 часов в отсутствии АБП и 4 часа в присутствии разных концентраций бета-лактамов АБП: ампициллина (0; 8; 100; 250 мг/л), цефтазидима (5; 20; 60; 250 мг/л), меропенема (5; 10; 30; 120 мг/л), азтреонама (5; 60; 120; 250 мг/л). Объем культуральной жидкости – 10 мл.

Выделение нуклеиновых кислот (плазмидной ДНК и общей РНК)

Плазмидную ДНК выделяли из культуры бактериальных клеток с использованием набора Plasmid Midiprep 2.0. Фракцию общей РНК выделяли из бактериальных клеток набором «РНК-экстран». Объем образца выделенной общей РНК составлял 40 мкл. Качество полученной РНК контролировали методом электрофореза в 1% агарозном геле по наличию двух полос 18S и 28S недеградированной рРНК. Примесь ДНК удаляли ДНКазой I (2 е.а./мкл) в течение 30 мин при 37°C, реакцию останавливали 4мМ ЭДТА (конечная концентрация) в течение 10 мин при 65°C. Полноту удаления ДНК контролировали методом ПЦР с использованием праймеров к фрагменту 16S бактериальной ДНК по отсутствию продукта амплификации [215].

Выделение периплазматических фракций бактериальных клеток, определение в них ферментативной активности БЛ

Для получения периплазматических фракций 10 мл бактериальной культуры осаждали центрифугированием при 3500 g при температуре +4°C в течение 10 мин и замораживали осадок биомассы при температуре -20 °C. Клетки разрушали осмотическим шоком в растворе сахарозы (20% сахароза, 10 мМ Трис/HCl, 1 мМ ЭДТА рН 8.0), затем центрифугировали при 12000 g (15 мин, +4°C) и отделяли супернатант. Определение ферментативной активности БЛ проводили по скорости гидролиза ампициллина: в кювете объемом 1 мл смешивали 50 мМ Na-фосфатный буфер рН 7.0 с 35 мкл периплазматической

фракции и раствором ампициллина в конечной концентрации 75 мкМ, затем регистрировали кинетические кривые расхода ампициллина при длине волны 235 нм ($\Delta\varepsilon_{235} = 670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [216]. Ферментативную активность определяли как отношение изменения оптической плотности за единицу времени к молярному коэффициенту поглощения согласно формуле (1).

$$A = \frac{\Delta OD \times t}{\Delta\varepsilon} \quad (1),$$

где ΔOD - изменение оптической плотности за промежуток времени t , $\Delta\varepsilon$ - молярный коэффициент поглощения.

Клонирование гена БЛ ОХА-48 в плазмидный вектор рЕТ-24

Аmplификацию полноразмерного гена БЛ ОХА-48 проводили в реакции ПЦР (общий объем 25 мкл) по следующему протоколу: начальная денатурация при 95°C (2 мин), амплификация 25 циклов: 30 с – денатурация при 95°C, 45 с – отжиг праймеров при 64°C, 1 мин 30с – элонгация при 72°C, завершающий этап элонгации при 72°C (10 мин), охлаждение смеси до +4 °С. Праймеры для клонирования генов БЛ в плазмидный вектор рЕТ-24 по сайтам NdeI/EcoRI: ОХА-48_NdeI 5` - ttatattaacatgctgtattagccttatcggtg – 3` и ОХА-48_NotI 5` - ttgctggccgcctagggaataatttttctgtttg – 3`. Очистку ПЦР продуктов проводили на колонках «QIAquick» согласно протоколу производителя. Анализ продуктов ПЦР и стадий клонирования проводили методом электрофореза в горизонтальном геле 1% агарозы.

Рестрикцию плазмидного вектора рЕТ-24 и амплифицированного гена БЛ ОХА-48 осуществляли рестриктазами NdeI/EcoRI в течение 1 ч при 37°C. Очистку продуктов рестрикции проводили с использованием набора реагентов «PCR Purification Kit».

Для лигирования плазмидного вектора и ПЦР-продукта использовали Т4 ДНК-лигазу в объеме 20 мкл с соотношением вставка:вектор, равным 3:1 (примерно 40 нг плазмидной ДНК). Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, далее в течение ночи (16 ч) при 16°C, затем ее использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α . Секвенирование ДНК проводили в компании «Синтол» (Москва, Россия). Для обработки и визуализации результатов секвенирования использовали программу ABIsequencer.

Трансформация клеток E. coli

К 200 мкл компетентных клеток *E. coli* DH5 α добавляли 10 мкл лигазной смеси. Полученную смесь инкубировали на льду 1 ч при периодическом перемешивании, затем подвергали тепловому шоку (42°C, 1 мин) и сразу помещали на лед на 2 мин, далее добавляли 1 мл LB-среды и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании в течение 1,5 ч. 150 мкл трансформационной смеси высевали на твердую LB-среду с

антибиотиком (канамицин, 50 мкг/мл) и инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи. Полученную рекомбинантную плазмиду использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) аналогично методике, описанной для клеток *E. coli* DH5 α .

Получение стандартных образцов мРНК БЛ методом транскрипции in vitro

Для получения стандартных образцов мРНК БЛ четырех типов использовали лабораторные штаммы *E. coli* – продуценты рекомбинантных БЛ TEM-1, CTX-M-116, NDM-1, OXA-48. Из клеток штаммов-продуцентов выделяли плазмидную ДНК набором Plasmid Midiprep 2.0. Затем амплифицировали фрагмент плазмиды pET24, включающий полноразмерный ген БЛ и участки промотора и терминатора T7 с использованием прямого (5'-TCCGGATATAGTTCCTCCTTTCA-3') и обратного (5'-AGATCTCGATCCCGCGAA-3') праймеров. Синтез специфичных мРНК проводили с использованием набора T7-Transcription: 1 мкл ПЦР-продукта смешивали в объеме 50 мкл с буфером для транскрипции, смесь dNTP в конечной концентрации 1 mM и T7 РНК-полимеразой (3 е.а./мкл), инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Остаточные количества ДНК удаляли с помощью ДНКазы (2 е.а./мкл, 37°C, 30 мин). Полученные препараты РНК дополнительно очищали на колонках «QIAquick» согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на NanoDrop 1000.

Получение первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции

Первую цепь кДНК получали с использованием реакции ОТ: 2 мкл образца общей РНК и праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ отжигали (70°C, 2 мин), затем охлаждали на льду и добавляли 5 \times буфер, смесь dNTP в конечной концентрации 1 mM, 2 mM дитиотриэтола и 1 мкл ревертазы MMLV вируса лейкемии летучих мышей. Смесь инкубировали (42°C, 1 ч) и останавливали реакцию прогреванием (70°C, 10 мин). В работе использовали наборы праймеров случайного состава длиной 10 оснований Random(dNTP)₁₀ в смеси с концевыми oligo(dT) праймерами, или обратные концевые ген-специфичные праймеры для соответствующих БЛ. Структуры праймеров приведены в Таблице 3.

Амплификация генов БЛ методом ПЦР с введением биотина

ПЦР проводили в общем объеме 50 мкл в 0,5 мл тонкостенных пробирках, содержащих 10 mM Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C), 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2,5 ед. Taq ДНК полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-биотин, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера (структуры праймеров приведены в Таблице 3) и 1 мкл раствора матрицы ДНК или кДНК, полученной в реакции ОТ. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), затем определенное количество циклов амплификации (20 с – денатурация

при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 55°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин). Количество циклов амплификации составляло от 23 до 30 в зависимости от целей эксперимента.

Горизонтальный 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.

Количественную оценку выхода продукта амплификации проводили с использованием цифрового изображения результатов электрофоретического разделения: определяли интенсивность флуоресценции при интеркаляции бромистого этидия в продукты амплификации с использованием программы Image J.

Таблица. 3. Последовательности специфичных праймеров для проведения реакции ПЦР

| Название праймера | Последовательность праймера 5' -3' | Размер синтезируемого ампликона, оснований |
|--|------------------------------------|--|
| Праймеры для детекции грамотрицательных бактерий | | |
| 16S_dir | AGGAGGTGATCCAACCGCA | 370 |
| 16S_rev | AACTGGAGGAAGGTGGGGAC | |
| Праймеры для БЛ TEM-типа | | |
| tem_dir | ATGAGTATTCAACATTTCCG | 851 |
| tem_rev | TTAATCAGTGAGGCACCTAT | |
| Праймеры для БЛ CTX-M-типа | | |
| ctxm_dir | ATGGTTAAAAAATCACTGCGCCAG | 869 |
| ctxm_rev | CCGTCGGTGACGATTTTAGCCG | |
| Праймеры для БЛ NDM-типа | | |
| ndm_dir | CTTCSTATCTCGACATGC | 503 |
| ndm_rev | CGTAGTGCTCAGTGTCG | |
| Праймеры для БЛ OXA-48-типа | | |
| oxa48_dir | GCGTGTATTAGCCTTATCGGC | 672 |
| oxa48_rev | CCACACATTATCATCAAGTTCAACC | |

Мультиплексная ПЦР для совместной амплификации генов БЛ

Мультиплексную ПЦР проводили в общем объеме 50 мкл в 0,5 мл тонкостенных пробирках, содержащих 10 мМ Трис-НСl (рН 8.3 при 25°C), 2,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 2,5 ед. Taq ДНК полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-

биотин, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймера для БЛ каждого типа или субкластера (структуры праймеров приведены в Таблице 3) и 1 мкл матрицы ДНК или кДНК, полученной в реакции ОТ. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), затем 27 циклов амплификации (20 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 55°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин) [217].

Активация полистироловых планшетов. Для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов полистироловые планшеты модифицировали 4-азидо-тетрафтор-бензальдегидом (раствор в метаноле 10 мг/мл): в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора, облучали в течение 20 минут с использованием УФ-трансиллюминатора при длине волны 260 нм (лампу располагали на расстоянии 10-15 см от поверхности планшета). Затем лунки отмывали 4 раза метанолом с инкубацией по 2 минуты и сушили на воздухе.

Печать биочипов

Олигонуклеотидные зонды, модифицированные на 5'-конце аминокислотной группой и спейсером из 13 dTTP, растворяли в буфере для печати (160 мМ Na₂SO₄, 130 мМ Na₂HPO₄) до конечной концентрации 20 пмоль/мкл и наносили в виде матрицы (6 × 6) в лунки планшетов с использованием робота XactII™. Последовательности контрольных олигонуклеотидных зондов приведены в Таблице 4. Каждый специфичный зонд был нанесен в 6 повторах, контрольные зонды – в 3 повторах. Средний размер зоны биочипа с зондом составлял 300 мкм, расстояние между зонами составляло 500 мкм. После нанесения зондов планшет прогревали (60°C, 20 минут), отмывали фосфатным буфером для отмывки (PBS) (2 раза по 10 мин) и блокировали в растворе 1% БСА и 1 % казеина (37°C, 1 ч).

Гибридизационный анализ биотинилированной ДНК-мишени на биочипах

Образец первой цепи кДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР с введением биотина. Затем полученные ампликоны фрагментировали ДНКазой I (0,1 е.а./30 нг ДНК) в объеме 50 мкл при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 3 мМ ЭДТА и инкубировали 10 мин при 65°C. Размер полученных фрагментов составлял от 50 до 150 п.н. Гибридизацию проводили в термомиксере: 50 мкл фрагментированной ДНК, меченой биотином, в буфере для гибридизационного анализа и 1 нМ биотинилированного контрольного олигонуклеотида инкубировали в лунках планшета (45 °С, 2 ч). Затем планшет отмывали PBS (45°C, 10 мин, 3 раза), инкубировали с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена в PBS, содержащем 1% БСА (37°C, 30 мин), отмывали раствором PBS (комнатная температура, 3 раза по 10 мин) и добавляли субстратный раствор (5 мМ ТМБ, 1 мМ H₂O₂, 0,5% декстрансульфата натрия в 0,1 М ацетатном буфере, pH 5,5).

Таблица. 4. Нуклеотидные последовательности контрольных олигонуклеотидных зондов и модельной ДНК-мишени.

| Название | Последовательность 5' -3' | Длина, нуклеотидов |
|---|----------------------------|--------------------|
| Положительный контроль гибридизации (ПКГ) | GATTGGACGAGTCAGGAGC | 19 |
| Отрицательный контроль гибридизации (ОКГ) | TCTAGACAGCCACTCATA | 18 |
| Модельная контрольная ДНК-мишень (ПКГ-Бт) | Биотин-GCTCCTGACTCGTCCAATC | 19 |

Определение нуклеиновых кислот методом прямого подсчета наночастиц золота в комплексах ДНК с использованием сканирующей электронной микроскопии

Наночастицы золота (НЧ) диаметром 25 нм синтезировали по методу Френса [218], основанному на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Конъюгат стрептавидина с НЧ (Стр-НЧ) получали методом ковалентного связывания стрептавидина, модифицированного меркаптоянтарной кислотой, с коллоидным раствором НЧ золота, как описано в [219].

Поверхность кремниевых пластин очищали кислородной плазмой в течение 30 мин методом реактивно-ионного травления (Alcatel RDE-300, 30 Па, 25 Вт) с последующей обработкой 10 мМ GPTMS в сухом толуоле в течение 12 ч при 80°C с последующей промывкой в течение 10 мин при 100°C [220]. Далее образцы модифицированного кремния хранились в особо чистом спирте. Олигонуклеотидные зонды (20 мкМ), наносили на кремниевые биочипы с помощью робота XactII. Каждый зонд был нанесен в трех повторах. После иммобилизации поверхность биочипов блокировали раствором 1% БСА и 1% казеина в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащий 0,15 М NaCl. Биотинилированные ДНК-мишени, полученные как описано выше, гибридизовали со специфичными олигонуклеотидными зондами. После отмычки биочипы инкубировали в растворе конъюгата Стр-НЧ в PBST, содержащем 1% БСА, при 37 °C в течение 30 мин, дважды промывали PBST в течение 10 мин, один раз H₂O в течение 3 мин и высушивали на воздухе. НЧ на поверхности кремния регистрировали с помощью автоэмиссионного сканирующего электронного микроскопа Supra-40 (Carl Zeiss AG, Йена, Германия) с детектором вторичных электронов InLens, встроенным в колонну микроскопа. Ускоряющее напряжение и ток луча были выбраны для достижения наилучшего разрешения и контраста для визуализации НЧ. Количество НЧ на фрагментах микрочипа рассчитано с использованием программного обеспечения Gwyddion (Чешский институт метрологии, Брно, Чехия).

Количественная обработка результатов гибридизационного анализа.

Поверхность биочипов в лунках планшета сканировали на оптическом сканере Perfection V750 Pro с разрешением 4800 dpi, цветные изображения получали в формате TIFF файлов (16 bit). Данное разрешение соответствует диапазону интенсивностей окрашивания от 0 до 65535. Анализ цветных цифровых изображений биочипов проводили пиксельным методом. Цветные изображения переводили в монохромные черно-белые с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS3 и определяли интенсивность окрашивания зон биочипа и локального фонового окрашивания вокруг нее с использованием ScanArray Express (версия 3.0).

Для оптимизации алгоритма перевода цветных изображений в черно-белые использовали две цветовые модели (RGB и CMYK) и несколько вариантов перевода в градации серой палитры: обесцвечивание, градации серого и использование одного цветового канала. В каждой из моделей значение цвета описывается математически как сумма интенсивностей трех основных цветовых каналов, значение каждого из которых умножено на соответствующий коэффициент (Таблица 5). Для получения аналитических сигналов использовали программное обеспечение ScanArray.

Интенсивность окрашивания (I) определяли как среднее арифметическое значение интенсивностей окрашивания зоны за вычетом среднего локального фонового окрашивания по формуле (2):

$$I = \frac{\sum(I_i - I_{\phi i})}{n} \quad (2),$$

где I_i – интенсивность окрашивания зоны биочипа, $I_{\phi i}$ – локальное фоновое значение, n – количество повторов зон биочипа с одним олигонуклеотидным зондом.

Относительную интенсивность окрашивания зоны рассчитывали, как отношение среднего значения интенсивности окрашивания данной зоны, к среднему значению окрашивания контрольной зоны по формуле (3):

$$I_{\text{отн}} = \frac{I}{I_{\text{контр}}} \quad (3),$$

где $I_{\text{отн}}$ – среднее значение относительной интенсивности окрашивания зоны, I – среднее значение интенсивности окрашивания зоны со специфичным зондом для данного типа БЛ, $I_{\text{контр}}$ – среднее значение интенсивности окрашивания зоны положительного контроля гибридизации (ПКГ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Таблица 5. Формулы расчета интенсивностей окрашивания с использованием двух цветовых моделей и разных методов преобразования в программном обеспечении Adobe Photoshop CS3.

| Метод перевода цифрового изображения в черно-белое (Цветовая модель/ метод) | | Формула расчета интенсивности |
|---|----------------------------------|--|
| RGB / Градации серого | | $I^* = W_R \times R + W_G \times G + W_B \times B$ |
| RGB / Цветовой канал | Красный канал (Red) | $I_R = (W_R + W_G + W_B) \times R = R$ |
| | Зеленый канал (Green) | $I_G = (W_R + W_G + W_B) \times G = G$ |
| | Синий канал (Blue) | $I_B = (W_R + W_G + W_B) \times B = B$ |
| RGB / Обесцвечивание | | $I = Y_R \times R + Y_G \times G + Y_B \times B$ |
| Перевод значений CMYK в RGB | $C_{CMY} = C \times (1 - K) + K$ | $R = (1 - C_{CMY}) \times 65535$ |
| | $M_{CMY} = M \times (1 - K) + K$ | $G = (1 - M_{CMY}) \times 65535$ |
| | $Y_{CMY} = Y \times (1 - K) + K$ | $B = (1 - Y_{CMY}) \times 65535$ |
| CMYK / Градации серого | | $I = W_R \times R + W_G \times G + W_B \times B$ |
| CMYK / Цветовой канал | Голубой канал (Cyan) | Перевод CMYK в RGB осуществляется по формуле $I = W_R \times R + W_G \times G + W_B \times B$ |
| | Пурпурный канал (Magenta) | |
| | Желтый канал (Yellow) | |

* где I - общая интенсивность;

R, G, B – координаты пикселя изображения в цветовой модели RGB [221];

W_i – постоянные коэффициенты, характеризующие интенсивность соответствующего основного цветового канала (R, G, B) при восприятии данного цветового оттенка человеческим глазом [221]. Для оттенков серого цвета $W_R = 0,299$; $W_B = 0,114$; $W_G = 1 - W_R - W_B = 0,587$;

Y_i - коэффициенты, характеризующие интенсивность цвета в максимальном диапазоне шкалы. $Y_R = R/65535$; $Y_G = G/65535$; $Y_B = B/65535$;

C, M, Y, K – координаты пикселя изображения в цветовой модели CMYK;

C_{CMY} , M_{CMY} , Y_{CMY} - координаты пикселя изображения в цветовой модели CMY.

Построение градуировочных кривых для определения концентрации специфичных мРНК БЛ

Из синтетических образцов мРНК БЛ, полученных в реакции транскрипции *in vitro*, готовили серию стандартных образцов в диапазоне концентраций 0,01 -20 нМ. Определение мРНК БЛ проводили с использованием разработанной методики, включающей последовательные стадии ОТ, ПЦР и гибридизации на биочипе, как описано выше. Стандартные образцы использовали для построения градуировочных кривых зависимости относительной интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа от концентрации стандартных образцов мРНК.

Предел обнаружения мРНК БЛ был рассчитан по формуле (4):

$$C = I_0 + 3\sigma \quad (4),$$

где I_0 - значение относительной интенсивности окрашивания зоны биочипа со специфичным зондом при гибридизации образца, не содержащего мРНК БЛ, σ – стандартное отклонение фонового сигнала.

Воспроизводимость метода оценивали по значению относительного стандартного отклонения, которое рассчитывали, как отношение стандартного отклонения к средней величине интенсивности гибридизационного сигнала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения поставленной цели диссертационной работы необходимо разработать метод количественного определения мРНК генов БЛ разных классов и применить его для анализа транскрипции генов БЛ у клинических штаммов *Enterobacteriaceae* под действием бета-лактамов. Исходя из наличия у мультирезистентных штаммов нескольких генов БЛ, метод должен позволить количественно определять в одном анализе несколько специфичных мРНК клинически значимых БЛ. Для решения этой задачи предлагается использовать технологию колориметрических ДНК-биочипов низкой плотности с ферментативной детекцией, дополнив ее методом пробоподготовки ДНК-мишени. Для повышения точности и воспроизводимости результатов анализа впервые предлагается использовать классический подход, широко используемый в методах аналитической биотехнологии – построение градуировочных кривых, полученных с использованием наборов стандартных образцов мРНК генов разных типов. В качестве объектов исследования выбраны четыре типа БЛ, относящихся к наиболее клинически значимым: СТХ-М (субкластер СТХ-М-1), ТЕМ- (молекулярный класс А), NDM- (молекулярный класс В) и ОХА (субкластер ОХА-48, молекулярный класс D).

Принцип метода количественного мультиплексного определения мРНК на биочипах представлен на Рис. 9. Он состоит в параллельном анализе стандартных синтетических образцов мРНК генов БЛ с известными концентрациями и исследуемых транскриптов бактериальных клеток. На Рис. 9 А 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. 9 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.

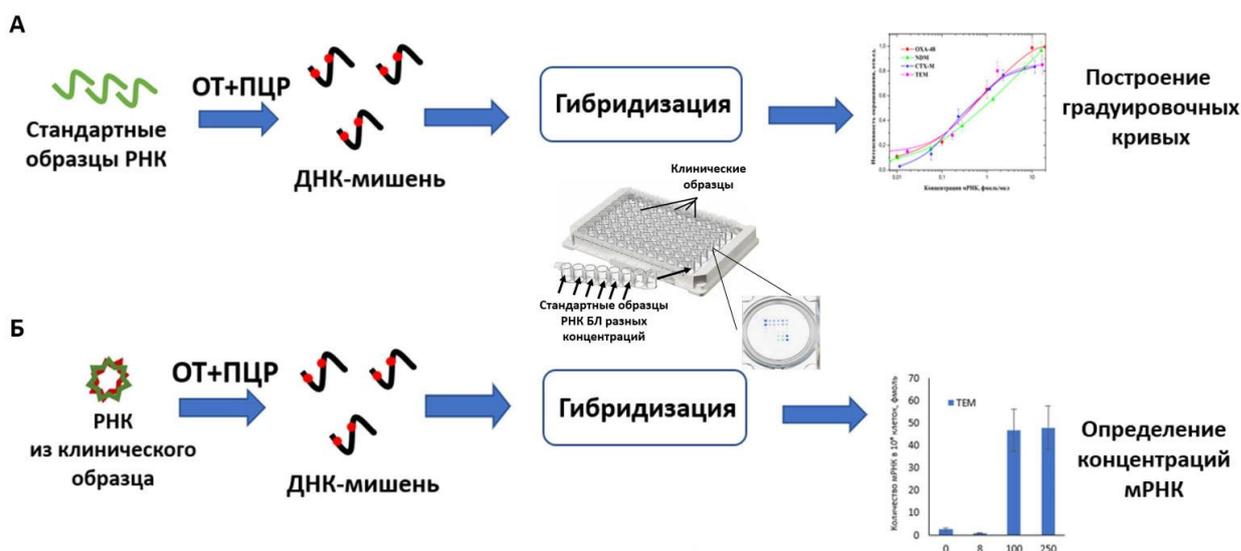


Рис. 9. Принцип метода количественного мультиплексного анализа специфичных мРНК на колориметрических биочипах, расположенных в лунках полистиролового планшета. А) Схема анализа синтетических стандартных образцов мРНК БЛ: получение биотинилированных ДНК-мишеней методом ОТ-ПЦР; гибридационный анализ ДНК-мишеней 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.

Колориметрические биочипы ранее применялись только для качественного мультиплексного определения (идентификации) различных ДНК, в том числе генов БЛ. В этом случае анализ результатов состоит в определении значимых отличий интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа от окрашивания зон с контрольными зондами или фонового окрашивания поверхности носителя. Для количественного определения нуклеиновых кислот необходима дополнительная оптимизация стадий колориметрической детекции биотинилированных дуплексов ДНК и анализа цифровых изображений биочипов.

В работе последовательно решались следующие задачи:

- Получение синтетических образцов мРНК клинически значимых БЛ (ТЕМ-, СТХ-М-1-, NDM- и ОХА-48-типов);
- Оптимизация условий пробоподготовки образцов бактериальных культур для получения ДНК-мишеней БЛ в мультиплексных реакциях 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-лактамов АБП.

Глава 4. Получение стандартных образцов мРНК бета-лактамаз

Задачей данного этапа работы было получение синтетических образцов мРНК, соответствующих полноразмерным генам БЛ TEM-, CTX-M-, NDM- и OXA-48-типов. Образцы получали в реакции транскрипции *in vitro*, в которой мРНК синтезируется на основе матрицы соответствующей ДНК с использованием фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7. Реакция инициируется последовательностью промотора T7 и останавливается на последовательности терминатора T7. Для этого использовали штаммы *E. coli* – продуценты соответствующих рекомбинантных БЛ. Данные штаммы содержат плазмиды pET 24 BL21 с клонированными полноразмерными генами БЛ с участками промотора и терминатора бактериофага T7 (Рис. 10). Штаммы *E. coli* с клонированными генами БЛ TEM-1, CTX-M-116, NDM-1 были получены в нашей лаборатории ранее [214]. Штамм *E. coli* - продуцент БЛ OXA-48 был получен в данной работе по методике, описанной в разделе Материалы и методы. Последовательности генов БЛ были подтверждены методом секвенирования.

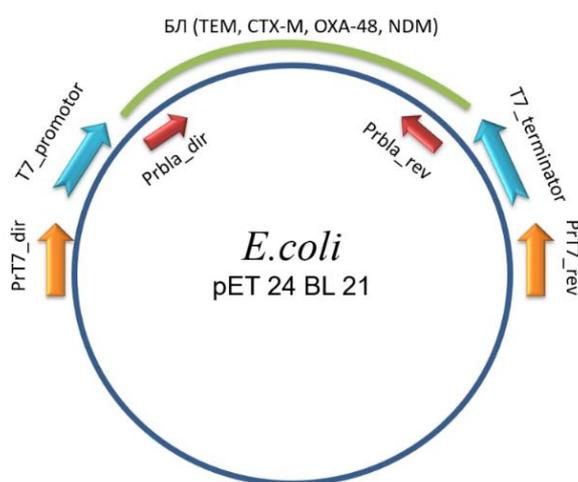


Рис. 10. Строение участка плазмиды pET 24 BL21, использованного для получения стандартных образцов мРНК БЛ TEM-1, CTX-M-116, NDM-1, OXA-48.

Для получения мРНК БЛ методом ПЦР амплифицировали участки плазмид, включающие последовательность гена соответствующей БЛ, а также промотор и терминатор T7 (Рис. 10). Полученные ампликоны использовали в качестве матрицы в реакции транскрипции *in vitro* с ДНК-зависимой РНК-полимеразой T7. Размер и чистоту полученных образцов мРНК оценивали методом электрофореза в агарозном геле (Рис. 11). Основным продуктом реакции являлась одноцепочечная мРНК БЛ, которая включала полноразмерный ген БЛ и участки промотора и терминатора (дорожки № 2 на Рис. 11).

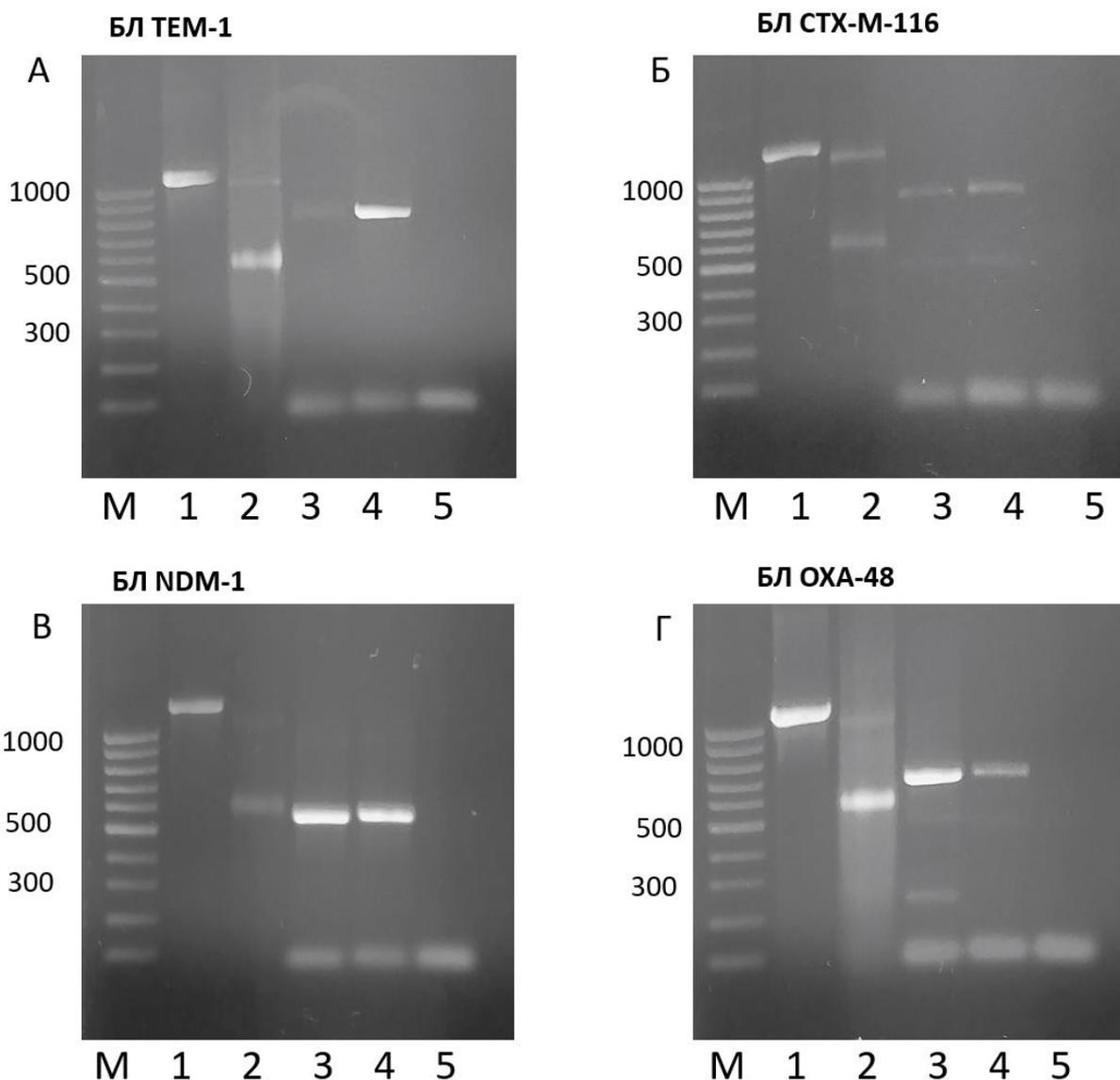


Рис. 11. Электрофореграммы продуктов отдельных стадий синтеза мРНК БЛ: М – смесь ДНК-маркеров известной длины; 1 – двухцепочечный ПЦР-продукт– фрагмент плазмиды рЕТ 24 BL 21, включающий ген БЛ с участками промотора и терминатора бактериофага T7; 2 – одноцепочечная РНК гена БЛ, полученная в реакции транскрипции *in vitro* с примесью ДНК-матрицы; 3 – ампликон, полученный в реакции ПЦР с использованием кДНК, синтезированной из синтетического образца мРНК гена БЛ; 4 – положительный контроль ОТ + ПЦР: ампликон, полученный в последовательных реакциях ОТ и ПЦР из мРНК клинического образца, содержащего ген данной БЛ; 5- отрицательный контроль ПЦР в отсутствии матрицы ДНК. (А – получение мРНК гена БЛ TEM-1; Б - получение мРНК гена БЛ CTX-M-116; В- получение мРНК гена БЛ NDM-1; Г - получение мРНК гена БЛ OXA-48).

Полученные образцы мРНК содержали примесь ДНК-матрицы, которую удаляли обработкой ДНКазой. Полноту удаления контролировали методом электрофореза по отсутствию синтезируемого продукта ПЦР. Характеристики синтезированных мРНК БЛ представлены в Таблице 6. Расчетные размеры длины находятся в диапазоне 959 – 1121 н., подтвердить их размер методом электрофореза не удалось из-за отсутствия одноцепочечных маркеров известной длины. Концентрация мРНК была сравнима для всех четырех типов БЛ. Степень чистоты полученных препаратов охарактеризована соотношением $A_{260/280}$, значения которых свидетельствовали об отсутствии белковых примесей в полученных препаратах.

Структуры мРНК были проанализированы на возможность формирования вторичных структур. Наиболее высоким значением потенциальных сайтов образования шпилечных структур характеризовалась мРНК БЛ NDM-1, что может в дальнейшем сказаться на эффективности синтеза первой цепи кДНК и последующей амплификации. У мРНК БЛ TEM-1, СТХ-М-116 вероятность формирования шпилечных структур была меньше, последовательность мРНК ОХА-48 не содержала нуклеотидных последовательностей для формирования вторичных структур.

Таблица 6. Характеристики синтетических мРНК бета-лактамаз, полученных в работе.

| Тип мРНК | Длина мРНК, оснований | Длина гена, оснований | GC состав, % | Количество потенциальных сайтов образования шпилечных структур | Концентрация мРНК, нМ | $A_{260/280}$ |
|-----------|-----------------------|-----------------------|--------------|--|-----------------------|---------------|
| TEM-1 | 1095 | 876 | 49% | 6 | 17 | 2,13 |
| СТХ-М-116 | 1121 | 875 | 52% | 8 | 27 | 2,33 |
| NDM-1 | 1072 | 812 | 61% | 10 | 16 | 2,51 |
| ОХА-48 | 959 | 798 | 45% | 0 | 20 | 2,23 |

Далее сравнили размер продуктов реакции ОТ-ПЦР, полученных из синтетических образцов мРНК БЛ и образцов общей РНК, выделенной из штаммов-продуцентов данных БЛ. Для этого получили первую цепь кДНК в реакции ОТ из образцов синтетической мРНК каждой БЛ и образцов общей РНК. Образцы кДНК использовали в качестве матрицы ПЦР, результаты которой представлены на дорожках № 3 и 4 Рис. 11. Размер амплифицированных продуктов был одинаков для двух типов ампликонов для всех исследованных четырех типов БЛ. Это свидетельствует о том, что последовательности синтетических образцов мРНК генов БЛ могут быть использованы в качестве стандартных образцов количественного гибридазационного анализа на биочипах.

Изучение стабильности синтетического образца мРНК гена ОХА-48 при хранении в концентрации 1 нМ при -20°C показало, что выход ампликона (в качестве матрицы использованы образцы мРНК, хранившиеся в течение разного времени при -20°C) в последовательных реакциях ОТ-ПЦР был сравнимым при хранении в течение не менее 90 дней (3 месяца) (Рис. 12). Сохранение активности при хранении синтетических образцов мРНК, полученных с использованием реагентов и воды, свободных от РНКаз, важно для их использования в качестве стандартных образцов тест-систем для количественного определения специфичных мРНК.

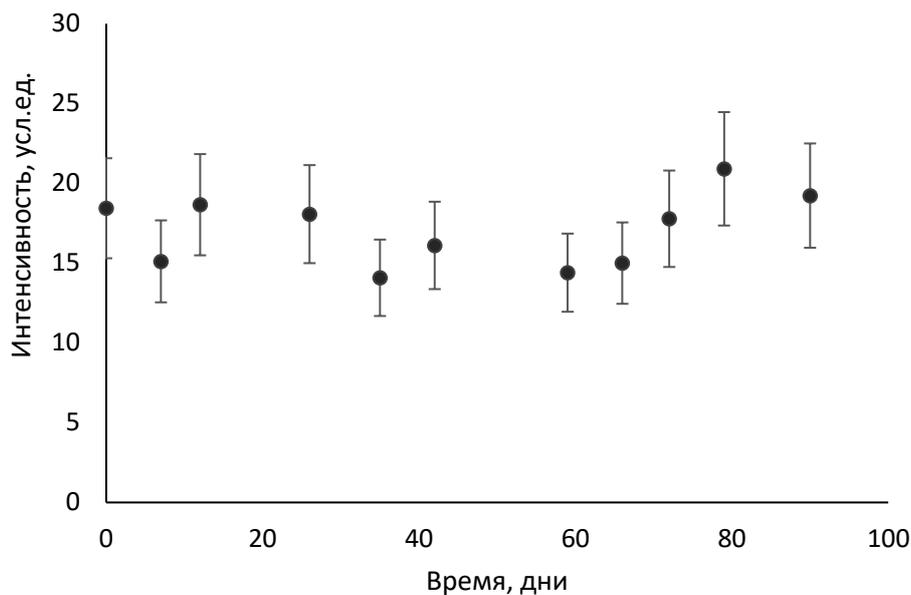


Рис. 12. Зависимость выхода ампликона образца мРНК гена БЛ ОХА-48 в последовательных реакциях ОТ-ПЦР от времени хранения при -20°C в концентрации 1 нМ.

Глава 5. Оптимизация условий пробоподготовки образцов РНК для гибридизационного анализа на биочипах

5.1 Выделение общей РНК из бактериальных культур

Методы выделения фракции общей РНК из бактериальных клеток обычно включают три основные стадии: лизис клеток, очистку нуклеиновых кислот от белковых молекул и отделение РНК от ДНК. Для этих целей наиболее часто используют метод экстракции смесью фенола с хлороформом, основанный на различной растворимости РНК и ДНК в водных и органических растворителях: в органической фазе фенола остаются белки, в водной – нуклеиновые кислоты. В кислой среде РНК полностью находится в водной фазе хлороформа, а ДНК концентрируется в промежуточной интерфазе. Выделение смеси ДНК и РНК проводят в присутствии гуанидин изотиоцианата, который является денатурирующим агентом белков. Далее РНК осаждают изопропиловым спиртом и перерастворяют. Данный метод позволяет получать недеградированную чистую РНК.

В последние годы активно используются методы выделения нуклеиновых кислот, основанные на их способности сорбироваться на пористых поверхностях, например, смоле, силикагеле, стекле за счет образования водородных связей или электростатических взаимодействий с поверхностью носителя. После промывки образец РНК десорбируют с носителя с использованием растворов с более высокой ионной силой.

Мы провели сравнение эффективности выделения РНК с использованием спин-колонок и фенол-хлороформной экстракции. Эксперимент проводили с использованием штамма *E. coli* - продуцента рекомбинантной БЛ ТЕМ-1, который культивировали в жидкой питательной среде LB до концентрации клеток 1×10^8 КОЕ/мл. Из бактериальной культуры выделяли фракцию общей РНК и анализировали полученные препараты методом электрофореза (Рис. 13). В обоих случаях наблюдали две четкие полосы рибосомальной 18 S и 28 S РНК. Концентрацию общей РНК определяли спектрофотометрически в УФ области (260 нм) (Таблица 7). Показано, что выделение РНК с использованием фенол-хлороформной экстракции позволяет повысить общий выход нуклеиновых кислот примерно в 2 раза. При использовании спин-колонок наблюдаются большие потери РНК при выделении, также на электрофореграммах наблюдали меньшую интенсивность свечения полос РНК, что свидетельствует о значительной примеси ДНК. Поэтому в дальнейшей работе для выделения фракции общей РНК бактериальных клеток использовали метод фенол-хлороформной экстракции.

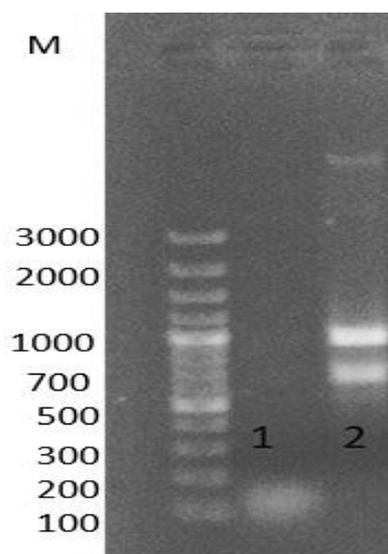


Рис. 13 Электрофореграмма общей РНК, выделенной из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ TEM-1 с использованием 1- спин-колонок; 2 – фенол-хлороформной экстракции. М -маркер размера нуклеиновых кислот. Количество бактериальных клеток 1×10^8 КОЕ/мл.

Таблица. 7 Концентрация общей РНК, выделенной из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ TEM-1 (1×10^8 КОЕ/мл) различными методами.

| Фенол-хлороформная экстракция | Спин-колонок |
|-------------------------------|---------------|
| 900±150 нг/мкл | 500±80 нг/мкл |

5.2 Получение меченных биотином ДНК-мишеней бета-лактамаз из образцов РНК

5.2.1 Оптимизация условий получения первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции

Выбор ревертазы

Для эффективного синтеза ДНК-мишени необходимо выбрать условия реакций последовательных стадий ОТ и ПЦР, в которых выход специфичных ампликонов будет максимален. Синтез кДНК из образцов мРНК проводили в реакции ОТ с использованием ревертаз и праймеров различного состава. Было изучено использование разных ревертаз MMLV вируса лейкемии летучих мышей, характеризующихся различными температурными оптимумами (Таблица 8). Наиболее высокой термостабильностью характеризовалась ревертаза №4, которая получена модификацией *in vitro* фермента MMuLV-RT (№3). Получение кДНК проводили в реакции ОТ с использованием в качестве

матрицы фракции общей РНК, выделенной из штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной БЛ ТЕМ-1. Полученные образцы кДНК амплифицировали в реакции ПЦР, электрофореграмма результатов амплификации показана на Рис. 14. Установлено, что наиболее высоким выходом синтеза продуктов характеризовались ферменты № 1, 3, 4. При использовании ревертазы №2 с наиболее низким температурным оптимумом выход был существенно ниже. Для дальнейшей работы была использована ревертаза MMLV-RT (№1).

Таблица 8. Ревертазы MMLV, используемые в реакции ОТ, для синтеза кДНК.

| Тип ревертазы | Название | Температурный оптимум, °С |
|---------------|--|---------------------------|
| 1 | MMLV-RT | 37-45 °С |
| 2 | MMLV-RH | до 37 °С |
| 3 | MMuLV-RT | 42-55 °С |
| 4 | MMuLV Maxima (модифицированный фермент) | до 65 °С |

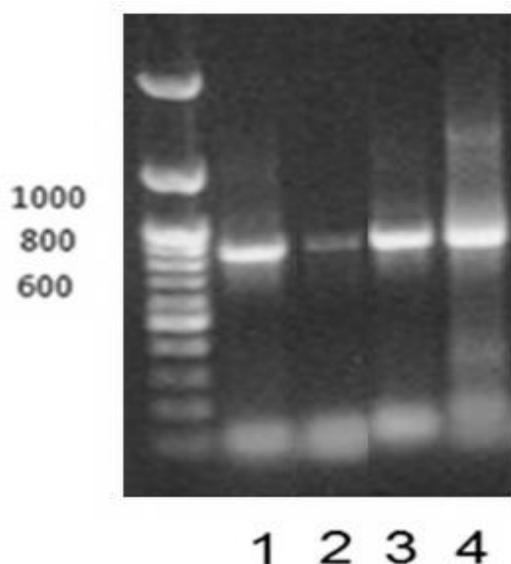


Рис. 14. Электрофореграмма ПЦР продуктов, полученных из кДНК с использованием различных ревертаз (1-4) в реакции ОТ. кДНК получена в реакции ОТ из образцов мРНК БЛ ТЕМ-1, выделенных из штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной БЛ (концентрация клеток 1×10^8 КОЕ/мл).

Выбор структуры праймеров

Структура праймеров, используемых в реакции ОТ, влияет на эффективность и количество синтезируемой кДНК. В качестве праймеров можно использовать либо смесь случайных (вырожденных) праймеров, приводящих к синтезу набора кДНК разного состава, или ген-специфичных праймеров для направленного синтеза интересующих последовательностей. На данном этапе работы изучили влияние состава праймеров на выход продуктов реакции, для этого использовали набор праймеров случайного состава длиной 10 оснований в комбинации с олиго-dT концевым праймером и ген-специфичный для БЛ праймер. В качестве матрицы использовали общую РНК, выделенную из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ ТЕМ -1 (концентрация клеток 1×10^7 КОЕ/мл). Ген-специфичный для этого типа БЛ праймер был выбран ранее по консервативному концевому участку 3'-нуклеотидной последовательности гена [217]. Далее полученные кДНК использовали в качестве матрицы ПЦР, размер и состав продуктов которой анализировали методом электрофореза (Рис. 15). Для сравнения праймеров различного состава результат, полученный с использованием набора случайных праймеров, принимали за «1».

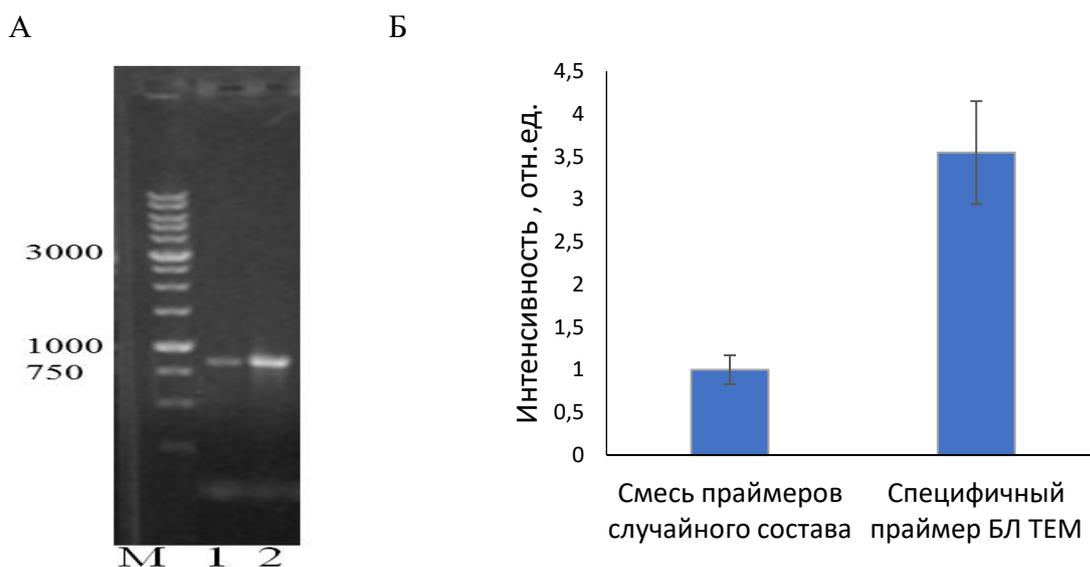


Рис. 15. А) Электрофореграмма продуктов последовательных реакций ОТ и ПЦР гена БЛ ТЕМ-1. Реакцию ОТ проводили с использованием смеси праймеров случайного состава длиной 10 оснований и олиго-dT праймером и специфичного праймера для БЛ ТЕМ-типа. В качестве матрицы использован образец общей РНК, выделенный из клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантной БЛ ТЕМ-1 (1×10^7 КОЕ/мл). Б) Относительный выход целевого продукта гена БЛ ТЕМ-1 в последовательных реакциях ОТ и ПЦР.

Анализ полученных результатов показывает, что использование специфичного праймера позволяет существенно увеличить выход продукта реакции (в 3,5 раза), что объясняется направленным синтезом кДНК нужной специфичности и отсутствием синтеза нецелевых продуктов.

Выбор концентрации специфичного праймера

Реакцию ОТ проводили с использованием синтетических образцов мРНК генов БЛ в концентрации 10 нМ, концентрацию специфичных для генов БЛ праймеров варьировали в диапазоне 0,1 - 0,8 мкМ. Полученные кДНК амплифицировали в реакции ПЦР, относительный выход ампликонов оценивали методом электрофореза: значение интенсивности окрашивания продукта амплификации нормировали на значение интенсивности окрашивания полосы продукта амплификации положительного контроля ПЦР - ампликона, полученного в результате амплификации ДНК, выделенной из штамма-продуцента соответствующей БЛ. Результаты представлены на Рис. 16.

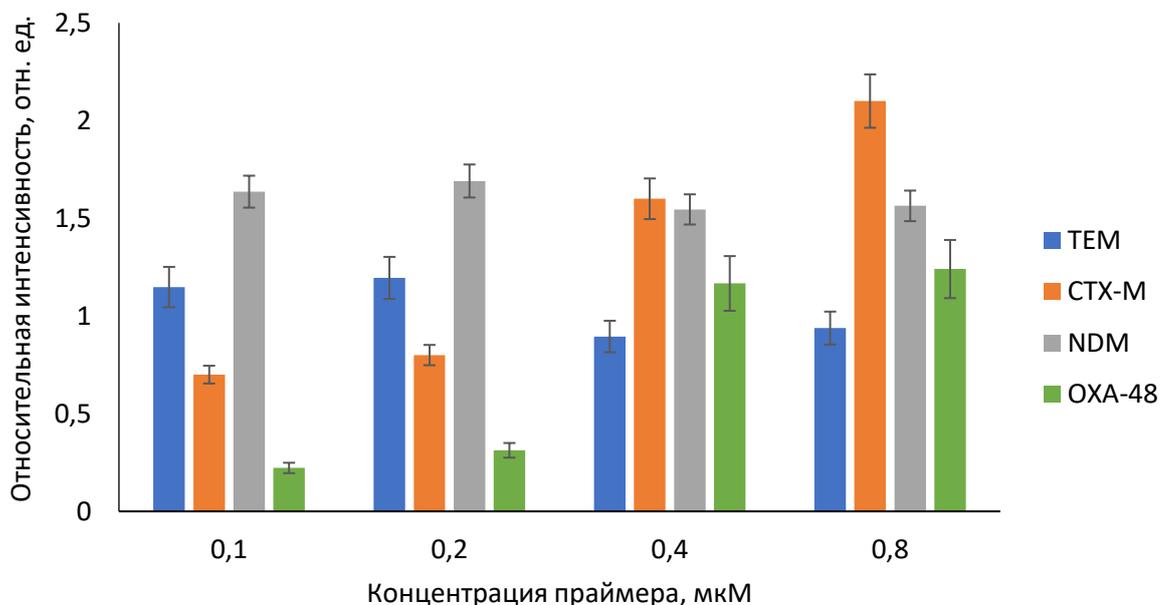


Рис. 16. Относительный выход целевых продуктов амплификации генов БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-116, NDM-1, ОХА-48) в зависимости от концентрации ген-специфичных праймеров в реакции ОТ.

При получении ампликонов из образцов мРНК генов БЛ ТЕМ-1 и БЛ NDM-1 выход продукта практически не зависел от концентрации праймера. Для образцов мРНК генов БЛ СТХ-М-116 и БЛ ОХА-48 наблюдали увеличение выхода продукта реакции в зависимости от концентрации специфичного праймера, причем для мРНК гена БЛ ОХА-48 значение интенсивности достигало максимума при концентрации специфичного праймера 0,4 мкМ, а для БЛ гена СТХ-М-116 увеличивалось при возрастании концентрации праймера до

концентрации 0,8 мкМ. Для дальнейшей работы использовали концентрацию праймеров 0,4 мкМ, как наиболее оптимальную для синтеза всех генов БЛ.

Оптимизация времени реакции

Далее было изучено влияние времени реакции ОТ на выход продуктов (кДНК) с использованием синтетической мРНК гена NDM-1 (16 нМ). Результат реакций ОТ и ПЦР анализировали по выходу продукта, который определяли по интенсивности, соответствующей ему полосы на электрофореграмме (Рис. 17). Более высокие значения выхода продукта были достигнуты при проведении реакции в течение 1 часа.

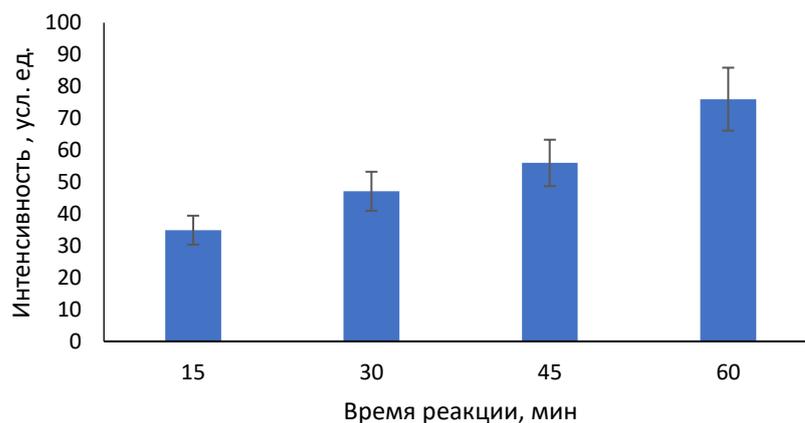


Рис. 17. Зависимость интенсивности полосы продукта амплификации на электрофореграмме продуктов реакций ОТ-ПЦР от времени реакции ОТ. В реакции ОТ использовали стандартный образец мРНК NDM-1 (16 нМ).

5.2.2 Оптимизация количества циклов ПЦР

Для оптимизации условий амплификации генов БЛ методом ПЦР с одновременным введением метки-биотина в качестве матрицы использовали образцы кДНК, полученные из стандартных образцов мРНК генов БЛ (ТЕМ-1, NDM-1, ОХА-48) в концентрации 5 нМ. Выход продукта амплификации определяли по интенсивности соответствующей полосы на электрофореграмме. Для сравнения ампликонов генов разных БЛ значения интенсивностей нормировали на интенсивность контрольного образца, полученного в результате амплификации ДНК соответствующей БЛ известной концентрации. Анализ зависимости относительных интенсивностей от числа циклов (Рис. 18) показал, что выход реакции увеличивается пропорционально увеличению циклов и достигает максимальных значений после 27 цикла. Последующее увеличение количества циклов не приводило к увеличению выхода продуктов ни для одного из генов БЛ.

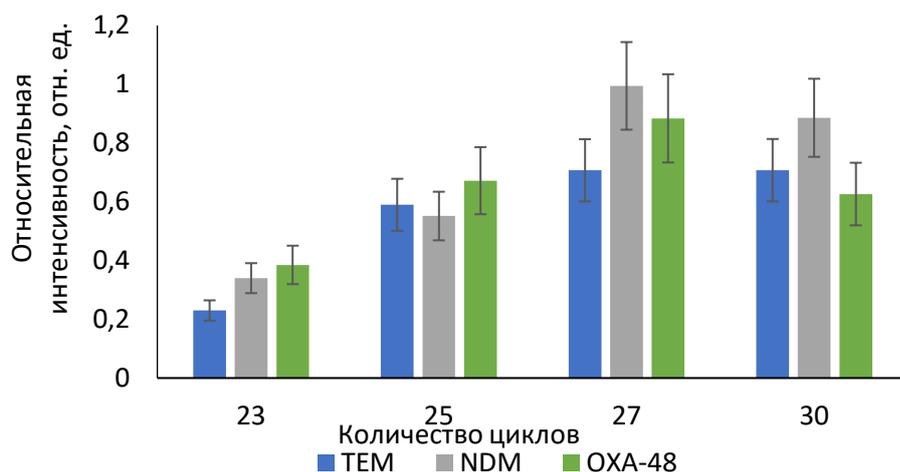


Рис. 18. Относительный выход ампликонов генов БЛ, полученных с использованием разного числа циклов ПЦР.

Для количественного анализа мРНК важным параметром является диапазон изменений концентраций продуктов амплификации. Поскольку на последних циклах ПЦР эффективность реакции начинает снижаться, важно определить оптимальное количество циклов амплификации, при котором наблюдаются пропорциональные изменения выхода продукта от концентрации матрицы. Эксперимент проводили с использованием стандартного образца мРНК гена БЛ ОХА-48. Зависимость выхода ампликонов от концентрации мРНК при использовании разного количества циклов ПЦР представлена на Рис. 19.

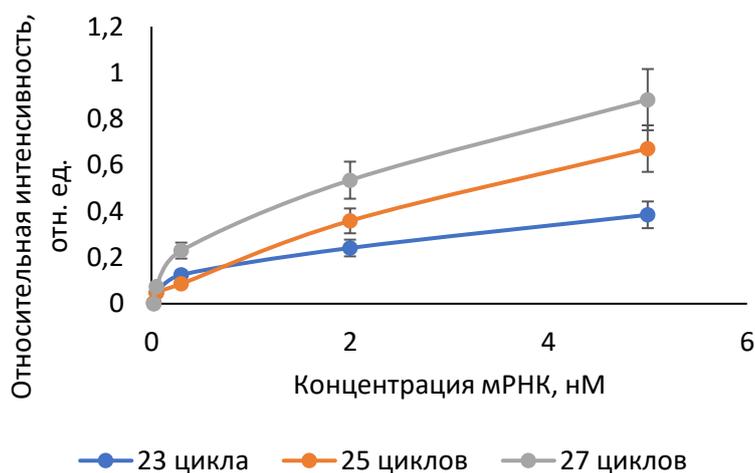


Рис. 19. Зависимость относительных выходов ампликонов БЛ ОХА-48, полученных с использованием разного числа циклов амплификации, от концентрации мРНК.

Анализ результатов показывает, что значения интенсивностей полос увеличивались пропорционально концентрации мРНК в выбранном диапазоне числа циклов (от 23 до 27). Значения интенсивностей полос ампликонов, полученных за 27 циклов реакции,

характеризовались более высокими сигналами на всем диапазоне исследованных концентраций, поэтому данное число циклов использовали в дальнейшем для амплификации всех ДНК-мишеней.

5.2.3 Оптимизация условий мультиплексной реакции обратной транскрипции

На следующем этапе работы изучали условия проведения реакции ОТ в мультиплексном режиме, что упрощает проведение мультианализа разных мРНК на биочипах. Для этих целей оценивали возможность синтеза кДНК четырех БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-116, NDM-1, ОХА-48) в одной реакции. Для этого проводили реакцию ОТ в присутствии смеси четырех ген-специфичных для БЛ праймеров (концентрация – 0,4 мкМ). В качестве матриц использовали смесь четырех стандартных образцов мРНК генов БЛ (концентрация каждого стандартного образца - 10 нМ). Для контроля проводили реакцию ОТ с использованием одного ген-специфичного праймера и одного стандартного образца мРНК соответствующей БЛ.

Полученные кДНК использовали в качестве матриц в специфичных реакциях ПЦР, выход ампликонов оценивали методом электрофореза в относительных единицах: значение интенсивности нормировали на значение выхода положительного контрольного образца ПЦР, полученного при амплификации ДНК соответствующей БЛ известной концентрации. Сравнение эффективности совместного синтеза четырех типов кДНК в одной реакции ОТ со специфичными реакциями для каждого типа мРНК (Рис. 20) не выявило снижения эффективности ни для одного из типов генов БЛ.

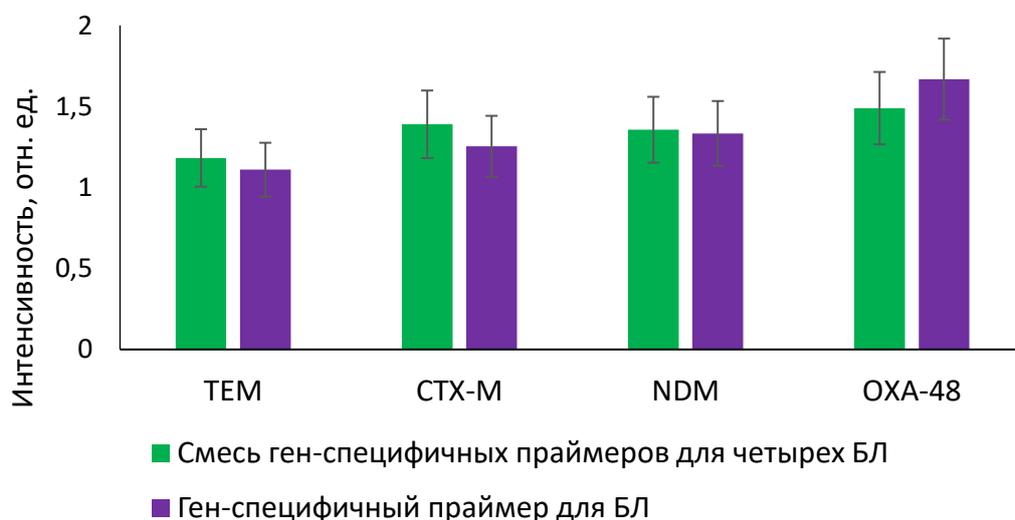


Рис. 20. Относительный выход ампликона гена БЛ в реакциях ОТ+ПЦР при проведении реакции ОТ в присутствии смеси ген-специфичных праймеров 4х типов (зеленые столбцы) или одного ген-специфичного праймера (фиолетовые столбцы). В качестве матриц использованы стандартные образцы мРНК в концентрации 10 нМ.

Глава 6. Оптимизация гибридизационного анализа на колориметрических биочипах для количественного определения ДНК

Целью данного этапа работы являлся выбор и характеристика структур олигонуклеотидных зондов, обеспечивающих высокую чувствительность и специфичность количественного определения ДНК-мишеней БЛ четырех типов в одном анализе. Критерием выбора являлась величина интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа, на которых образуются дуплексы иммобилизованных зондов с фрагментами ДНК-мишеней комплементарной структуры. Значение интенсивности окрашивания определяли как абсолютное значение интенсивности окрашивания после вычета фонового окрашивания (окрашивание поверхности биочипа без иммобилизованных зондов). Для контроля специфичности оценивали интенсивность окрашивания зон биочипа с зондами некомплементарной структуры после вычета значения фонового окрашивания. Для детекции биотина в дуплексах ДНК сравнили колориметрическую детекцию с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена и цифровую детекцию с использованием конъюгата стрептавидина с НЧ золота и подсчета плотности НЧ на специфичных зонах биочипах с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

6.1 Выбор параметров нанесения олигонуклеотидных зондов на биочип и оптимизация структуры специфичных зондов для генов бета-лактамаз

6.1.1 Оптимизация параметров печати олигонуклеотидных зондов в лунках 96-луночных планшетов

Данную часть работы проводили с использованием двух модельных олигонуклеотидных зондов, которые в дальнейшем использовали как контрольные зонды биочипов (положительный и отрицательный контроли гибридизации (ПКГ и ОКГ)). Последовательности этих зондов (Таблица 4) были выбраны ранее как не встречающиеся у бактерий. Для ковалентной иммобилизации в зонды вводили amino-группу на 5'-конец. В качестве модельной ДНК-мишени использовали олигонуклеотид ПКГ-Бт, комплементарный по структуре зонду ПКГ и модифицированный биотином на 5'-конец.

Для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов поверхность полистирола модифицировали фото-активным гетеробифункциональным ароматическим азидом (п-азидотетрафторбензальдегидом), преимущества данной группы соединений для модификации полистирола были показаны ранее [222]. Принцип фотохимической модификации состоит в следующем (Рис. 21): на первой стадии азидо-группа

бифункционального реагента под действием УФ облучения превращается в высокореакционноспособный нитрен, который ковалентно встраивается в связь С–Н полистирола; на второй стадии альдегидная группа реагента взаимодействует с аминогруппой олигонуклеотидного зонда с образованием основания Шиффа.

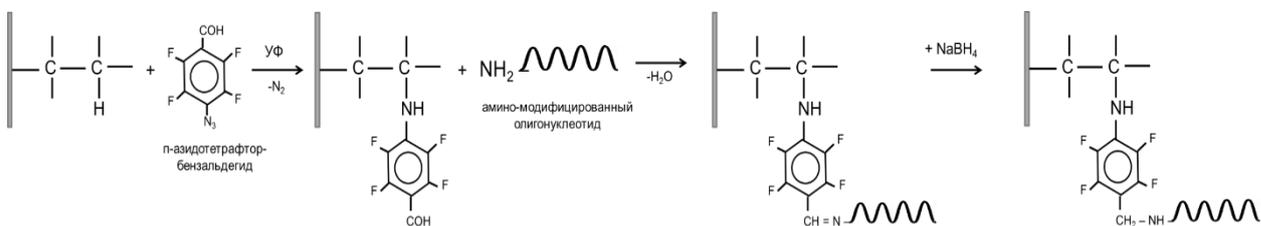


Рис. 21. Схема иммобилизации олигонуклеотидного зонда на поверхности полистирола, модифицированного п-азидотетрафторбензальдегидом.

Печать олигонуклеотидных зондов проводили контактным методом с использованием игл с керамическими наконечниками, внутри которых расположен капилляр определенного диаметра (0,048 - 0,102 нм). Он заполняется раствором соответствующего зонда, затем при касании иглой поверхности носителя на ней образуются небольшая капля от 2 до 30 нл в зависимости от диаметра капилляра и типа носителя.

На первом этапе выбирали оптимальный диаметр керамической иглы: наносили зонд ПКГ на поверхность лунки в 12 повторах с использованием игл двух диаметров (200 и 300 мкм, диаметр капилляра 0,048 и 0,064 нм, соответственно). Далее проводили гибридизацию модельной ДНК-мишени (ПКГ-Бт) и после колориметрической детекции определяли интенсивность окрашивания зон биочипа. В Таблице 9 приведены средние значения интенсивностей окрашивания зон и их средние диаметры при нанесении зондов иглами двух типов. При нанесении зондов иглой 300 мкм с диаметром капилляра 0,064 нм интенсивность окрашивания зон биочипа была выше и характеризовалась лучшей воспроизводимостью. При использовании игл диаметром 200 мкм воспроизводимость интенсивностей окрашивания была ниже, также иногда происходил пропуск отдельных капель при печати. Поэтому далее для изготовления биочипов в лунках полистиролового планшета использовали иглы с диаметром 300 мкм.

Таблица. 9. Параметры зон биочипа после определения модельной ДНК-мишени (ПКГ-Бт) при печати контрольного олигонуклеотидного зонда (ПКГ) с использованием керамических игл различного диаметра.

| Диаметр иглы, мкм/ диаметр капилляра, нм | Среднее значение интенсивности окрашивания, усл. ед. | Средний диаметр пятна биочипа после окрашивания, мкм |
|---|--|--|
| 200/0,048 | 28500 ± 1500 | 230 ± 40 |
| 300/0,064 | 32800 ± 650 | 320 ± 15 |

Для определения количества зон биочипа, воспроизводимо нанесенных одной иглой в лунки планшета наносили контрольный зонд ПКГ в 96 повторах. Это количество соответствует нанесению одного зонда в 16 лунок (два стрипа планшета по 8 лунок) в 6 повторах. Далее проводили гибридизационный анализ комплементарной ДНК-мишени (ПКГ-Бт) в фиксированной концентрации и определяли значения интенсивностей окрашивания каждой зоны биочипа (Рис. 22). Они находились в диапазоне 27200-35700 усл. ед., коэффициент вариации составил 6,2%, что характеризует воспроизводимость печати олигонуклеотидных зондов на поверхности полистирола как высокую.

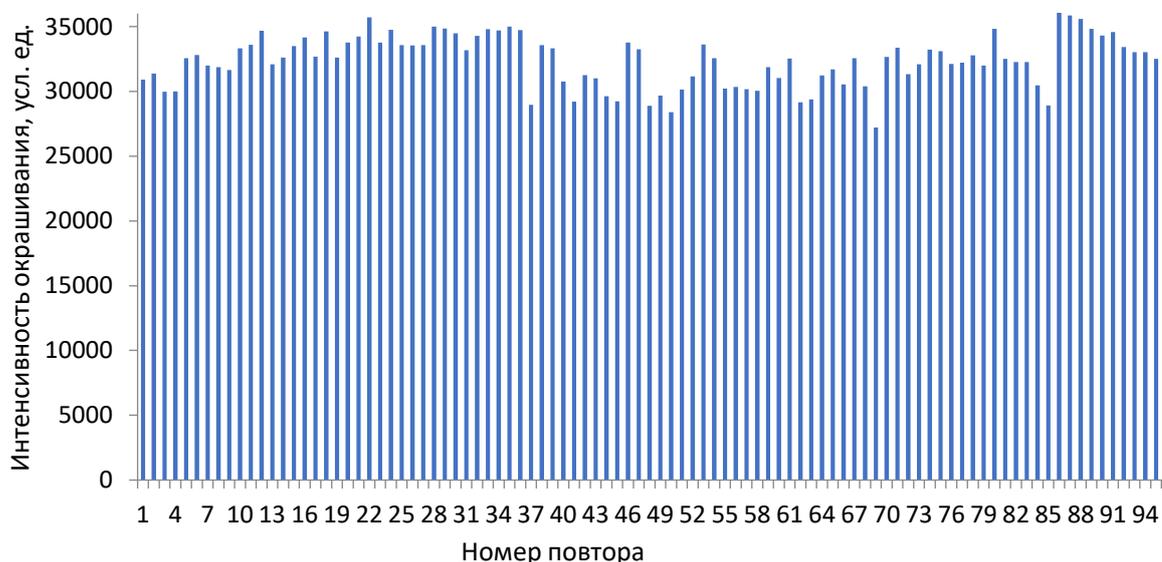


Рис. 22. Зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа с иммобилизованным зондом ПКГ после гибридизации с ПКГ-Бт (100 пмоль/мкл) от порядкового номера зоны при печати.

6.1.2 Структура специфичных олигонуклеотидных зондов для определения бета-лактамаз четырех типов

В данной работе для определения нуклеиновых кислот используется метод аллель-специфичной гибридизации, основанный на образовании стабильного дуплекса ДНК-мишени с комплементарным олигонуклеотидным зондом, иммобилизованным на биочипе. Структура зондов и их стерическая доступность на носителе для образования дуплексов ДНК определяют как чувствительность, так и специфичность анализа.

Выбор длины спейсера олигонуклеотидных зондов

Для увеличения эффективности гибридизации ДНК-мишени с иммобилизованными зондами на их 5'-конец вводили спейсер, состоящий из последовательности олиго-dT. На Рис. 23 представлены результаты гибридизации гена БЛ ТЕМ-1 со специфичными зондами, содержащими олиго-dT разной длины. Интенсивности окрашивания нормировали на интенсивность окрашивания зоны гибридизации модельной ПКГ-Бт с зондом ПКГ на том же биочипе. Удлинение спейсера от 0 до 13 нуклеотидов увеличивало значение интенсивности окрашивания, дальнейшее увеличение длины до 24 нуклеотидов приводило к ее незначительному снижению. Длина спейсера в 13 нуклеотидов была выбрана как оптимальная, обеспечивающая доступность иммобилизованных на полистироле зондов для взаимодействия с ДНК.

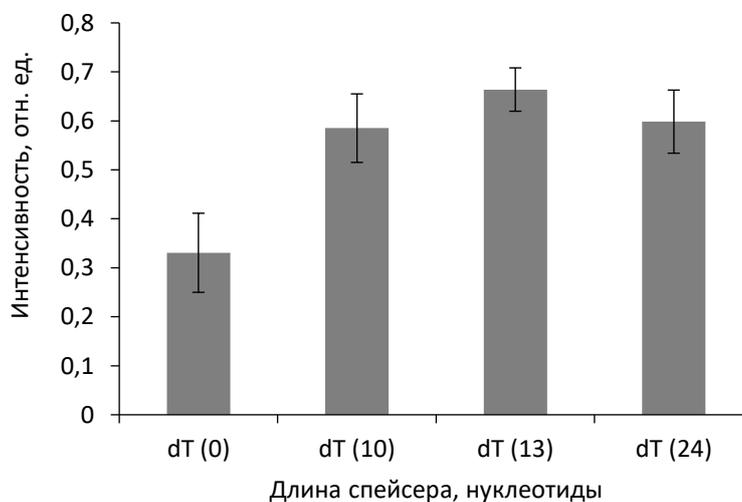


Рис. 23. Зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа после гибридизации ДНК-мишени БЛ ТЕМ-1 (200 нг в лунке) с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами, имеющими спейсеры разной длины. Результаты усреднены для 6 повторов.

Выбор структуры специфичных олигонуклеотидных зондов для определения бета-лактамаз

Для выбора структуры специфичных олигонуклеотидных зондов были собраны и проанализированы нуклеотидные последовательности генов БЛ, относящихся к TEM- и NDM- типам, а также к субкластерам CTX-M-1 и OXA-48. На основании выравнивания последовательностей генов БЛ каждого типа определяли их консервативные участки, не содержащие замен. Для каждой группы генов БЛ было выбрано несколько консервативных участков, на их основе выбрали структуру нескольких вариантов зондов для каждого типа БЛ длиной от 16 до 28 оснований. Для каждого зонда рассчитали T_m плавления и GC-состав. Данные для выбранных зондов приведены в Таблице 10.

Зонды иммобилизовали в лунках планшетов в 6 повторах. На Рис. 24 представлены результаты гибридизационного анализа ДНК-мишеней разных БЛ (TEM-1, CTX-M-15, NDM-1 и OXA-48), полученных в реакции ПЦР из образцов ДНК, выделенных из лабораторных штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных БЛ данных типов. Для дальнейшей работы были выбраны олигонуклеотидные зонды ID₁-TEM, ID₃-CTX-M, ID₄-NDM, ID₆-OXA-48, обеспечивающие наиболее высокие значения интенсивностей окрашивания при одинаковой концентрации ДНК-мишени. Выбранные зонды для БЛ CTX-M, NDM, OXA-48 характеризовались схожими значениями энергии Гиббса, что предположительно позволит проводить гибридизацию со схожей эффективностью. Меньшие значения для БЛ TEM, по-видимому, связаны с более короткой длиной олигонуклеотидного зонда по сравнению с длинами других зондов.

Анализ специфичности олигонуклеотидных зондов

Для одновременного определения на биочипах генов БЛ разных типов важно, чтобы олигонуклеотидные зонды характеризовались высокой специфичностью, то есть способностью выявлять гены БЛ только одного типа. Для изучения специфичности зондов в отношении БЛ своего и других типов изготавливали биочипы, включающие выбранные специфичные олигонуклеотидные зонды, зонд для БЛ SHV-типа (его последовательность выбрана ранее [203] данный тип БЛ относится к молекулярному классу A, кодирующие гены имеют высокую гомологию с генами БЛ TEM типа и более низкую гомологию с генами БЛ CTX-M типа) и два контрольных зонда, которые наносили в 6 повторах. Затем гибридизовали разные ДНК-мишени (TEM-1, CTX-M-15, NDM-1 и OXA-48), каждую на отдельном биочипе, а также смесь всех четырех мишеней. Значения интенсивностей окрашивания зон со специфичными зондами нормировали на значение интенсивности окрашивания положительного контроля (Рис. 25).

Таблица. 10. Последовательности олигонуклеотидных зондов для идентификации бета-лактамаз четырех типов, исследованных в работе.

| Название | Последовательность 5' -3' | Длина, нуклеотидов | GC состав, % | Тпл., °C | ΔG, ккал/моль |
|---|------------------------------|--------------------|--------------|----------|---------------|
| Бета-лактамазы TEM-типа (класс А) | | | | | |
| ID1-TEM | CAGTGCTGCCATAACCATG | 19 | 53 | 52 | 23,9 |
| ID2-TEM | CTGACAACGATCGGAGGACCG | 21 | 62 | 58 | 30,2 |
| ID3-TEM | GCAAACATTAACCTGGCGAACTAC | 24 | 42 | 54 | 29,5 |
| ID4-TEM | GCTTCCC GGCAACAATTAATAG | 22 | 45 | 53 | 27,7 |
| Бета-лактамазы CTX-M-типа, субкластер CTX-M-1 (класс А) | | | | | |
| ID1-CTX-M | CACCCAGCCTCAACCTAA | 18 | 56 | 50 | 23,1 |
| ID2-CTX-M | ACCCAACCGGAGCAGA | 16 | 63 | 48 | 22,1 |
| ID3-CTX-M | CTCACCCAGCCTCAACCTAAGG | 23 | 57 | 59 | 30,9 |
| ID4-CTX-M | CGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTG | 23 | 52 | 57 | 31,3 |
| ID5-CTX-M | GGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCG | 23 | 48 | 55 | 30,3 |
| ID6-CTX-M | CGCTACAGTACAGCGATAACGTG | 23 | 52 | 57 | 31,4 |
| ID-CTX-M-9 | ACCCAGCCGCAACAGA | 16 | 63 | 49 | 22,5 |
| Бета-лактамазы NDM-типа (класс В) | | | | | |
| ID1-NDM | CCTGATCAAGGACAGCAAGG | 20 | 55 | 54 | 25,7 |
| ID2-NDM | CCAAGTCGCTCGGCAATCTC | 20 | 60 | 56 | 28,1 |
| ID3-NDM | CAAGGCCAAGTCGCTCGGCAATCTC | 25 | 60 | 63 | 36,9 |
| ID4-NDM | GCAAGGCCAAGTCGCTCGGCAATCTCG | 27 | 63 | 66 | 42,0 |
| Бета-лактамазы OXA-типа, субкластер OXA-48 (класс D) | | | | | |
| ID1-OXA-48 | GCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCAAGG | 27 | 48 | 60 | 35,4 |
| ID2-OXA-48 | GGATGAACACCAAGTCTTTAAGTGG | 25 | 44 | 56 | 30,9 |
| ID3-OXA-48 | CAGTTGTGCCTGTTTATCAAGAATTTGC | 28 | 39 | 57 | 35,0 |
| ID4-OXA-48 | GGCAATGTAGACAGTTTCTGGCTCG | 25 | 52 | 59 | 33,8 |
| ID5-OXA-48 | GCTGTATCACAATAAGTTACACGTATC | 27 | 37 | 52 | 31,8 |
| ID6-OXA-48 | GCTGTATCACAATAAGTTACACGTATCG | 28 | 39 | 57 | 34,6 |
| ID7-OXA-48 | CAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGG | 26 | 58 | 63 | 37,7 |

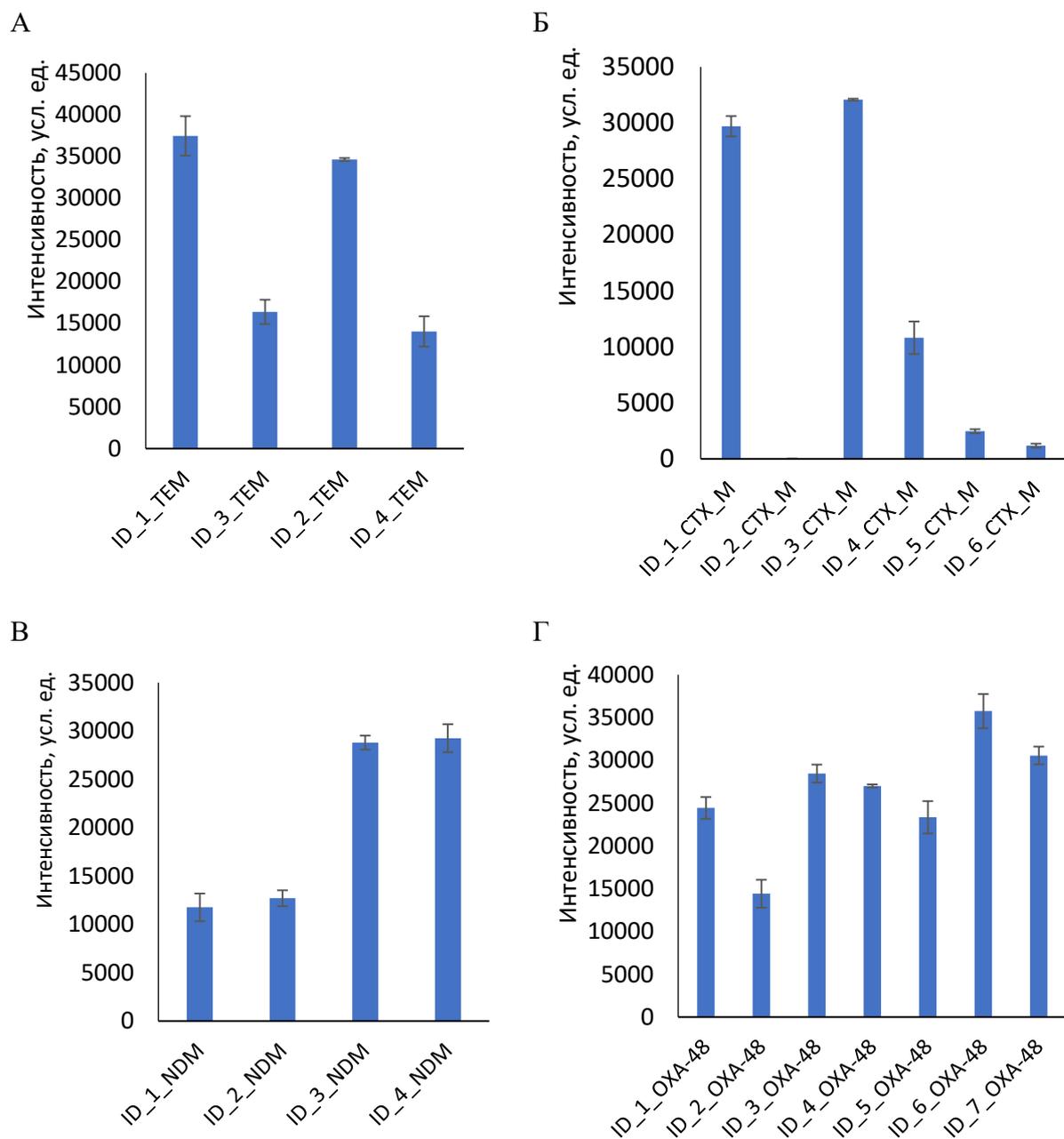


Рис. 24. Интенсивность окрашивания специфичных зон биочипа после гибридизации ДНК-мишеней (400 нг в лунке), амплифицированных из клеток *E.coli* -продуцентов соответствующих рекомбинантных БЛ, со специфичными олигонуклеотидными зондами. А) ДНК-мишень БЛ TEM-1, Б) ДНК-мишень БЛ CTX-M-15, В) ДНК-мишень БЛ NDM-1, Г) ДНК-мишень БЛ OXA-48.

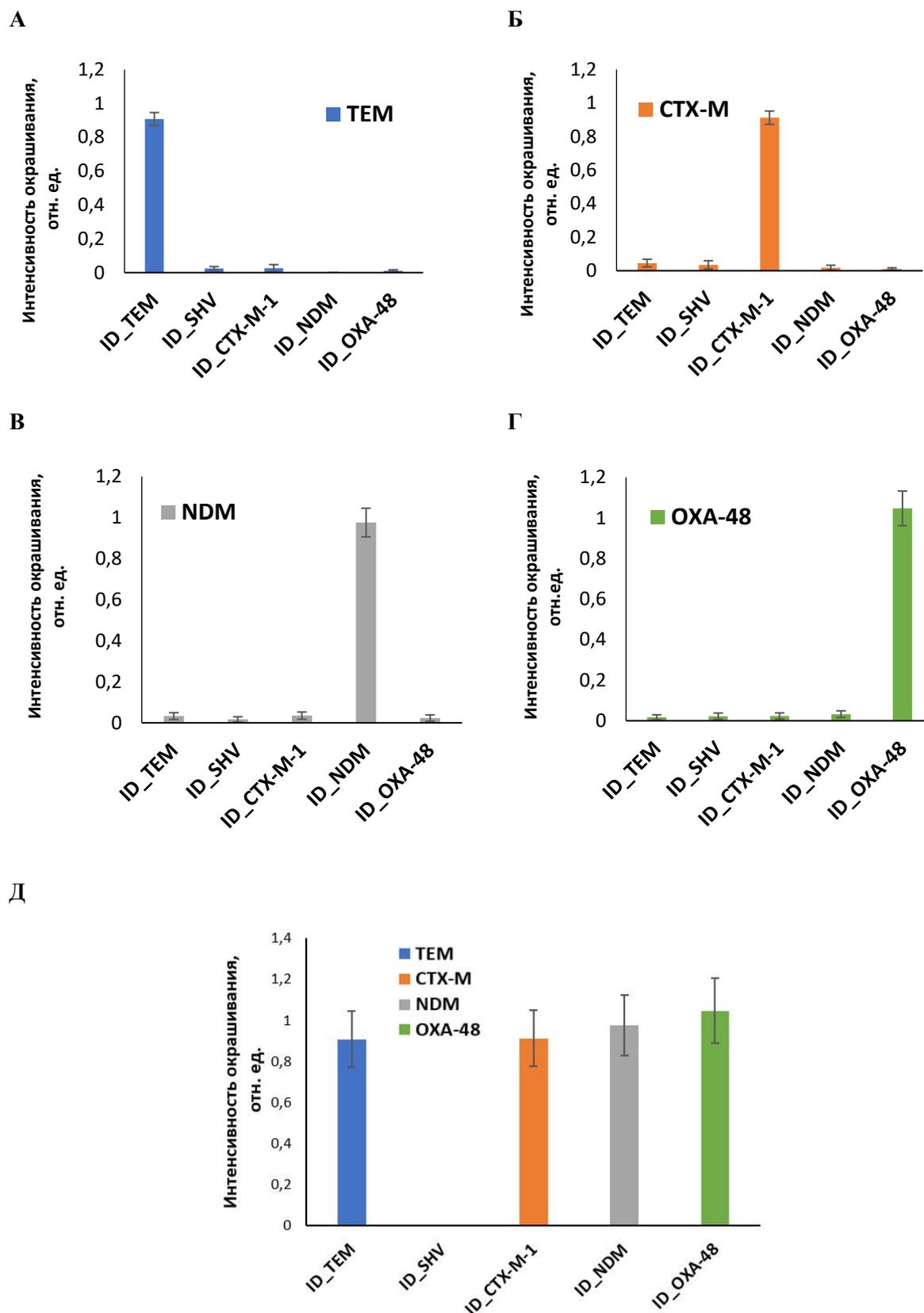


Рис. 25. Относительная интенсивность окрасивания зон одного биочипа после гибридизации ДНК-мишеней (400 нг в лунке), амплифицированных из образцов ДНК клеток *E.coli*-продуцентов рекомбинантных БЛ TEM-1, CTX-M-15, NDM-1, OXA-48, с олигонуклеотидными зондами разной специфичности. А-Г – гибридизация ДНК-мишени одной специфичности, Д – одновременная гибридизация смеси 4х генов БЛ разных типов.

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. Высокая специфичность выбранных олигонуклеотидных зондов позволяет использовать их в технологии биочипов для одновременного определения нескольких типов генов БЛ в одном анализе.

Поскольку все изучаемые в данной работе типы БЛ являются семействами, объединяющими по несколько десятков и даже сотен ферментов с разной степенью гомологии, представляло интерес изучение специфичности определения генов разных БЛ, относящихся к одному типу. Данное исследование проведено с использованием нескольких вариантов БЛ ТЕМ и СТХ-М-1 типов.

В качестве примеров генов БЛ ТЕМ-типа использовали гены БЛ ТЕМ-2, -12, -18, -129, -160, различающиеся единичными аминокислотными заменами. Из них варианты -12, -18, -129 и -160 являются БЛРС и содержат замены ключевых аминокислот, приводящие к расширению спектра субстратной специфичности и устойчивости к ингибиторам БЛ. Гены этих БЛ амплифицировали из образцов ДНК лабораторных штаммов *E.coli* – продуцентов соответствующих вариантов рекомбинантных БЛ.

В качестве примеров генов БЛ субкластера СТХ-М-1 использовали гены ферментов СТХ-М-3, -15, -116. Их амплифицировали из образцов ДНК штамма *E.coli* – продуцента рекомбинантной БЛ СТХ-М-116 и клинических штаммов – носителей генов данных БЛ. Для контроля специфичности зонда СТХ-М-1 субкластера использовали ген БЛ СТХ-М-9, относящийся к другому генетическому субкластеру ферментов этого же типа. Биочипы для данного этапа работы включали выбранные специфичные зонды для генов четырех типов БЛ, зонды для генов БЛ SHV-типов и СТХ-М-9 субкластера и контрольные зонды. Последовательности данных зондов были выбраны ранее в нашей лаборатории [203].

Для всех исследованных ДНК-мишеней ТЕМ и СТХ-М-1 типов была показана высокая специфичность их определения (Рис. 26). Окрашивание зон биочипа со специфичным зондом ID-ТЕМ характеризовалось высокой интенсивностью, при этом интенсивность окрашивания зон с зондами другой специфичности, в том числе с зондами наиболее структурно близких БЛ класса А (SHV- и СТХ-М- типов), была низкой. Необходимо отметить хорошую сходимость значений интенсивностей окрашивания при гибридизации образцов ДНК разных вариантов БЛ ТЕМ-типа (разброс значений не превышал 11 %). Это позволяет использовать выбранный олигонуклеотидный зонд для определения генов всех БЛ данного типа. Нужно отметить, что выбранные зонды не позволяют различать точечные мутации в генах, такой задачи в рамках данной работы не

ставилось. Значения интенсивностей окрашивания зон биочипа при гибридизации ДНК-мишеней БЛ субкластера СТХ-М-1 также характеризовались высокими значениями, перекрестной гибридизации с зондами для генов других типов БЛ и других субкластеров этого же типа (СТХ-М-9) не наблюдали.

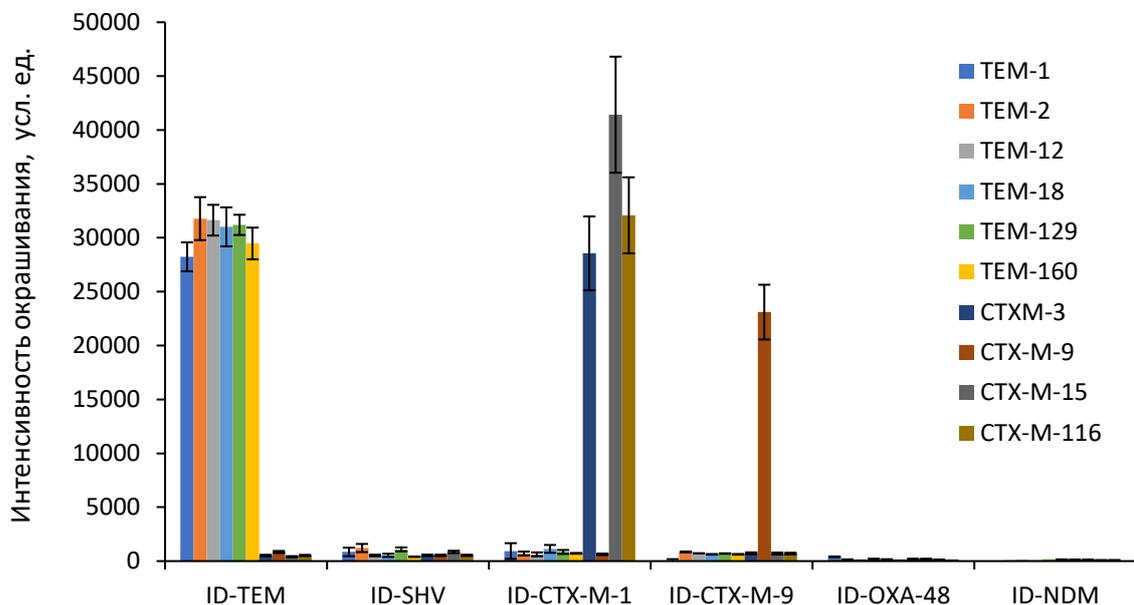


Рис. 26. Интенсивность окрашивания зон биочипа со специфичными олигонуклеотидными зондами после гибридизации ДНК-мишеней (400 нг в лунке), соответствующих БЛ разных типов: TEM-тип (TEM-1, -2, -12, -18, -129, -160), субкластер СТХ-М-1 (СТХ-М-3, -15, -116), субкластер СТХ-М-9 (СТХ-М-9).

6.2 Оптимизация условий колориметрической детекции на биочипах для выявления меченых биотином дуплексов ДНК

Следующей задачей работы являлась оптимизация условий детекции меченных биотином дуплексов ДНК на поверхности полистирола для снижения предела обнаружения и расширения диапазона определяемых концентраций нуклеиновых кислот. Для этого использовали два способа детекции: колориметрическую детекцию на основе пероксидазы хрена и цифровую детекцию НЧ золота с использованием СЭМ.

Колориметрическая детекция биотина в дуплексах ДНК основана на его выявлении конъюгатом Стр-Пх и последующей детекции пероксидазы с использованием субстратов 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и пероксида водорода в присутствии декстран сульфата. В результате ферментативной реакции на поверхности носителя адсорбируется продукт окисления синего цвета (Рис. 9). При использовании избытка субстратов ТМБ и пероксида водорода зоны биочипа окрашиваются пропорционально концентрации пероксидазы и, соответственно, концентрации биотина в дуплексах. Биочипы сканируют на оптическом сканере высокого разрешения, получают цифровые изображения и определяют интенсивности окрашивания каждой зоны. Состав субстратной смеси для колориметрической детекции пероксидазы на носителях был оптимизирован в нашей лаборатории ранее [203]. В задачи работы входила оптимизация концентрации конъюгата Стр-Пх и метода обработки цифровых изображений колориметрических биочипов.

6.2.1 Оптимизация концентрации конъюгата стрептавидин-пероксидаза

Оптимизацию концентрации конъюгата Стр-Пх проводили с использованием контрольных зондов ПКГ и ОКГ, каждый из которых был нанесен в лунку в 18 повторах в виде матрицы 6×6. Результаты гибридизации модельной ДНК-мишени с зондом комплементарной структуры представлены на Рис. 27. Значение интенсивности окрашивания возрастало при увеличении концентрации конъюгата (ее определяли по концентрации стрептавидина) и достигали максимальных значений 30000 - 33000 усл. ед. при концентрации стрептавидина выше 1 мкг/мл. Таким образом, данная концентрация конъюгата, соответствующая концентрации стрептавидина 1 мкг/мл, достаточна для связывания со всеми стерически доступными молекулами биотина. В дальнейшей работе использовали конъюгат в данной концентрации.

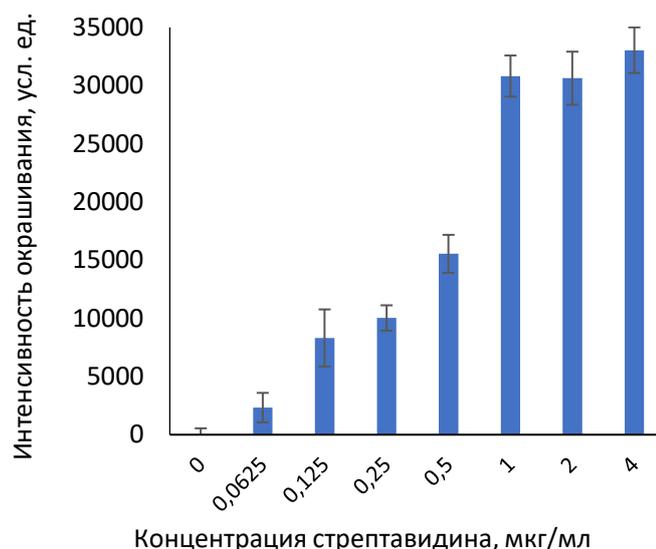


Рис. 27. Интенсивность окрашивания зон биочипа от концентрации стрептавидина в конъюгате Стр-Пх после гибридизации модельной ДНК-мишени ПКГ-Бт (100 пмоль/мкл).

6.2.2 Оптимизация метода обработки цифровых изображений колориметрических биочипов

Для улучшения аналитических характеристик колориметрической детекции проведена оптимизация метода перевода цифровых изображений биочипов в градации серой палитры с использованием разных цветовых моделей (RGB и CMYK). Цифровые изображения биочипов модифицировали: переводили цветное изображение синего цвета в градации серой палитры и затем его инвертировали. На Рис. 28 приведен фрагмент биочипа, являющийся результатом гибридизации зондов ПКГ и ОКГ с модельной ДНК-мишенью ПКГ-Бт. Для выбора метода перевода цифровых изображений в градации серой палитры в каждой цветовой модели использовали несколько математических методов: градации серого, обесцвечивание и выбор цветового канала, для которого исследовали три варианта, соответствующие каждому из трех основных цветовых каналов, формулы расчета интенсивностей в каждом из методов приведены в Таблице 5. Для цветного изображения биочипа координаты цветовых каналов в каждом пикселе пересчитывали по соответствующим формулам с использованием коэффициентов, автоматически заданных программой Adobe Photoshop CS3.

Различные методы перевода цифровых цветных изображений в градации серой палитры применяли для количественного определения модельной ДНК-мишени ПКГ-Бт методом гибридизационного анализа на биочипах. Гибридизацию проводили с контрольными олигонуклеотидными зондами ПКГ и ОКГ, каждый из которых наносили на биочип в 18 повторах. Для характеристики результатов определяли среднее значение

пикселей в каждой зоне и воспроизводимость определения значений координат основных цветовых каналов (Таблица 11). Размеры зон биочипа и значений координат пикселей внутри одной зоны характеризовались хорошей сходимостью. Наиболее высокой воспроизводимостью характеризовались значения координат пикселей для синего канала цветовой модели RGB и голубого канала цветовой модели CMYK. Для пурпурного канала цветовой модели CMYK, красного и зеленого каналов цветовой модели RGB воспроизводимость была хуже, однако разброс значений не превышал 10 %. Для желтого канала цветовой модели CMYK данные не были получены, т.к. пятна синего цвета при использовании данного метода перевода цифрового изображения не отличались от фоновое сигнала.

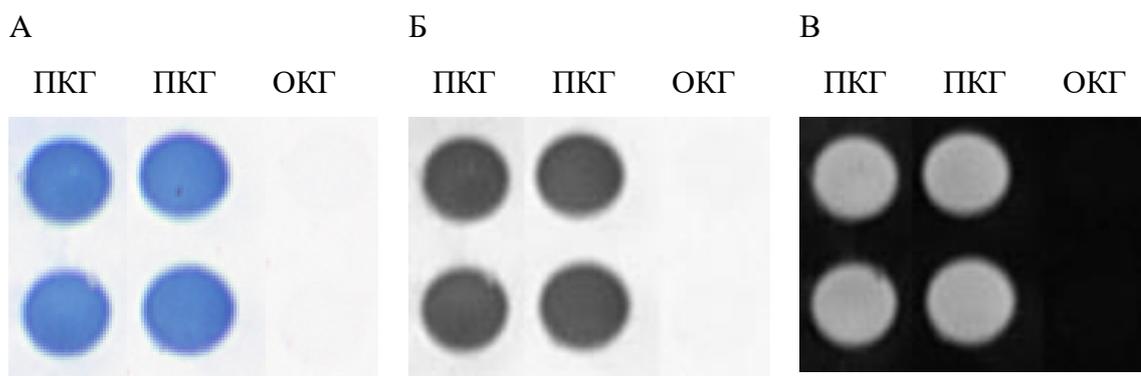


Рис. 28. Принцип обработки цифрового изображения колориметрического биочипа с детекцией на основе пероксидазы хрена: А) исходное цветное цифровое изображение, Б) цифровое изображение в градациях серой палитры, В) инверсия цифрового изображения. Представлен фрагмент биочипа с результатами гибридизации контрольных зондов ПКГ и ОКГ с модельной ДНК-мишенью ПКГ-Бт.

Таблица 11. Характеристика цветного изображения зоны биочипа.

| | |
|--|----------------------|
| Размер пикселя, мм | $5,3 \times 10^{-3}$ |
| Средний диаметр пятна биочипа, пиксели | 60 ± 4 |
| Среднее количество пикселей в пятне биочипа, пиксели | 2900 ± 360 |
| Относительное стандартное отклонение значений координат пикселей внутри одной зоны биочипа в модели RGB | |
| R (Красный) | 8,3 % |
| G (Зеленый) | 8,8% |
| B (Синий) | 5,3% |
| Относительное стандартное отклонение значений координат пикселей внутри одной зоны биочипа в модели CMYK | |
| C (Голубой) | 5,7% |
| M (Пурпурный) | 10,3% |

Градуировочные кривые для определения концентрации модельной ДНК-мишени ПКГ-Бт, полученные с использованием разных методов обработки цифровых изображений, представлены на Рис.29. На всем диапазоне исследованных концентраций значения интенсивностей, полученные с использованием метода перевода на основе использования красного канала цветовой модели RGB, превышали значения, полученные другими методами перевода. Аналитические характеристики градуировочных кривых (предел обнаружения, коэффициент чувствительности и динамический диапазон) приведены в Таблице 12. Использование красного канала цветовой модели RGB для перевода цветных изображений в градации серой палитры позволило снизить предел обнаружения в 4 раза и увеличить коэффициент чувствительности в 1,5 раза. Динамический диапазон значений интенсивности для выбранного метода составил 41680 усл.ед., что на 22% больше, чем при использовании метода «RGB / Градации серого», обычно используемого в методе колориметрических ДНК-биочипов.

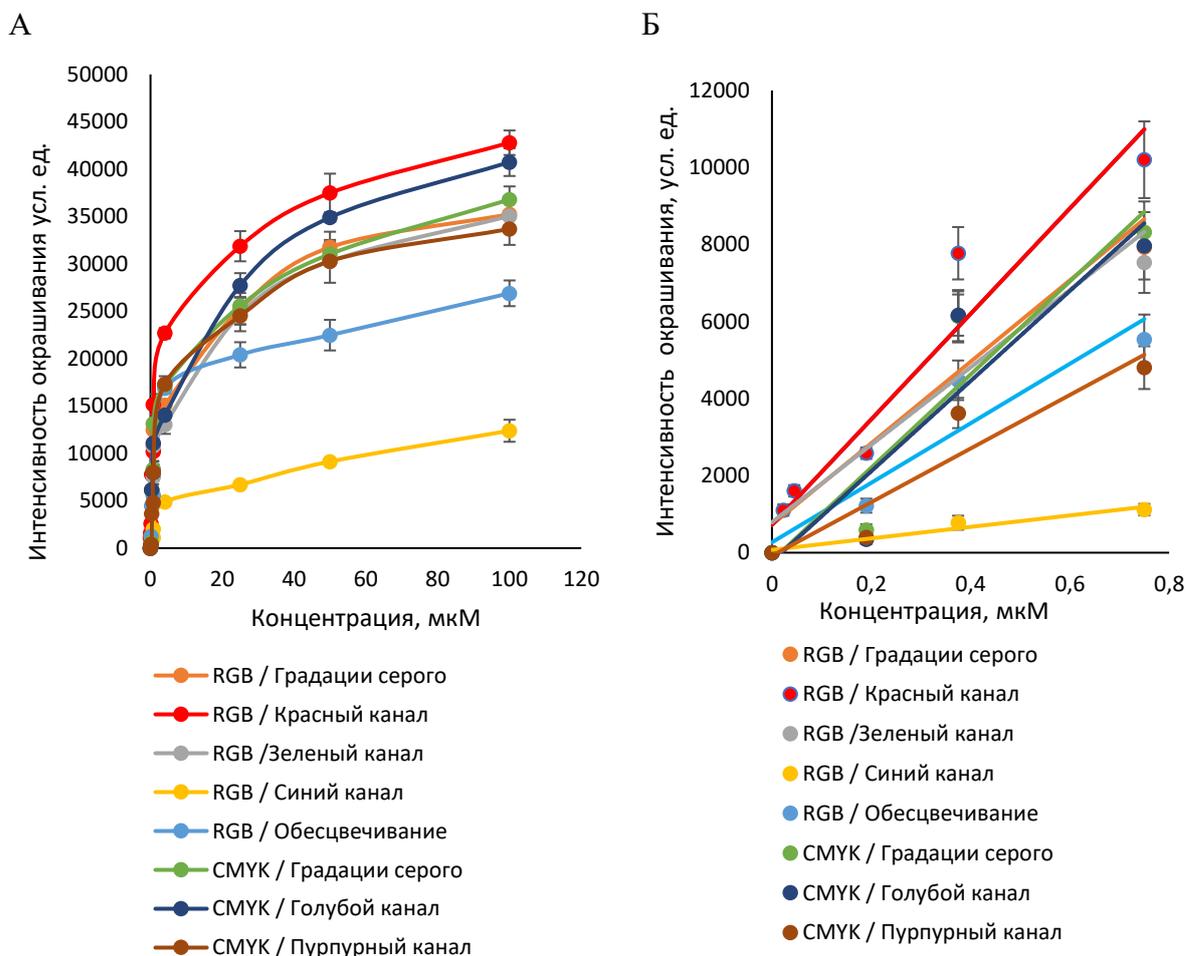


Рис.29. Градуировочные кривые для определения концентрации модельной ДНК-мишени ПКГ-Бт на биочипах. Цифровые изображения биочипов обработаны различными методами (А), увеличенный фрагмент начальных участков градуировочных кривых (Б).

Таблица 12. Аналитические характеристики метода гибридного анализа на биочипах с использованием различных методов обработки цифровых цветных изображений.

| Метод перевода цифрового изображения в черно-белое Цветовая модель/ Метод | ПО*, нМ | КЧ**, усл.ед ×мкл/ пмоль | Динамический диапазон интенсивностей окрашивания, усл.ед. |
|--|---------------|-----------------------------|---|
| RGB / Градации серого | 40 ± 5 | 1060 ± 85 | 1146 - 35244 |
| RGB / Красный канал | 10 ± 2 | 1400 ± 120 | 1106 - 42790 |
| RGB / Зеленый канал | 50 ± 7 | 1005 ± 75 | 6139 - 35052 |
| RGB / Синий канал | 340 ± 30 | 150 ± 15 | 1778 - 12386 |
| RGB / Обесцвечивание | 120 ± 15 | 775 ± 55 | 1220- 26899 |
| СМΥК / Градации серого | 200 ± 20 | 1200 ± 95 | 1592 - 36786 |
| СМΥК / Голубой канал | 210 ± 30 | 1170 ± 60 | 1349 - 40741 |
| СМΥК / Пурпурный канал | 220 ± 20 | 700 ± 60 | 1399 - 33688 |

* - ПО (предел обнаружения)

** - КЧ (коэффициент чувствительности)

6.3 Сравнение методов детекции биотина для количественного определения биотинилированных ДНК-мишеней

Мы провели сравнение двух методов определения биотина в дуплексах ДНК на поверхности биочипов с использованием в качестве модельных гены БЛ ТЕМ- и СТХ-М-типов. Эти методы включали: 1) колориметрическую детекцию с использованием пероксидазы хрена на биочипах в лунках, описанную выше, и 2) цифровую детекцию биотина с использованием конъюгата стрептавидина с НЧ золота (Стр-НЧ) и их подсчетом методом СЭМ на поверхности биочипов из кремния. Схема второго метода приведена на рис. 30, принцип выявления ДНК-мишени аналогичен методу колориметрических биочипов, специфичные ДНК-дуплексы на поверхности выявляются с использованием конъюгата Стр-НЧ, затем проводится подсчет плотности частиц в нескольких участках каждой зоны методом СЭМ. В нашей лаборатории была оптимизирована методика данного вида анализа, который характеризовался более высокой чувствительностью по сравнению с колориметрической детекцией при определении короткой модельной ДНК-мишени из 19 оснований. В рамках данной работы мы применили ее для определения генов БЛ ТЕМ- и СТХ-М-типов.



Рис. 30. Схема метода цифровой количественной оценки нуклеиновых кислот путем подсчета наночастиц золота на кремниевых микрочипах.

Градуировочные кривые определения генов БЛ ТЕМ- и СТХ-М с использованием двух методов детекции приведены на Рис. 31. На начальных участках кривых значение регистрируемого сигнала линейно зависело от концентрации ДНК-мишени. Определение пределов обнаружения для каждой ДНК-мишени показало, что для гена БЛ СТХ-М типа цифровая детекция подсчетом НЧ характеризуется более низким пределом обнаружения (0,5 пМ) по сравнению с пределом обнаружения методом колориметрической детекции (3,0 пМ). В то же время определение генов БЛ ТЕМ типа, наоборот, характеризовалось более низким пределом обнаружения для колориметрической детекции (4,0 пМ) по сравнению с пределом обнаружения для цифровой детекции (16 пМ). При сравнении градуировочных кривых, полученных двумя разными методами, видно, что диапазоны определяемых концентраций разных генов сравнимы при использовании колориметрической детекции и сильно различаются при использовании кремниевых биочипов на кремнии и цифровой детекции. По-видимому, это связано с неблагоприятной ориентацией олигонуклеотидных зондов для определения генов БЛ ТЕМ типа на кремнии. Поэтому для одновременного мультиплексного определения генов разных типов БЛ была выбрана методика выявления биотина на основе использования конъюгата Стр-Пх с колориметрической детекцией фермента.

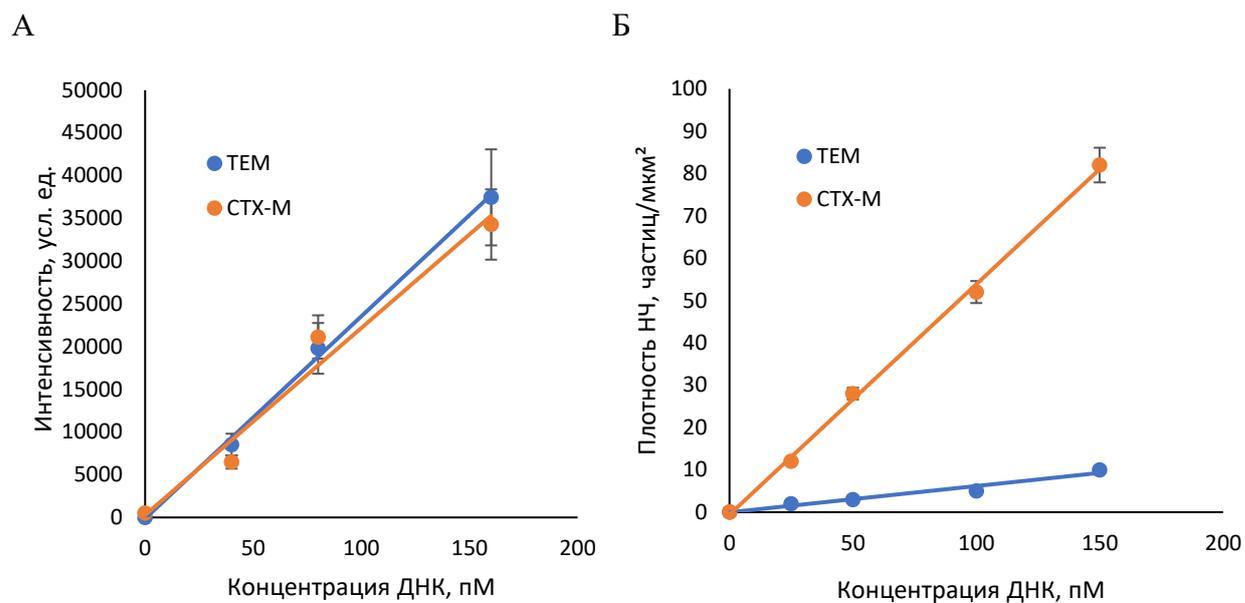


Рис. 31. Градуировочные кривые определения ДНК БЛ ТЕМ- и СТХ-М-типов методом гибридизационного анализа на биочипах с колориметрической детекцией (А) и цифровой детекцией (подсчет плотности наночастиц золота методом СЭМ) (Б).

Глава 7. Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз методом гибридизационного анализа на биочипах с использованием стандартных образцов

7.1 Дизайн биочипа

Для мультиплексного определения специфичных мРНК генов БЛ разработали дизайн биочипа, расположенного в лунке 96-луночного полистиролового планшета (Рис. 32). 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 х 6, имеет размер 3 х 3 мм (внутренний диаметр лунки - 8 мм). Диаметр каждой зоны составляет 0,3 мм, расстояние между их центрами – 0,5 мм.



Рис. 32. 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.

7.2 Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз методом гибридационного 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 гибридовали на биочипах, расположенных в лунках 96-луночных планшетов. Гибридационная 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. 33).

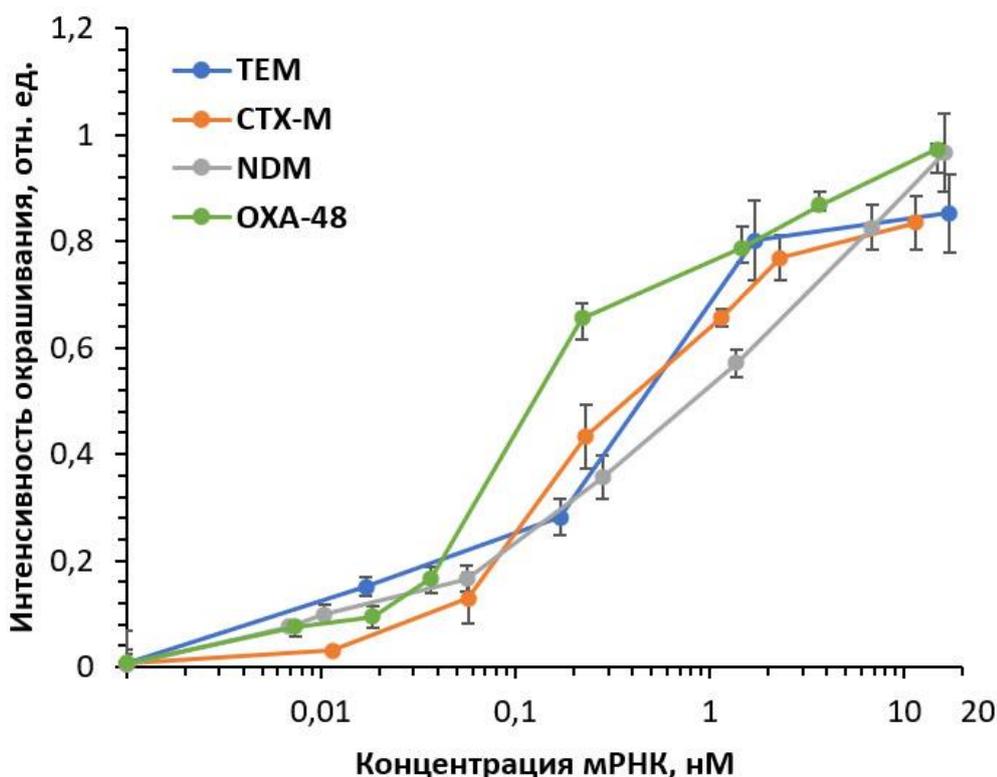


Рис. 33. Градуировочные кривые интенсивности окрашивания специфичных зон биочипа от концентрации стандартных образцов мРНК генов БЛ четырех типов.

Пределы обнаружения мРНК всех типов составили: 7 ± 1 пМ (TEM-1), $5 \pm 0,7$ пМ (CTX-M-116), $6,0 \pm 0,9$ пМ (NDM-1), 7 ± 1 пМ (OXA-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. 33), что важно для их одновременного определения.

Далее провели определение специфичных мРНК гена БЛ TEM-1 в бактериальных клетках штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной БЛ. Было приготовлено четыре образца с разной концентрацией клеток (от 6×10^6 КОЕ/мл до 5×10^7 КОЕ/мл), из них выделяли фракции общей РНК и далее определяли концентрации мРНК гена БЛ TEM-1 (Рис. 34 А). Для контроля экспрессии БЛ из таких же образцов клеток данного штамма выделяли периплазматические фракции и в них определяли ферментативную активность БЛ TEM-1 в реакции гидролиза ампициллина (Рис. 34 Б). Сравнение полученных результатов показывает, что наблюдается хорошая корреляция концентраций специфичной мРНК гена TEM-1 с ферментативной активностью БЛ в периплазматических фракциях бактерий.

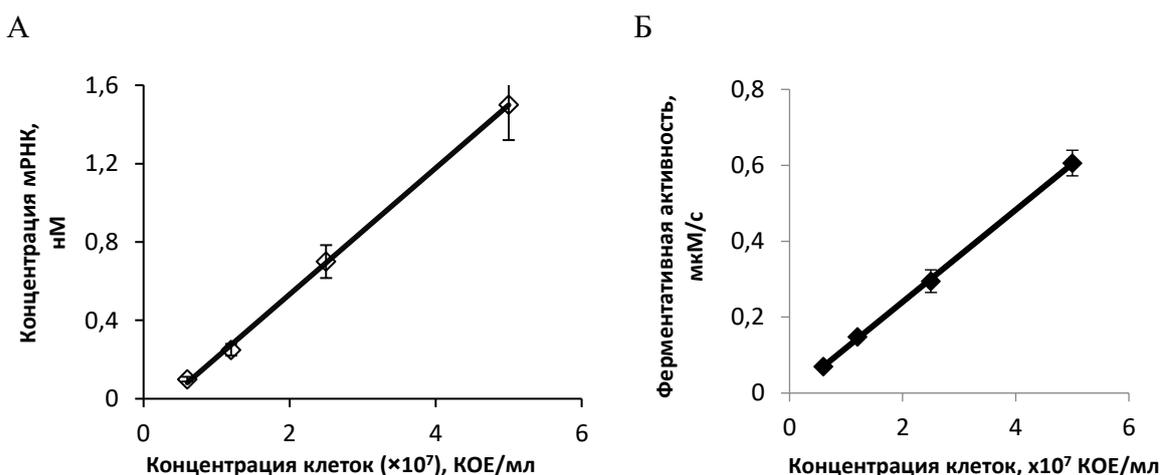


Рис. 34 А) Определение концентрации мРНК гена TEM-1 в образцах клеток штамма *E.coli* – продуцента рекомбинантной БЛ;

Б) Определение ферментативной активности БЛ TEM-1 в реакции гидролиза ампициллина в периплазматических фракциях клеток штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной БЛ.

7.3 Определение мРНК генов бета-лактамаз в смесях стандартных образцов

Далее провели одновременное определение мРНК четырех типов в 12 образцах искусственно приготовленных из стандартных образцов смесей мРНК генов БЛ в разных концентрациях и сочетаниях. Смеси содержали в себе от 1 до 4 типов стандартных образцов мРНК БЛ. Концентрации мРНК определяли по градуировочным кривым, полученным с использованием стандартных образцов. Результаты определения концентраций мРНК представлены в Таблице 13. Отсутствие неспецифичной гибридизации характеризует высокую селективность определения. Анализ результатов проводили методом «введено-найденно», во всех смесях концентрация мРНК была определена правильно, процент открытия находился в диапазоне от 70 до 130%. Для БЛ ТЕМ-1 и СТХ-М-116 обнаружение концентрации выше 1 нМ было затруднено из-за достижения плато значений интенсивностей окрашивания градуировочной кривой. Для анализа таких образцов требуется разведение. Для остальных концентраций мРНК значения определены с высокой точностью. Разработанный метод позволяет определять концентрации мРНК разных типов в разных соотношениях с достаточно высокой точностью, что подходит для определения мРНК в транскриптах мультирезистентных штаммов.

Таблица 13. Определение концентрации мРНК бета-лактамаз четырех типов в мультиплексном гибридном анализе на биочипах.

| № | Введено, нМ | Найдено, нМ | Процент открытия, % |
|----|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|---------------------------|
| | TEM | | | CTX-M | | | NDM | | | OXA-48 | | |
| 1 | 10 | >1 | | | | | | | | | | |
| 2 | 10 | >1 | | 10 | >1 | | 10 | 13 | 130% | 10 | 12 | 120% |
| 3 | 10 | >1 | | | | | | | | 0,1 | 0,07 | 70% |
| 4 | 0,1 | 0,13 | 130% | 0,1 | 0,08 | 80% | | | | | | |
| 5 | | | | 10 | >1 | | 10 | 12 | 120% | 10 | 10 | 100% |
| 6 | | | | 0,1 | 0,13 | 130% | 10 | 12 | 120% | 0,1 | 0,075 | 75% |
| 7 | | | | | | | 10 | 12 | 120% | | | |
| 8 | | | | | | | 10 | 12 | 120% | 10 | 8 | 80% |
| 9 | | | | | | | 1 | 0,70 | 70% | 1 | 0,7 | 70% |
| 10 | | | | | | | 0,1 | 0,13 | 130% | 0,1 | 0,1 | 100% |
| 11 | | | | | | | | | | 10 | 8 | 80% |
| 12 | | | | | | | | | | 0,1 | 0,07 | 70% |

Сравнение аналитических характеристик разработанного нами метода с описанными ранее методами определения специфичных РНК приведено в Таблице 14. В литературе отсутствуют данные о методах определения концентраций протяженных последовательностей РНК, поэтому сравнение проведено с методами определения коротких образцов РНК (микроРНК и короткие фрагменты РНК вирусов, длиной не более 80 оснований). По чувствительности определения предложенный нами метод уступает методу ПЦР РВ и сравним с методами определения микроРНК, основанными на технологии CRISPR-Cas12a и изотермической амплификации с каталитической сборкой шпилек [223, 224, 225]. Метод ПЦР РВ для определения РНК основан на использовании ОТ и последующей амплификации относительно коротких фрагментов генов (не более 200 оснований), во время которой детектируется флуоресцентная метка (SYBER Green), вводимая в ходе реакции, интенсивность флуоресценции которой пропорционально увеличивается вслед за накоплением ампликона. Технология CRISPR-Cas12a основана на двухстадийной гибридизации с последующим направленным расщеплением нуклеотидных последовательностей нуклеазами, в результате чего высвобождается фрагмент олигонуклеотида с сахарозой в качестве метки, которую детектируют с использованием портативного глюкометра. В методе каталитической сборки шпилек используется гибридизация с определенными нуклеотидными последовательностями, что приводит к разворачиванию шпильки и связыванию РНК-мишени с образованием G-квадруплекса с меткой - геминном. Для определения гемина использовали колориметрическую детекцию.

Представляет интерес сравнение разработанной нами технологии количественного определения специфичных мРНК на биочипах с методом ПЦР-РВ, который уже активно применяется на практике, в том числе для анализа экспрессирующихся генов БЛ.

Сходство двух методов состоит в использовании последовательных реакций ОТ и амплификации. В методе ПЦР РВ детекция происходит в процессе стадии амплификации. В разработанной нами методике используется дополнительная стадия гибридизации на биочипах, после которой проводится детекция продуктов на носителе. Поэтому продолжительность гибридизационного анализа составляет около 7 ч, в то время как время анализа ПЦР РВ составляет около 4 часов.

Главной отличительной особенностью разработанного нами метода является его мультиплексность. В данной работе продемонстрирована высокая селективность анализа при одновременном определении четырех типов мРНК разной специфичности, в то время как в количественных методах ПЦР РВ определяется, как правило, один тип мишени.

Таблица. 14. Аналитические характеристики различных методов количественного определения РНК.

| Метод определения РНК | Размер РНК, нуклеотиды | Объект | Предел обнаружения | Ссылка |
|---|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Гибридизационный анализ на биочипах | 876 | мРНК БЛ ТЕМ-1 | 7 пМ | Данная работа |
| | 875 | мРНК БЛ СТХ-М-116 | 5 пМ | |
| | 812 | мРНК БЛ NDM-1 | 6 пМ | |
| | 798 | мРНК БЛ ОХА-48 | 7 пМ | |
| Технология CRISPR-Cas12a с дуплекспецифичной нуклеазой для определения микроРНК | 20 | miRNA21 | 2,4 пМ | [223] |
| | 21 | miRNA205 | 1,1 пМ | |
| Метод каталитической сборки шпилек | 22 | miRNA21 | 0,2 пМ | [224] |
| ПЦР в режиме реального времени | 76 | SARS-CoV-2 ген E (оболочка) | 10 ² копий/мкл (17 фМ) | [225] |

Количество одновременно детектируемых типов мРНК на одном биочипе может быть увеличено до 10. Для дальнейшего увеличения мультиплексности можно размещать биочипы с разным набором зондов в разные лунки планшета. Мультиплексность метода ПЦР РВ ограничена количеством одновременно детектируемых достоверно различимых флуорофоров, как правило, не превышающим четырех.

Другой особенностью разработанного метода является использование стандартных образцов мРНК, соответствующих полноразмерным генам БЛ (около 800 оснований). Эти образцы проходят все стадии анализа вместе с тестируемыми образцами, поэтому для количественного определения мРНК не требуется определения эффективности отдельных стадий ОТ и ПЦР, поскольку их влияние на исследуемый образец и стандарт одинаковое [226]. В ПЦР РВ для количественной обработки результатов методом ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) необходим учет эффективности реакций ОТ и ПЦР [191]. Точное определение эффективности этих стадий часто невозможно, так как она зависит от концентрации мРНК, структуры праймеров и выбранных генов [192, 227]. Поэтому в расчетах используется усредненное значение экспоненциальной фазы, что приводит к определенному закруглению значений в областях низких и высоких концентраций нуклеиновых кислот [192].

Предлагаемый нами метод характеризуется высокой воспроизводимостью, поскольку основан на анализе ПЦР-продуктов по конечной точке. Это позволяет избежать проблем метода ПЦР РВ, в котором определяют значение цикла отрыва кривой в области низких концентраций продукта реакции, что приводит к ошибкам и снижает

воспроизводимость метода [192]. Недостаточная воспроизводимость метода ПЦР РВ приводит к трудности определения незначительных изменений транскрипции мРНК изучаемого гена. Поэтому значимыми для данного метода являются не менее чем двукратные изменения экспрессии гена. В методах ПЦР РВ «нового поколения» (цифровая ПЦР) эта проблема решается усреднением результатов большого количества параллельно протекающих реакций в микролунках [228].

Размещение биочипов в лунках 96-луночных планшетов и одновременное тестирование стандартных и исследуемых образцов на одном планшете позволяет существенно повысить воспроизводимость результатов анализа и увеличить производительность метода.

Использование разработанного подхода к количественному определению нуклеиновых кислот с использованием набора стандартных образцов позволяет перейти от полуколичественного анализа транскриптов генов, к количественному, что необходимо при изучении молекулярных механизмов индукции генов антибиотикорезистентности у бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Глава 8. Анализ влияния бета-лактамов на транскрипцию генов бета-лактамаз у клинических штаммов *Enterobacteriaceae* с разной устойчивостью к АБП

8.1 Выбор бактериальных штаммов и условий их культивирования

Для исследования влияния АБП на экспрессию генов БЛ у мультирезистентных к антибиотикам бактерий использовали штаммы бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с разным уровнем чувствительности к АБП. Данная часть работы выполнялась в сотрудничестве с Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Для исследования были выбраны шесть штаммов из коллекции научного центра, выделенные из клинического биологического материала от пациентов лечебных учреждений г. Москвы (моча, аспират). В Таблице 15 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. Два штамма (*E.coli* В-1350/18 и *K. pneumoniae* В-1088/17) характеризовались устойчивостью только к одной группе бета-лактамов – пенициллинам (далее они будут называться монорезистентные), три штамма (*K. pneumoniae* В-1639/16, *K. pneumoniae* В-1781/16 и *K. pneumoniae* В-2125/17) были мультирезистентными и характеризовались устойчивостью ко всем группам бета-лактамов, контрольный штамм *E.coli* В-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 15).

8.2 Рост клинических штаммов в присутствии АБП

Клинические штаммы культивировали в присутствии бета-лактамовых АБП и в их отсутствие. В качестве представителей АБП выбрали по одному представителю каждой группы бета-лактамов: ампициллин (группа пенициллинов), цефтазидим (цефалоспорин 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, находились 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 (Таблица 16). 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 (Таблица 16).

Таблица 15. Характеристика клинических штаммов семейства Enterobacteriaceae, использованных в работе.

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

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

Устойчивость штамма к АБП выделена красным цветом, чувствительность штамма к АБП выделена зеленым цветом.

При культивировании в присутствии ампициллина: у одного монорезистентного штамма *K. pneumoniae* В-1088 наблюдали существенное подавление роста даже низкими концентрациями АБП, у второго монорезистентного штамма *E. coli* В-1350 также наблюдали подавление роста клеток при увеличении концентрации АБП, но оно происходило медленнее; у мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* В-1639 наблюдали подавление роста клеток, пропорциональное увеличению концентрации АБП; у мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* В-1781 и *K. pneumoniae* В-2125 рост клеток не зависел от концентрации ампициллина в диапазоне исследованных концентраций.

При культивировании в присутствии цефтазидима: у мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* В-1639 и *K. pneumoniae* В-2125 наблюдали подавление роста клеток, пропорциональное увеличению концентрации АБП; у мультирезистентного штамма

K. pneumoniae В-1781 рост клеток не зависел от концентрации цефтазида в диапазоне исследованных концентраций.

При культивировании в присутствии меропенема наблюдали существенное снижение роста всех мультирезистентных штаммов даже при низких концентрациях АБП. Данный результат соответствует ранее опубликованным данным о быстрой гибели клеток *K. pneumoniae* в присутствии меропенема: 98 % клеток погибало в течение 6 ч при культивировании в присутствии меропенема в концентрации 10 мг/л [229].

При культивировании в присутствии азтреонама количество выросших клеток отличалось для трех мультирезистентных штаммов: рост *K. pneumoniae* В-1639 подавлялся низкими концентрациями АБП; рост штаммов *K. pneumoniae* В-1781 и *K. pneumoniae* В-2125 снижался до промежуточной концентрации клеток, далее не зависел от концентрации АБП и подавлялся только высокими концентрациями, превышающими значение МПК.

Анализ полученных результатов показал определенное расхождение данных о количестве клеток, выросших в жидкой питательной среде в присутствии АБП за 4 часа со значениями МПК, определенными диско-диффузионным методом: не наблюдали рост штамма *K. pneumoniae* В-1088/17 в присутствии ампициллина выше 8 мг/л, штамма *K. pneumoniae* В-1639/16 - в присутствии цефтазида в концентрации 250 мг/л, и мультирезистентных штаммов - в присутствии концентраций меропенема выше 10 мг/л, несмотря на более высокие значения МПК соответствующих АБП (Таблица 15). Данное несоответствие может быть связано с различающимися концентрациями клеток и временем культивирования при определении МПК (длительное культивирование в течение 18-20 ч) и наращивании клеток в жидкой питательной среде (культивирование в течение 4 ч). Известно, что скорость роста бактерий в присутствии высоких концентраций АБП существенно снижается [99, 104].

При культивировании клеток в присутствии субингибирующих концентраций меропенема наблюдали изменение их морфологии: клетки переходили в «мукоидное» состояние, что сопровождалось повышенным образованием слизи. По-видимому, это может свидетельствовать об одновременной активации меропенемом в субингибирующих концентрациях разных механизмов резистентности: не только продукции бета-лактамаз, но и продукции капсульных полисахаридов.

Таблица 16. Количество клеток, выросшее при культивировании клинических штаммов в течение 4 часов в присутствии различных концентраций бета-лактамов.

| Вид | Штамм | Без АБП | Ампициллин | | | Цефтазидим | | | | Меропенем | | | | Азтреонам | | | | |
|----------------------|-------------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|
| | | | Концентрация антибактериального препарата, мг/л | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 8 мг/л | 100 мг/л | 250 мг/л | 5 мг/л | 20 мг/л | 60 мг/л | 250 мг/л | 5 мг/л | 10 мг/л | 30 мг/л | 120 мг/л | 5 мг/л | 60 мг/л | 120 мг/л | 250 мг/л | |
| <i>E. coli</i> | В-2607/18 (контроль) | 1×10 ⁹ | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | |
| <i>E. coli</i> | В-1350/18 | 1×10 ⁹ | 8×10 ⁸ | 6×10 ⁸ | 5×10 ⁸ | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | |
| <i>K. pneumoniae</i> | В-1088/17 | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | Нет роста | |
| <i>K. pneumoniae</i> | В-1639/16 | 1×10 ⁹ | 2×10 ⁹ | 3×10 ⁹ | 5×10 ⁷ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 8×10 ⁸ | Нет роста | 6×10 ⁷ | 1×10 ⁷ | Нет роста | Нет роста | 3×10 ⁷ | 3×10 ⁷ | 3×10 ⁷ | 3×10 ⁷ | |
| <i>K. pneumoniae</i> | В-1781/16 | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 5×10 ⁸ | 8×10 ⁸ | Нет роста | Нет роста | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 3×10 ⁸ | 1×10 ⁸ | |
| <i>K. pneumoniae</i> | В-2125/17 | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 1×10 ⁹ | 5×10 ⁸ | 5×10 ⁸ | 1×10 ⁸ | 1×10 ⁸ | Нет роста | Нет роста | 5×10 ⁸ | 3×10 ⁸ | 3×10 ⁸ | 3×10 ⁸ | |

8.3 Определение специфичных мРНК генов бета-лактамаз в транскриптах клинических штаммов *Enterobacteriaceae*

Из образцов культивированных бактериальных штаммов выделяли фракции общей РНК и в них определяли концентрации специфичных 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 образцах (штамм *K. pneumoniae* В-1781, культивированный в присутствии 120 мг/л азтреонама и штамм *K. pneumoniae* В-2125, культивированный в присутствии 250 мг/л азтреонама) не удалось определить концентрацию мРНК генов СТХ-М-15 и ОХА-48 из-за отсутствия продукта амплификации, что могло быть связано с техническими ошибками в процессе проведения анализа.

В образце общей РНК контрольного штамма *E. coli* В-2607/18, культивированного в отсутствие АБП, окрашивание специфичных 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 специфичных мРНК генов БЛ, синтезированных в 10^9 бактериальных клеток, на основании значений концентраций мРНК, определенных по градуировочным кривым, по формуле:

$$n_{\text{кл.мРНК}} = \frac{C_{\text{РНК}} \times V_{\text{РНК}}}{n_{\text{кл}}} \times 10^9 \text{ кл} \quad (5),$$

где $n_{\text{кл.мРНК}}$ - количество специфичных 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.

Рассчитанные значения количеств специфичных мРНК генов БЛ представлены в Таблице 17 и на Рис. 35 в виде гистограмм зависимости количества синтезированных мРНК генов БЛ от концентрации АБП. Анализ полученных данных показывает, что для разных штаммов и типов АБП наблюдаются разнонаправленные эффекты сохранения, увеличения и уменьшения количеств синтезируемых мРНК генов разных БЛ, в зависимости от типа и концентрации бета-лактама в среде культивирования.

Таблица 17. 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> B-1350/18 Моно- | <i>K. pneumoniae</i> B-1088/17 Моно- | <i>K. pneumoniae</i> B-1639/16 Мульти- | <i>K. pneumoniae</i> B-1781/16 Мульти- | | | <i>K. pneumoniae</i> B-2125/17 Мульти- | | |
|---|--|--|--|--|------------|-------|--|----------|------------|
| | Количество мРНК генов БЛ в 1×10^9 клеток, фмоль | | | | | | | | |
| | TEM-1 | TEM-1 | OXA-48 | TEM-1 | CTX-M-15 | NDM-1 | TEM-1 | CTX-M-15 | OXA-48 |
| Без АБП (контроль) | 2,8 | 2,0 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,3 | 2,4 | 0,5 | 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 | 1,2 | 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 цефтазида 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, цефтазида 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 цефтазида, меропенема и азтреонама наблюдали увеличение транскрипции специфичных мРНК при концентрациях АБП, в которых рост клеток был существенно подавлен. Достижение максимальных значений количеств мРНК в этих же штаммах в присутствии ампициллина не наблюдали, по-видимому, из-за использования недостаточно высоких концентраций данного антибиотика.

Анализ полученных данных свидетельствует о разнонаправленном влиянии АБП на транскрипцию мРНК разных БЛ мультирезистентными бактериями. В зависимости от типа антибиотика и его концентрации, наблюдалось увеличение транскрипции разных мРНК генов БЛ. При использовании производных пенициллина и цефалоспорины III поколения в низких концентрациях наиболее часто увеличивалась транскрипция мРНК генов БЛ СТХ-М-типа; при повышении концентрации антибиотика происходило увеличение транскрипции мРНК генов БЛ ОХА-48-типа, иногда в сочетании с увеличением транскрипции мРНК гена СТХ-М-15.

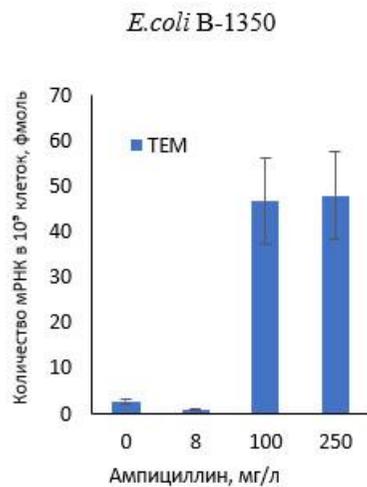
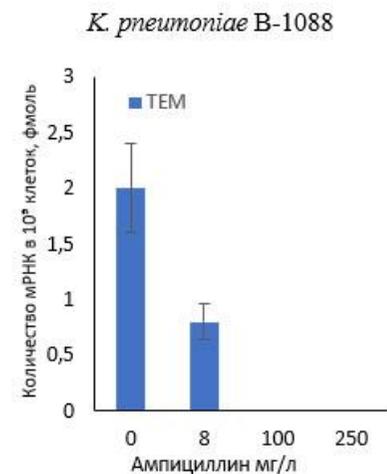
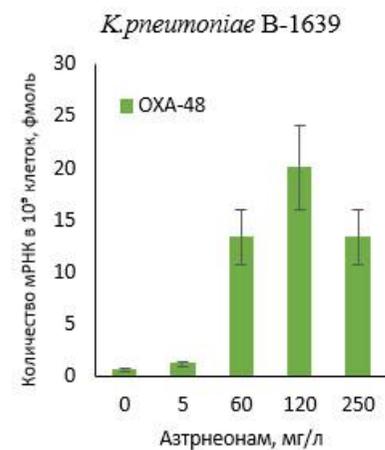
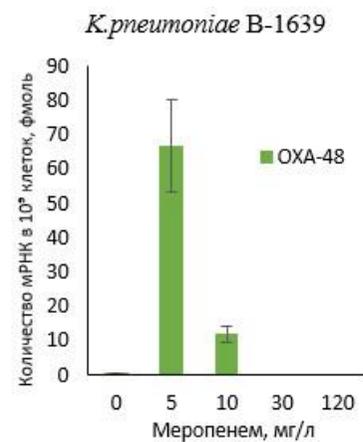
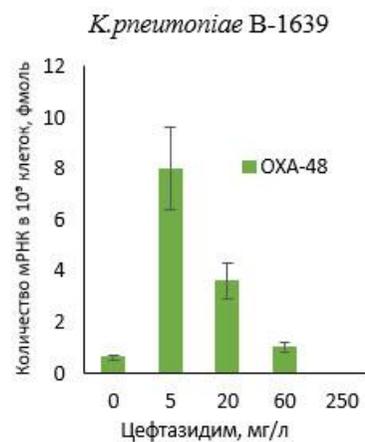
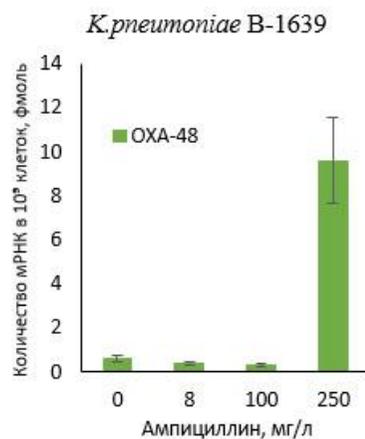
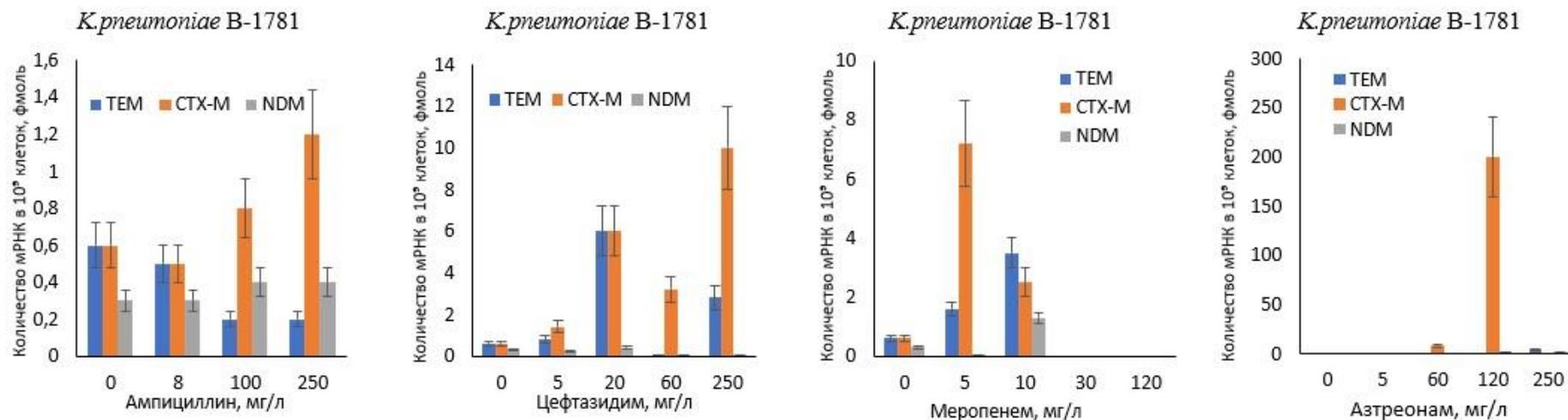
А**Б****В**

Рис. 35. Количество специфических мРНК генов БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-15, ОХА-48 и NDM-1), синтезированных в 1×10^9 клеток клинических штаммов, при культивировании в присутствии бета-лактамовых АБП. А) *E. coli* B-1350; Б) *K. pneumoniae* B-1088; В) *K. pneumoniae* B-1639

Г



Д

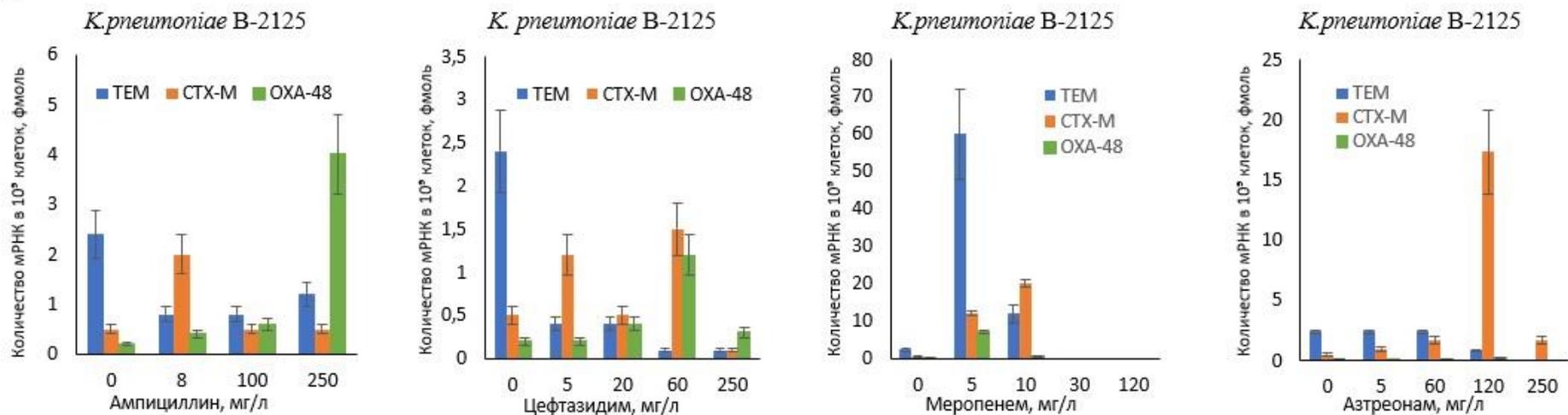


Рис. 35. Количество специфичных мРНК генов БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-15, ОХА-48 и NDM-1), синтезированных в 1×10^9 клеток клинических штаммов, при культивировании в присутствии бета-лактамовых АБП. Г) *K. pneumoniae* B-1781; Д) *K. pneumoniae* B-2125.

При этом транскрипция мРНК генов БЛ TEM-1 и NDM-1, характеризующихся, соответственно, самым узким и широким профилями субстратной специфичности, была подавлена.

При действии азтреонама эффекты зависели от штамма, наиболее часто увеличивалась транскрипция мРНК генов БЛ CTX-M-15 и OXA-48. Транскрипция мРНК гена TEM-1 была подавлена, транскрипция мРНК гена NDM-1 наблюдалась только при высоких концентрациях антибиотика.

Наиболее выраженные эффекты значительного усиления транскрипции мРНК всех имеющихся у бактерий генов бета-лактамаз плазмидной локализации наблюдали при действии меропенема.

Полученные результаты показали возможность использования разработанного нами метода мультиплексного количественного гибридизационного анализа на биочипах для количественного определения специфичных мРНК генов БЛ в транскриптах бактериальных штаммов в широком диапазоне концентраций.

Влияние отдельных групп бета-лактамных АБП на синтез специфичных мРНК генов БЛ разных типов

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 (6):

$$k = \frac{n_{\text{АБП}}}{n_{\text{Без АБП}}} \quad (6),$$

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 18 и на Рис. 36. 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).

Таблица 18. Относительное изменение количества синтезируемых мРНК генов БЛ у клинических штаммов при культивировании в присутствии бета-лактамовых АБП. Зеленый соответствует отсутствию изменений количества мРНК; голубой – снижению; красный – увеличению.

| 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 | TEM-1 | CTX-M-15 | NDM-1 | TEM-1 | CTX-M-15 | ОХА-48 |
| 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 |

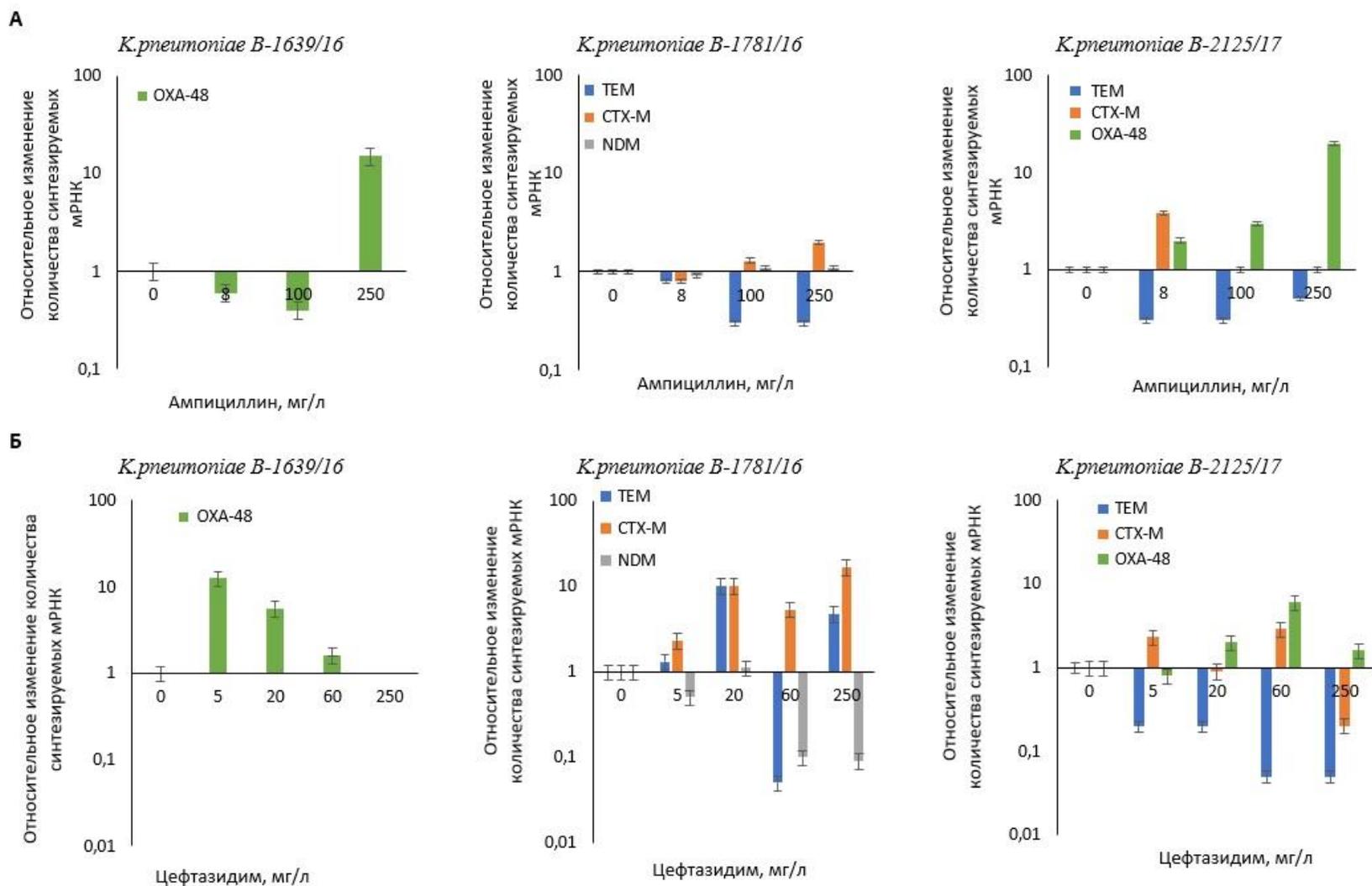


Рис. 36. Относительное изменение количества мРНК генов БЛ (ТЕМ-1, СТХ-М-15, ОХА-48 и NDM-1) в 1×10^9 клеток клинических штаммов при культивировании в присутствии бета-лактамовых АБП. А) Культивирование в присутствии ампициллина. Б) Культивирование в присутствии цефтазидима.

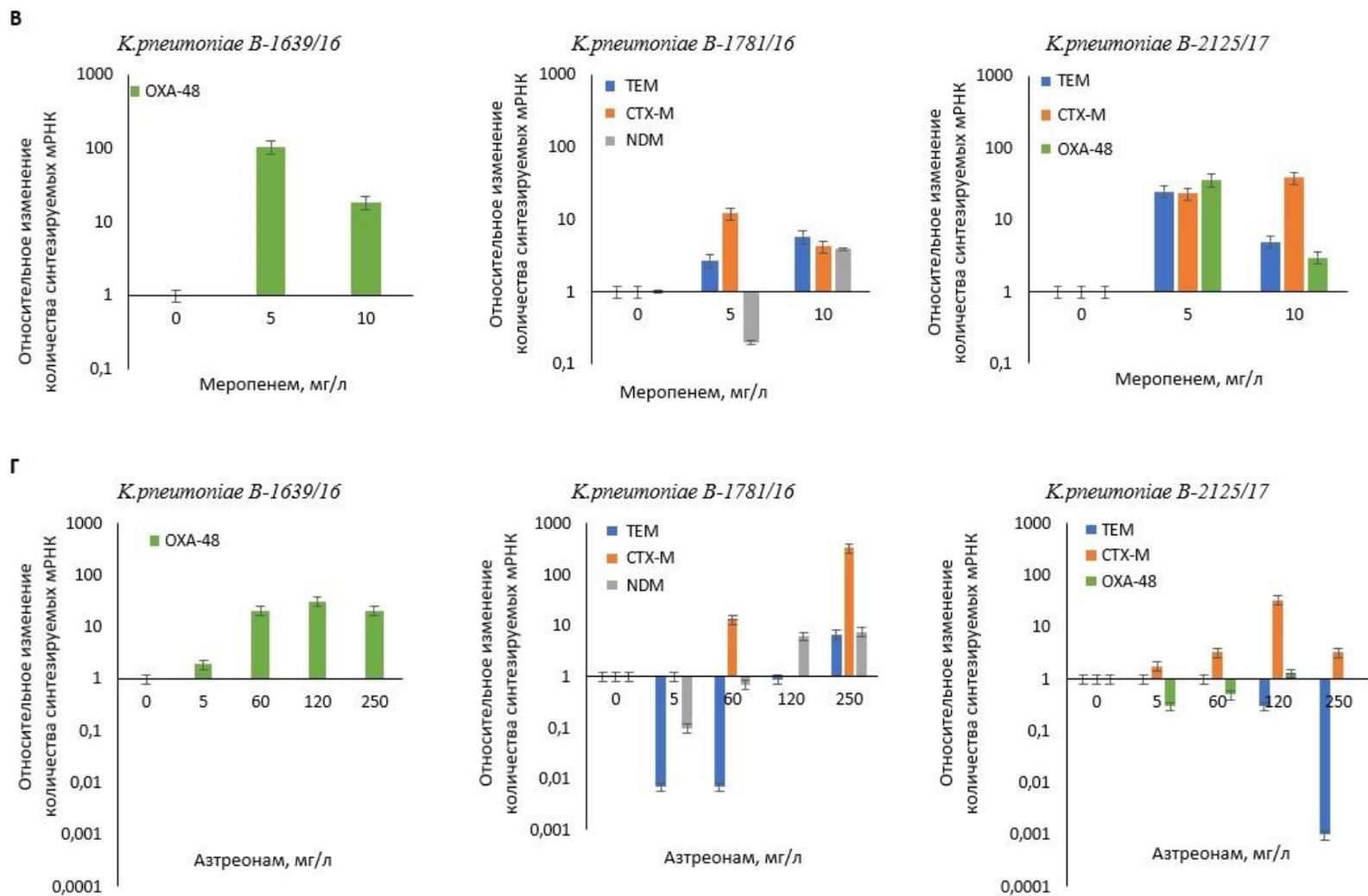


Рис. 36. Относительное изменение количества мРНК геновБЛ (TEM-1, CTX-M-15, OXA-48 и NDM-1) в 1×10^9 клеток клинических штаммов при культивировании в присутствии бета-лактамов АБП. В) Культивирование в присутствии меропенема. Г) Культивирование в присутствии азтреонама.

Ампициллин. В присутствии низкой концентрации ампициллина (8 мг/л), которая соответствует концентрации в крови человека при лечении бактериальных инфекций, наблюдали снижение количества мРНК гена TEM-1 у обоих монорезистентных штаммов и небольшое снижение транскрипции мРНК гена БЛ TEM-1 у двух мультирезистентных штаммов (*K. pneumoniae* В-1781 и *K. pneumoniae* В-2125), при этом у штамма *K. pneumoniae* В-2125 наблюдалось увеличение транскрипции мРНК гена БЛ СТХ-М-15 в 3,8 раза и гена БЛ ОХА-48 в 2 раза. У мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* В-1781 и *K. pneumoniae* В-1639 наблюдали незначительное снижение уровня транскрипции мРНК генов БЛ СТХ-М-15, NDM-1 и ОХА-48.

При использовании более высоких концентраций ампициллина (100 и 250 мг/л) в клетках монорезистентного штамма *K. pneumoniae* В-1350 транскрипция мРНК гена БЛ TEM-1 увеличивалась более, чем на один порядок, у мультирезистентных штаммов наблюдали незначительное уменьшение транскрипции мРНК гена TEM-1 (пенициллиназа с самым узким спектром субстратной специфичности) и увеличение транскрипции мРНК гена одной БЛ с более широким спектром специфичности: мРНК гена цефалоспорины СТХ-М-15 у штамма *K. pneumoniae* В-1781 и мРНК гена карбапенемазы ОХА-48 у штаммов *K. pneumoniae* В-2125 и *K. pneumoniae* В-1639 (наиболее существенное увеличение – более, чем на один порядок - при большом избытке АБП). Изменений транскрипции мРНК гена БЛ NDM-1 – карбапенемазы с самым широким спектром специфичности - у штамма *K. pneumoniae* В-1781 не наблюдали.

Цефтазидим. При использовании низких концентраций цефтазидима (5 мг/л – не превышает максимальную терапевтическую концентрацию в крови при лечении) в клетках каждого из трех мультирезистентных штаммов наблюдали усиление транскрипции мРНК гена одной из БЛ с широкой специфичностью (незначительное увеличение транскрипции мРНК гена СТХ-М-15 в клетках штаммов *K. pneumoniae* В-1781 и *K. pneumoniae* В-2125 и существенное увеличение транскрипции мРНК гена ОХА-48, в клетках штамма *K. pneumoniae* В-1639 более, чем на 1 порядок). Дальнейшее увеличение концентрации цефтазидима (от 20 до 60 мг/л - соответствует терапевтическому диапазону концентраций при внутримышечном и внутривенном введении) – в клетках одного мультирезистентного штамма (*K. pneumoniae* В-1781) приводило к увеличению примерно на 1 порядок транскрипции мРНК генов двух БЛ (TEM-1 и СТХ-М-15); в клетках другого штамма (*K. pneumoniae* В-2125) – при 20 мкг/л незначительно увеличивалась транскрипция мРНК гена карбапенемазы ОХА-48 вместо мРНК гена СТХ-М-15, при 60 мг/л – активировалась транскрипция мРНК генов двух типов (СТХ-М-15 и ОХА-48); в клетках третьего штамма *K. pneumoniae* В-1639 существенно увеличивалась транскрипция мРНК гена

карбапенемазы ОХА-48, при дальнейшем увеличении концентрации АБП она снижалась. В клетках данных штаммов наблюдали снижение транскрипции мРНК генов некоторых БЛ: в клетках штамма *K. pneumoniae* В-2125 - пеницилиназы TEM-1, в клетках штамма *K. pneumoniae* В-1781/16 - карбапенемазы NDM-1 и TEM-1 при 60 мг/л цефтазидима. Последующее увеличение концентрации цефтазидима (до 250 мг/л, избыточной по сравнению с терапевтической) усилило все наблюдаемые эффекты для клеток мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* В-1781, но снизило их для другого мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* В-2125. Роста штамма *K. pneumoniae* В-1639 в присутствии данной увеличенной концентрации цефтазидима не наблюдали. В целом, можно заметить, что антибиотик группы цефалоспоринов в клетках мультирезистентных штаммов – носителей нескольких генов БЛ - активировал транскрипцию только одной-двух мРНК генов БЛ, обладающих нужной субстратной специфичностью для гидролиза цефтазидима. Увеличение транскрипции мРНК гена БЛ TEM-1 (узкий спектр специфичности) и мРНК гена БЛ NDM-1 (наиболее широкий спектр специфичности) была подавлена.

Меропенем. При использовании меропенема в концентрации 5 мг/л (соответствует терапевтическим концентрациям карбапенемов в крови при внутривенном введении) в клетках всех мультирезистентных штаммов наблюдали резкое увеличение транскрипции мРНК всех генов БЛ, кроме NDM-1 в клетках штамма *K. pneumoniae* В-1781 (при концентрации 5 мг/л). Значение относительного изменения количества мРНК варьировало в диапазоне от 2,7 до 100 раз в зависимости от типа БЛ. Нужно отметить, что при использовании АБП группы карбапенемов коэффициенты увеличения транскрипции специфичных мРНК генов БЛ превышали эффекты, наблюдавшиеся при действии АБП цефалоспоринового ряда. При дальнейшем увеличении концентрации меропенема до 10 мг/л происходило усиление транскрипции всех мРНК генов БЛ, однако коэффициент увеличения концентрации мРНК был, в целом, ниже, чем при концентрации препарата 5 мг/л. При дальнейшем увеличении концентрации меропенема рост клеток был подавлен у всех штаммов. *Меропенем* увеличивал транскрипцию мРНК всех генов БЛ плазмидной локализации, имеющихся у мультирезистентных штаммов (Таблица 18), и его можно использовать для анализа активации транскрипции мРНК генов различных БЛ в бактериальных штаммах.

Азтреонам. При использовании азтреонама в пониженной концентрации (5 мг/л) в клетках штамма *K. pneumoniae* В-1781 наблюдали значительное снижение транскрипции мРНК генов TEM-1 и NDM-1; в клетках штамма *K. pneumoniae* В-2125 увеличивалась транскрипция мРНК гена СТХ-М-15 и снижался уровень транскрипции мРНК гена ОХА-

48; в клетках штамма *K. pneumoniae* В-1639 незначительно увеличивалась транскрипция мРНК гена ОХА-48. При использовании азтреонама в терапевтических концентрациях (60 мг/л) происходило более существенное усиление транскрипции мРНК генов одной из БЛ расширенного спектра (СТХ-М-15 в штаммах *K. pneumoniae* В-1781 и В-2125 и ОХА-48 в штамме *K. pneumoniae* В-1639). Дальнейшее увеличение концентрации АБП (120 – 250 мг/л) приводило к увеличению транскрипции мРНК генов одной-двух БЛ. Значение относительного изменения количества мРНК варьировало в диапазоне от 3 до 300 раз, в зависимости от типа гена БЛ. При высоких концентрациях антибиотика транскрипция мРНК гена TEM-1 сильно подавлялась в клетках одного из штаммов (*K. pneumoniae* В-2125), а транскрипция мРНК гена карбапенемазы NDM-1 активировалась слабее, в сравнении с другими БЛ.

В ряде работ показано, что величина изменения экспрессии гена зависит от типа плазмиды, на которой они локализованы [161, 162]. Данный факт может быть одной из причин, наблюдаемого несоответствия в величинах изменений количеств мРНК генов БЛ между разными штаммами.

В данной работе впервые проведено комплексное изучение влияния разных групп бета-лактамов АБП в разных концентрациях на изменение транскрипции генов БЛ в клетках мультирезистентных к антибиотикам бактерий. Опубликованные к настоящему времени в научной литературе данные касаются, в основном, изучения влияния отдельных представителей бета-лактамов на экспрессию генов отдельных БЛ методом ПЦР РВ без учета наличия у данных бактерий генов других БЛ. При этом во многих случаях АБП использован в одной концентрации.

Сравнивая результаты данной работы с опубликованными ранее данными, можно заключить, что они в целом коррелируют в установлении разнонаправленного влияния антибиотиков на экспрессию генов разных БЛ. Полученные нами данные, характеризующие изменения транскрипции мРНК генов отдельных БЛ в пределах одного семейства Enterobacteriaceae, сравнимы с имеющимися в литературе. Например, увеличение транскрипции мРНК гена СТХ-М-15 в 2-3 раза у *K. pneumoniae* В-2125 под действием цефтазидима сравнимо с увеличением в 1,4 раза экспрессии этого гена у штамма *E. coli* под действием цефалоспоринов в дозе 2,0 мг/мл [8]; незначительное уменьшение транскрипции гена БЛ TEM-1 и увеличение транскрипции гена СТХ-М-15 у штамма *K. pneumoniae* В-1781 в присутствии ампициллина и цефтазидима хорошо коррелируют с данными работы [7]; увеличение индукции транскрипции гена БЛ ОХА-48 сравнимо с результатами, полученными для штаммов *E. coli* в присутствии меропенема (до 4 мг/л) [160]. Однако в ряде случаев мы наблюдали более существенные изменения (на 1-2

порядка) увеличения транскрипции специфичных мРНК, по сравнению с данными, имеющимися в литературе. Это может быть обусловлено использованием нами классического принципа аналитической биотехнологии для определения концентрации мРНК – построения градуировочных зависимостей для стандартных образцов мРНК, что повышает точность анализа.

Проведение комплексного мультифакторного анализа влияния разных групп бета-лактамов в разных концентрациях на штаммы, несущие плазмидно-кодируемые гены БЛ разных классов, позволило получить новые данные о транскрипции специфичных мРНК генов БЛ. Применение мультиплексного гибридационного анализа мРНК на биочипах с использованием стандартных образцов соответствующих мРНК позволило количественно охарактеризовать как увеличение, так и уменьшение транскрипции генов БЛ разных классов. В некоторых случаях значения относительного изменения уровней транскрипции мРНК генов БЛ превосходили данные, имеющиеся в литературе. Было показано, что в присутствии АБП пенициллинового и цефалоспоринового рядов у мультирезистентных бактерий происходит увеличение транскрипции генов только отдельных БЛ. Во многих случаях наблюдали нелинейные зависимости транскрипции специфичных мРНК от концентрации АБП в культуре клеток. Показано существенное увеличение транскрипции всех имеющихся в клетках мультирезистентных штаммов генов БЛ в присутствии меропенема.

Полученные результаты показали возможность использования разработанного нами метода мультиплексного гибридационного 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 гибридационного 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.

Заключение

Устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам является основной причиной неэффективности АБП терапии инфекционных заболеваний бактериальной природы в клинической практике. Широкое распространение мультирезистентных бактерий, развитие механизмов устойчивости бактерий к АБП, появление данных об отсутствии корреляции фенотипических и молекулярно-генетических методов анализа резистентных к антибиотикам бактерий делают актуальной разработку новых экспериментальных методов исследования. В данной работе разработан метод количественного определения специфичных мРНК клинически значимых БЛ разных типов на колориметрических биочипах с использованием стандартных образцов, который далее применен для анализа транскриптов генов БЛ мультирезистентных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Разработанный метод основан на определении меченой биотином ДНК-мишени, которую получают в последовательных мультиплексных реакциях ОТ и ПЦР. Продуктом ПЦР является полноразмерный исследуемый ген БЛ. Количественное определение мРНК генов БЛ основано на использовании стандартных образцов мРНК, которые также соответствуют по размеру гену БЛ и проходят все стадии анализа. Таким образом, отсутствует необходимость определения эффективности стадий ОТ и ПЦР, что требуется для количественных расчетов в методе ПЦР РВ. Предел обнаружения мРНК разработанным методом составляет 5-7 пМ. По данному параметру разработанный метод уступает ПЦР РВ, предел обнаружения которого может достигать 17 фМ. Однако чувствительность разработанного метода достаточна для определения специфичных мРНК генов БЛ в клинических штаммах бактерий, культивированных в логарифмической фазе роста в течение 4 часов в присутствии бета-лактамов и достигших количества клеток не менее 10^6 КОЕ/мл. Использование стандартных образцов мРНК для построения градуировочных зависимостей обеспечивает высокую точность определения мРНК в широком диапазоне концентраций (0,005 – 20 нМ). Результатом анализа является определение концентрации мРНК в образце общей РНК, выделенной из бактериальных клеток. На основании этой величины далее может быть рассчитано количество специфичных мРНК, синтезированных в одной бактериальной клетке.

Разработанный метод характеризуется высокой воспроизводимостью, поскольку основан на анализе ПЦР-продуктов по конечной точке. Таким образом удастся избежать проблем метода ПЦР-РВ, в котором определение проводится по определению цикла отрыва кривой в области низких концентраций продукта реакции, что является источником ошибок и снижает воспроизводимость метода.

Размещение биочипов в лунках 96-луночного планшета позволяет существенно увеличить производительность метода. В данной работе мы определяли концентрацию специфичных мРНК генов БЛ четырех типов, используя принцип мультианализа с размещением олигонуклеотидных зондов разной специфичности на одном биочипе, в дальнейшем количество определяемых мРНК может быть увеличено до 10 при 3х повторах одного зонда и размещении биочипа в одной лунке. Формат 96-луночных планшетов позволяет размещать разные биочипы на одном планшете, таким образом количество одновременно определяемых генов может быть увеличено пропорционально числу биочипов разной специфичности.

Использование предложенного в данной работе подхода позволяет перейти от полуколичественного анализа транскриптов генов к количественному, что необходимо при изучении молекулярных механизмов индукции генов антибиотикорезистентности у бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Мы показали применимость разработанного подхода для определения концентрации специфичных мРНК в образцах клинических штаммов с разной чувствительностью к АБП семейства *Enterobacteriaceae*, содержащих от 1 до 3 генов БЛ плазмидной локализации, культивированных в присутствии различных концентраций бета-лактамов, которые соответствуют концентрациям, используемым в клинической практике. Метод показал свою эффективность как при выявлении существенных изменений в концентрации специфичных мРНК генов БЛ (в 2 – 333 раза), так и более слабых эффектов – увеличения и значительного снижения концентраций специфичных мРНК генов БЛ в несколько раз. Установлено, что разные группы бета-лактамовых антибиотиков индуцируют различный спектр транскриптов генов БЛ, причем транскрипция мРНК генов БЛ зависит от концентрации бета-лактамового антибиотика нелинейно. Было показано, что меропенем может существенно усиливать экспрессию генов всех БЛ разной субстратной специфичности, а не только карбапенемаз. Этот эффект необходимо учитывать при определении тактики лекарственной химиотерапии инфекционных заболеваний.

Разработанный метод определения концентраций специфичных мРНК генов БЛ на биочипах может быть использован для контроля экспрессируемых БЛ мультирезистентными штаммами в клинических лабораториях, а также для детального изучения механизмов формирования резистентности бактерий к антибиотикам и поиска способов ее подавления. Полученные в данной работе результаты значительного увеличения экспрессии всех плазмидно-кодируемых генов БЛ при культивировании с меропенемом в концентрациях, соответствующих терапевтическому диапазону в крови человека, имеют большое значение для анализа случаев неэффективности

антибактериальной терапии. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют о необходимости разработки новых стратегий диагностики чувствительности и лечения бактериальных инфекций, также более тщательного выбора АБП, неправильное использование которых может привести к усугублению проблем устойчивости бактерий к АБП.

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-лактаминового антибиотика.
7. Показано, что меропенем в низких концентрациях вызывает увеличение транскрипции всех плазмидно-кодируемых генов бета-лактамаз (в $2,5 \cdot 10^4$ 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 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.
9. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2019/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2019>
10. World Health Organization (WHO). Healthcare-associated infections FACT SHEET. Available from: https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf. Accessed February 9, 2022.
11. Nikulin-Kulinski K. Physical Therapy Clinical Handbook for PTAs // Jones & Bartlett Learning. - 2017.

12. Peacock S.J., Parkhill J., Brown N.M. Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens // *Microbiology*. -2018. – V. 164. - № 10. – P. 1213–1219.
13. Nimer N.A. Nosocomial Infection and Antibiotic-Resistant Threat in the Middle East // *Infect Drug Resist.* – 2022. – V. 15. – P. 631-639.
14. Andersson D.I., Nicoloff H., Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2019. - V. 17. - № 8. - P. 479.
15. Bush K., Bradford P.A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2020. - Vol. 33. - №2. – P. 1-37.
16. Lupoli T.J., Tsukamoto H., Doud E.H., et al. Transpeptidase-mediated incorporation of D-amino acids into bacterial peptidoglycan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V. 133. – P. 10748–10751.
17. Ghuysen J.M. Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: Facts, doubts and hopes // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 1997. - V. 8. – P. 45–60.
18. 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. USA*. – 1965. – V. 54. – P. 1133–1141.
19. 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.
20. Bush K., Bradford P.A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: An overview // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – V. 6. – P. a025247.
21. Bhagirath A.Y., Li Y., Patidar R., Yerex K., Ma X., Kumar A., Duan K. Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. - № 7. – P. 1781.
22. Ambler R.P. The structure of b-lactamases // *Philos Trans R SocLond B Biol Sci*. - 1980. - V. 289. – P. 321–331.
23. Stec B., Holtz K.M., Wojciechowski C.L., Kantrowitz E.R. Structure of the wildtype TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme // *Acta Cryst.* – 2005. – V. 61. – P. 10721079.
24. Kar D., Pandey S.D., Mallick S., Dutta M., Ghosh A.S. Substitution of alanine at position 184 with glutamic acid in *Escherichia coli* PBP5 Ω -like loop introduces a moderate cephalosporinase activity // *Protein J.* – 2018. – V. 37. – P. 122–131.
25. Drawz S.M., Bonomo R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2010. – V. 23. – P. 160201.

26. Tooke C.L., Hinchliffe P., Bragginton E.C., Colenso C.K., Hirvonen V.H.A., Takebayashi Y., Spencer J. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century // J. Mol. Biol. – 2019. – V. 431. – P. 34723500.
27. Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Ингибиторы бета-лактамаз. Новая жизнь бета-лактамных антибиотиков // Биохимия. – 2020. – Т. 85. - № 11. – С. 1519-1539.
28. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2013. – V. 1277. – P. 91104.
29. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance CAESAR Manual Version 3, 2019. – P. 1-122.
30. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation 2017-18. – 2018. – P. 1 – 268.
31. Яковлев С.В., Брико Н.И., Сидоренко С.В., Проценко Д.Н. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи. – 2018. – С. 1-156.
32. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т.23. - №2. – С. 198-204.
33. Senchyna F., Gaur R.L., Sandlund J., et al. Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a health care system in Northern California, from 2013 to 2016 // Diagn Microbiol Infect Dis. - 2019. – V. 93. – P. 250 –257.
34. Bush K. Carbapenemases: partners in crime // J Glob Antimicrob Resist. - 2013. -V. 1. – P. 7–16.
35. Vannice K., Benoliel E., Kauber K., et al. Notes from the field: clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate with three carbapenem resistance genes associated with urology procedures—King County, Washington, 2018 // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. - 2019. – V. 68. – P. 667–668.
36. Mendes R.E., Castanheira M., Woosley L.N., Stone G.G., Bradford P.A., Flamm R.K. Characterization of β -lactamase content of ceftazidime resistant pathogens recovered during the pathogen-directed phase 3 REPRIME trial for ceftazidime-avibactam: correlation of efficacy against β -lactamase producers // Antimicrob Agents Chemother. - 2019. – V. 63. – P. e02655-18.
37. Brown N.G., Shanker S., Prasad B.V., Palzkill T. Structural and biochemical evidence that a TEM-1 beta-lactamase N170G active site mutant acts via substrate-assisted catalysis // J Biol Chem. – 2009. – V. 284. - № 48. – P. 33703-12.

38. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2013. – V. -1277. – P. 91104.
39. Franceschini N., Perilli M., Segatore B., Setacci D., Amicosante G., Mazzariol A., Cornaglia G. Ceftazidime and aztreonam resistance in *Providencia stuartii*: characterization of a natural TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase TEM-60 // Antimicrob Agents Chemother. – 1998. – V. 42. - № 6. – P. 1459-62.
40. Manageiro V., Ferreira E., Cougnoux A., Albuquerque L., Caniça M., Bonnet R. Characterization of the inhibitor-resistant SHV β -lactamase SHV-107 in a clinical *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing GES-7 enzyme // Antimicrob Agents Chemother. – 2012. – V. 56. - № 2. – P. 1042-6.
41. Faheem M., Rehman M.T., Danishuddin M., Khan A.U. Biochemical characterization of CTX-M-15 from *Enterobacter cloacae* and designing a novel non- β -lactam- β -lactamase inhibitor // PLoS One. -2013. – V. 8. - № 2. – P. e56926.
42. Sabatini A., Brisdelli F., Celenza G., Marcoccia F., Colapietro M., et al. Interaction of carbapenems and β -lactamase inhibitors towards CTX-M-15 and CTX-M-15 G238C mutant // Journal of Global Antimicrobial Resistance. - 2017. – V. 10. – P. 95–100.
43. Mehta S.C., Rice K., Palzkill T. Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability // PLoS Pathog. – 2015. – V. 11. - № 6. – P. e1004949.
44. Wang D., Chen J., Yang L., Mou Y., Yang Y. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15 // PLoS One. – 2014. – V. 9. - № 10. – P. e111491.
45. Makena A., Brem J., Pfeiffer I., Geffen R.E., Wilkins S.E., Tarhonskaya H., Flashman E., Phee L.M., Wareham D.W., Schofield C.J. Biochemical characterization of New Delhi metallo- β -lactamase variants reveals differences in protein stability // J Antimicrob Chemother. – 2015. – V. 70. - № 2. – P. 463-9.
46. Rima M., Emeraud C., Bonnin R.A., Gonzalez C., Dortet L., Iorga B.I., Oueslati S., Naas T. Biochemical characterization of OXA-244, an emerging OXA-48 variant with reduced β -lactam hydrolytic activity // J Antimicrob Chemother. – 2021. – V. 76. - № 8. – P. 2024-2028.
47. De Belder D., Ghiglione B., Pasteran F., de Mendieta J.M., Corso A., Curto L., Di Bella A., Gutkind G., Gomez S.A., Power P. Comparative Kinetic Analysis of OXA-438 with Related OXA-48-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamases // ACS Infect Dis. – 2020. – V. 6. - № 11. – P. 3026-3033.

48. Chong Y., Shimoda S., Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* // *Infect Genet Evol.* – 2018. – V. 61. – P. 185–188.
49. Fursova N.K., Astashkin E.I., Ershova O.N., Aleksandrova I.A., Savin I.A., Novikova T.S., Fedyukina G.N., Kislichkina A.A., Fursov M.V., Kuzina E.S., Biketov S.F., Dyatlov I.A. Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Causing Severe Infections in the Neuro-ICU // *Antibiotics (Basel)*. – 2021. -V. 10. - № 8. – P. 979.
50. Castanheira M., Simner P.J., Bradford P.A. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection // *JAC Antimicrob Resist.* – 2021. – V. 3. - № 3. – P. dlab092.
51. Novais A., Baquero F., Machado E. et al. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating Enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696:Tn1 and IS5075-Tn21 // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – P. 825–34.
52. Wang D., Chen J., Yang L., Mou Y., Yang Y. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15 // *PLoS One.* - 2014. – V. 9. - № 10. – P. e111491.
53. Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum b-lactamases in Gram-negative rods // *Infect Genet Evol.* – 2012. – V. 12. – P. 883–93.
54. Marcade G., Deschamps C., Boyd A. et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum b-lactamases // *J Antimicrob Chemother.* – 2008. – V. 63. – P. 67–71.
55. Livermore D.M. b-Lactamases in laboratory and clinical resistance // *Clin Microbiol Rev.* – 1995. – V. 8. – P. 557–84.
56. Pitton J.S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics // *Ergeb Physiol.* - 1972. – V. 65. – P. 15–93.
57. Huletsky A., Knox J.R., Levesque R.C. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type b-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling // *J Biol Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 3690–7
58. Neubauer S., Madzgalla S., Marquet M. et al. A genotype-phenotype correlation study of SHV b-lactamases offers new insight into SHV resistance profiles // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2020. – V. 64. – P. e02.
59. Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A review of SHV extendedspectrum b-lactamases: neglected yet ubiquitous // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 1374.

60. Poirel L., Naas T., Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum b-lactamases // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14. – P. 75–81.
61. Billard-Pomares T., Fouteau S., Jacquet M.E. et al. Characterization of a P1- like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum b-lactamase from an *Escherichia coli* strain // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – V. 58. – P. 6550–7.
62. Garza-Ramos U., Davila G., Gonzalez V. et al. The blaSHV-5 gene is encoded in a compound transposon duplicated in tandem in *Enterobacter cloacae* // *Clin Microbiol Infect.* – 2009. – V. 15. – P. 878–80.
63. Bauernfeind A., Grimm H., Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli* // *Infection.* – 1990. – V. 18. – P. 294–8.
64. Naas T., Poirel L., Nordmann P. Minor extended-spectrum b-lactamases // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14. – P. 42–52.
65. Huletsky A., Knox J.R., Levesque R.C. Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type b-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling // *J Biol Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 3690–7.
66. Poirel L., Gniadkowski M., Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum b-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related b-lactamase CTX-M-3 // *J Antimicrob Chemother.* – 2002. – V. 50. – P. 1031–4.
67. Poirel L., Decousser J.W., Nordmann P. Insertion sequence IS Ecp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M b-lactamase gene // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – V. 47. – P. 2938–45.
68. Eckert C., Gautier V., Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes // *J Antimicrob Chemother.* – 2006. – V. 57. – P. 14–23.
69. Partridge S.R., Zong Z., Iredell J.R. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying blaCTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2011. – V. 55. – P. 4971–8.
70. Zhao W.H., Hu Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria // *Crit Rev Microbiol.* – 2013. – V. 39. - № 1. – P. 79–101.
71. Peirano G., Pitout J.D.D. Extended-spectrum b-lactamase-producing Enterobacteriaceae: update on molecular epidemiology and treatment options // *Drugs.* – 2019. – V. 79. – P. 1529–41.
72. Deshpande L.M., Rhomberg P.R., Sader H.S., Jones R.N. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005) // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2006. – V. 56. - № 4. – P. - 367-72.

73. Marsh J.W., Krauland M.G., Nelson J.S., Schlackman J.L., Brooks A.M., Pasculle A.W., Shutt K.A., Doi Y., Querry A.M., Muto C.A., Harrison L.H. Genomic Epidemiology of an Endoscope-Associated Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* // PLoS One. – 2015. – V. 10. - № 12. – P. e0144310.
74. Chen C.J. et al. Closely related NDM-1-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan // PLoS One. – 2014. – V. 9. – P. e104899.
75. Jeong S. et al. Extensively drug-resistant *Escherichia coli* sequence type 1642 carrying an IncX3 plasmid containing the blaKPC-2 gene associated with transposon Tn4401a // Ann. Lab. Med. - 2018. – V. 38. – P. 17–22.
76. Liu J. et al. Emergence and establishment of KPC-2- producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2018. – V. 37. – P. 293–299.
77. Du H. et al. Genomic characterization of *Enterobacter cloacae* isolates from China that coproduce KPC-3 and NDM-1 carbapenemases // Antimicrob. Agents Chemother. - 2016. – V. 60. – P. 2519–2523.
78. Chavda K.D., Chen M.R., Jacobs L. et al. Molecular diversity and plasmid analysis of KPC-producing *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. - 2016. – V. 60. – P. 4073–4081.
79. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., Walsh T.R. Characterization of a new metallo- β -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. – P. 5046 –5054.
80. Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings // Clin Microbiol Rev. – 2019. – V. 32. - № 2. – P. e00115-18.
81. Nordmann P., Poirel L., Walsh T.R., Livermore D.M. The emerging NDM carbapenemases // Trends Microbiol. - 2011. – V. 19. – P. 588 –595.
82. Kieffer N., Nordmann P., Aires-de-Sousa M., Poirel L. High prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among hospitalized children in Luanda, Angola // Antimicrob Agents Chemother. - 2016. – V. 60. – P. 6189 – 6192.
83. Zheng R., Zhang Q., Guo Y., Feng Y., Liu L., Zhang A., Zhao Y., Yang X., Xia X. Outbreak of plasmid-mediated NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST105 among neonatal patients in Yunnan, China // Ann Clin Microbiol Antimicrob. - 2016. – V. 15. – P. 10.

84. Tijet N., Richardson D., MacMullin G., et al. Characterization of multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae isolates from the same patient // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2015. – V. 59. – P. 3648–3651.
85. Yoon E.-J. et al. New Delhi metallo-beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in South Korea between 2010 and 2015 // *Front. Microbiol.* - 2018. – V. 9. – P. 571.
86. Campos J.C. et al. Characterization of Tn 3000, a transposon responsible for blaNDM-1 dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob // Agents Chemother.* - 2015. – V. 59. – P. 7387–7395.
87. Sugawara Y. et al. Genetic characterization of blaNDM-harboring plasmids in carbapenem-resistant *Escherichia coli* from Myanmar // *PLoS One.* - 2017. – V.12. – P. e0184720.
88. Walther-Rasmussen J., Høiby N. OXA-type carbapenemases // *J Antimicrob Chemother.* - 2006. – V. 57. – P. 373–383.
89. Evans B.A., Amyes S.G. OXA beta-lactamases // *Clin Microbiol Rev.* - 2014. – V. 27. – P. 241–263.
90. Pitout J.D.D., Peirano G., Kock M.M., Strydom K.A., Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. – V. 33. - № 1. – P. e00102-19.
91. Poirel L., Héritier C., Tolün V., Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2004. – V. 48. – P. 15–22.
92. Kopotsa K., Osei Sekyere J., Mbelle N.M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review // *Ann N Y Acad Sci.* – 2019. – V. 1457. - № 1. – P. 61-91.
93. Cho H., Uehara T., Bernhardt T.G. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery // *Cell.* – 2014. – V. 159. - № 6. – P. 1300-11.
94. Tuomanen E., Cozens R., Tosch W., Zak O., Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth // *J Gen Microbiol.* – 1986. – V. 132. - № 5. – P. 1297-304.
95. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf
96. Roemhild R., Bollenbach T., Andersson D.I. The physiology and genetics of bacterial responses to antibiotic combinations // *Nat Rev Microbiol.* – 2022. – V. 20. - № 8. – P. 478-490.
97. Hughes D., Andersson D.I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance // *FEMS Microbiol Rev.* – 2017. – V. 41. - № 3. – P. 374-391.
98. Andersson D.I., Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics // *Nat Rev Microbiol.* – 2014. – V. 12. - № 7. – P. 465-78.

99. Hughes D., Andersson D.I. Evolutionary Trajectories to Antibiotic Resistance // *Annu Rev Microbiol.* – 2017. – V. 71. – P. 579-596.
100. Andersson D. I., Hughes D. Gene amplification and adaptive evolution in bacteria // *Annu. Rev. Genet.* - 2009. – V. 43. – P. 167–195.
101. Sandegren L., Andersson D.I. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance // *Nature Rev. Microbiol.* – 2009. – V. 7. – P. 578–588.
102. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance to beta-lactam antibiotics may often be a stage in the progression to antibiotic resistance // *PLoS Biol.* – 2021. – V. 19. - № 7. – P. e3001346.
103. Band V.I., Weiss D.S. Heteroresistance: a cause of unexplained antibiotic treatment failure? // *PLoS Pathog.* – 2019. – V. 15. – P. e1007726.
104. Nicoloff H., Hjort K., Levin B.R., Andersson D.I. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification // *Nat Microbiol.* – 2019. – V. 4. - № 3. – P. 504-514.
105. Tierney A.R., Rather P.N. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance // *Future Microbiol.* – 2019. – V. 14. - № 6. – P. 533-552.
106. Miyake Y., Yamamoto K. Epistatic Effect of Regulators to the Adaptive Growth of *Escherichia coli* // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10. - № 1. – P. 3661.
107. Nishino K., Hayashi-Nishino M., Yamaguchi A. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing multidrug efflux genes *acrEF* // *Antimicrob Agents Ch.* – 2009. – V. 53. – P. 3541-3.
108. Gooderham W.J., Hancock R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* // *FEMS Microbiol Rev.* – 2009. -V. 33. – P. 279–94.
109. Yeung A.T., Bains M., Hancock R.E. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol.* – 2011. – V. 193. – P. 918–31.
110. Adler M., Anjum M., Andersson D.I. et al. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli* // *J Antimicrob Chemoth.* – 2012. – V. 68. – P. 51–9.
111. Sun S., Berg O.G., Roth J.R., Andersson D.I. Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* // *Genetics.* – 2009. – V. 182. - № 4. – P. 1183–1195.
112. Hirakawa H., Nishino K., Yamada J., Hirata T., Yamaguchi A. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli* // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2003. – V. 52. - № 4. – P. 576–582.

113. Kuzmenkov A.Y., Trushin I.V., Vinogradova A.G., Avramenko A.A., Sukhorukova M.V., Malhotra-Kumar S., Dekhnich A.V., Edelstein M.V., Kozlov R.S. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia // *Front. Microbiol.* - 2021. - V. 12. – P. 620002.
114. Caille O., Rossier C., Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189. - № 13. – P. 4561–4568.
115. Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas J.L., Kohler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. - № 10. – P. 8761–8768.
116. Dingemans J., Poudyal B., Sondermann H., Sauer K. The Yin and Yang of SagS: distinct residues in the HmsP domain of SagS independently regulate biofilm formation and biofilm drug tolerance // *mSphere.* – 2018. – V. 3. - № 3. – P. pii:e00192–18.
117. Srinivasan V.B., Vaidyanathan V., Mondal A., Rajamohan G. Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7. - № 4. – P. e33777.
118. Srinivasan V.B., Venkataramaiah M., Mondal A., Vaidyanathan V., Govil T., Rajamohan G. Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7. - № 7. – P. e41505.
119. Batchelor E., Walther D., Kenney L.J., Goulian M. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins OmpF and OmpC // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. - № 16. – P. 5723–5731.
120. Raivio T.L., Leblanc S.K., Price N.L. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity // *J. Bacteriol.* – 2013. – V. 195. - № 12. – P. 2755–2767.
121. Raczowska A., Trzos J., Lewandowska O., Nieckarz M., Brzostek K. Expression of the AcrAB components of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump of *Yersinia enterocolitica* is subject to dual regulation by OmpR // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. - № 4. – P. e0124248.
122. Lin M.F., Lin Y.Y., Lan C.Y. The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii* // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. - № 7. – P. e0132843.
123. Lee C.R., Lee J.H., Park M. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options // *Front. Cell. Infection Microbiol.* – 2017. – V. 7. – P. 55.

124. Baranova N., Nikaido H. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184. - № 15. - P. 168–4176.
125. Nagakubo S., Nishino K., Hirata T., Yamaguchi A. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC // *J. Bacteriol.* – 2002. – V. 184. - № 15. – P. 4161–4167.
126. Carvajal L.P., Rincon S., Echeverri A.M., et al. Novel Insights into the Classification of Staphylococcal β -Lactamases in Relation to the Cefazolin Inoculum Effect // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2020. - V. 64. - № 5. – P. e02511-19.
127. Silva V., Hermenegildo S., Ferreira C., et al. Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Human Bloodstream Infections: Detection of MLSB Resistance // *Antibiotics (Basel).* -2020. - V. 9. - № 7. – P. 375.
128. Llarrull L.I., Toth M., Champion M.M., Mobashery S. Activation of BlaR1 protein of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, its proteolytic processing, and recovery from induction of resistance // *J Biol Chem.* – 2011. - V. 286. - № 44. – P. 38148-38158.
129. Zhang H.Z., Hackbarth C.J., Chansky K.M., Chambers H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci // *Science.* – 2001. - V. 291. - № 5510. – P. 1962-1965.
130. Hao H., Dai M., Wang Y., Huang L., Yuan Z. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Future Microbiol.* – 2012. - V. 7. - № 11. – P. 1315-1329.
131. Fisher J.F., Mobashery S. The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* // *Bioorg Chem.* – 2014. - V. 56. – P. 41-48.
132. Dhar S., Kumari H., Balasubramanian D., Mathee K. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* - their role in the development of resistance // *J Med Microbiol.* – 2018. - V. 67. - № 1. – P. 1-21.
133. Kawada-Matsuo M., Komatsuzawa H. Role of *Streptococcus mutans* two-component systems in antimicrobial peptide resistance in the oral cavity // *Jpn. Dent. Sci. Rev.* – 2017. – V. 53. - № 3. – P. 86–94.
134. Ahn S.J., Burne R.A. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans* // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189. - № 17. – P. 6293–6302.

135. Li Y.H., Tang N., Aspiras M.B. et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184. - № 10. – P. 2699–2708.
136. Li Y.H., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. - № 3. – P. 897–908.
137. Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. – 2011. – V. 13. - № 7. – P. 1666–1681.
138. Dingemans J., Poudyal B., Sondermann H., Sauer K. The Yin and Yang of SagS: distinct residues in the HmsP domain of SagS independently regulate biofilm formation and biofilm drug tolerance // mSphere. – 2018. – V. 3. - № 3. – P. pii:e00192–18.
139. Poudyal B., Sauer K. The ABC of biofilm drug tolerance: the MerR-Like Regulator BrIR Is an Activator of ABC Transport Systems, with PA1874-77 Contributing to the Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Tobramycin // Antimicrob. Agents Chemother. – 2018. – V. 62. - № 2. – P. pii:e01981-17.
140. Zamorano L., Moya B., Juan C., Mulet X., Blazquez J., Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to beta-lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – V. 58. - № 9. – P. 5084–5095.
141. Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. – 2011. – V. 13. - № 7. – P. 1666–1681.
142. Goodman A.L., Merighi M., Hyodo M., Ventre I., Filloux A., Lory S. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen // Genes Dev. – 2009. – V. 23. - № 2. – P. 249–259.
143. Giraud C., Bernard C.S., Calderon V. et al. The PprA–PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae // Environ. Microbiol. – 2011. – V. 13. - № 3. – P. 666–683.
144. Bernard C.S., Bordi C., Termine E., Filloux A., De Bentzmann S. Organization and PprB-dependent control of the *Pseudomonas aeruginosa* tad Locus, involved in Flp pilus biology // J. Bacteriol. – 2009. – V. 191. - № 6. – P. 1961–1973.
145. Geisinger E., Isberg R.R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii* // PLoS Pathog. – 2015. – V. 11. - № 2. – P. e1004691.

146. Qi L., Li H., Zhang C. et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii* // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – P. 483.
147. Guo X.P., Sun Y.C. New insights into the non-orthodox two component rcs phosphorelay system // Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – P. 2014.
148. Howery K.E., Clemmer K.M., Rather P.N. The Rcs regulon in *Proteus mirabilis*: implications for motility, biofilm formation, and virulence // Curr. Genet. – 2016. – V. 62. - № 4. – P. 775–789.
149. Schlacher K., Goodman. M. F. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis // Nature Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – V. 8. – P. 587–594.
150. Radman M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis // Basic life sci. – 1975. – V. 5A. – P. 355–367.
151. Zhang X. et al. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice // J. Infect. Dis. – 2000. – V. 181. – P. 664–670.
152. Ubeda C. et al. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci // Mol. Microbiol. – 2005. – V. 56. – P. 836–844.
153. Beaber J. W., Hochhut B., Waldor M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes // Nature. – 2004. – V. 427. P. 72–74.
154. Lopez E., Elez M., Matic I., Blazquez J. Antibiotic mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. – 2007. – V. 64. – P. 83–93.
155. Partridge S. R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J. R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons // FEMS Microbiol. Rev. – 2009. -V. 33. – P. 757–784.
156. Hocquet D. et al. Evidence for induction of integronbased antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting // PLoS Pathog. – 2012. – V. 8. – P. e1002778.
157. Kjeldsen T.S.B., Overgaard M., Nielsen S.S., et al. CTX-M-1 β -lactamase expression in *Escherichia coli* is dependent on cefotaxime concentration, growth phase and gene location // J Antimicrob Chemother. – 2015. - V. 70. – P. 62-70.
158. Kuo H.Y., Chang K.C., Kuo J.W., Yueh H.W., Liou M.L. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2012. - V. 39. – P. 33-38.
159. Pereira C., Larsson J., Hjort K., Elf J., Andersson D.I. The highly dynamic nature of bacterial heteroresistance impairs its clinical detection // Commun Biol. – 2021. – V. 4. - № 1. – P. 521.

160. 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.
161. Chetri S., Bhowmik D., Dhar D., Chakravarty A., Bhattacharjee A. Effect of concentration gradient carbapenem exposure on expression of bla_{NDM-1} and actA in carbapenem resistant *Escherichia coli* // Infect Genet Evol. – 2019. – V. 73. – P. 332-336.
162. Paul D., Garg A., Bhattacharjee A. Occurrence of bla NDM-1 and bla NDM-5 in a tertiary referral hospital of north India // Microbial Drug Resistance. – 2017. - V. 00. - P. 1-7.
163. Choudhury D., Paul D., Ghosh A.S., Talukdar A.D., Choudhury M.D., Maurya A.P., Dhar D., Chakravarty A., Bhattacharjee. Effect of single-dose carbapenem exposure on transcriptional expression of bla NDV-1 and mexA in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2016. - V. 7. – P. 72-77.
164. Kuo H.Y., Chang K.C., Liu C.C., Tang C.Y., Peng J.H., Lu C.W., Tu C.C., Liou M.L. Insertion sequence transposition determines imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* // Microbial Drug Resistance. – 2014. - V. 0. – P. 1-6.
165. Zhao J.F., Wang Q., Ge Y.M., Tan P.L., Chen Y.M., Yan J. Distribution of β -lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Zhejiang province, China, and regulation of gene expression // Arch Biol Sci. – 2017. - V. 69. - № 3. – P. 399-407.
166. Kaushik M., Kumar S., Kapoor R.K., Viridi J.S. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2018. - V. 51. – P. 167-176.
167. Lopes B.S., Hamouda J., Amyes F. Effect of frameshift mutagen acriflavine on control of resistance genes in *Acinetobacter baumannii* // Journal of Medical Microbiology. – 2011. - V. 60. – P. 211-215.
168. Al-Hassan L., Opazo A., Lopes B.S., Mahallawy H.E., Amyes S.G.B. Variations in IS6 promoters alter the expression of carbapenem resistance in related strains of *Acinetobacter baumannii* // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2015. - V. 3. – P. 5-8.
169. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide // Clin Microbiol Infect. -2008. - V. 14. – P. 90–103.
170. Vogelmann B., Craig W.A. Kinetics of antimicrobial activity // J Pediatr. – 1986. - V. 108. – P. 835-40.
171. Noster J., Thelen P., Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant *Enterobacteriales*-From ESBLs to Carbapenemases // Antibiotics (Basel). – 2021. – V. 10. - № 9. – P. 1140.

172. Zhang Z., Zhai Y., Li D., Wang Z., Wang J., Chen Y., Wang Q., Gao Z. Characterization of unexpressed extended-spectrum beta-lactamase genes in antibiotic-sensitive *Klebsiella pneumonia* isolates // *Microb Drug Resist.* -2018. - V. 24. - № 6. – P. 799-806.
173. Kocer K., Klein S., Hildebrand D., Krall J., Heeg K., Boutin S., Nurjadi D. Pitfalls in genotypic antimicrobial susceptibility testing caused by low expression of blaKPC in *Escherichia coli* // *J Antimicrob Chemother.* – 2021. – V. 76. - № 11. – P. 2795-2801.
174. Tomić Paradžik M., Drenjančević D., Presečki-Stanko A., Kopic J., Talapko J., Zarfel G., Bedenić B. Hidden Carbapenem Resistance in OXA-48 and Extended-Spectrum β -Lactamase-Positive *Escherichia coli* // *Microb Drug Resist.* – 2019. -V. 25. - № 5. – P. 696-702.
175. Segawa T., Sekizuka T., Suzuki S., Shibayama K., Matsui M., Kuroda M. The plasmid-encoded transcription factor ArdK contributes to the repression of the IMP-6 metallo- β -lactamase gene blaIMP-6, leading to a carbapenem-susceptible phenotype in the blaIMP-6-positive *Escherichia coli* strain A56-1S // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. - № 12. – P. e0208976.
176. Urmi U.L., Nahar S., Rana M., Sultana F., Jahan N., Hossain B., Alam M.S., Mosaddek A.S.M., McKimm J., Rahman N.A.A., Islam S., Haque M. Genotypic to Phenotypic Resistance Discrepancies Identified Involving β -Lactamase Genes, blaKPC, blaIMP, blaNDM-1, and blaVIM in Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* // *Infect Drug Resist.* – 2020. -V. 13. -P. 2863-2875.
177. Lopes B.S., Hamouda J., Amyes F. Effect of frameshift mutagen acriflavine on control of resistance genes in *Acinetobacter baumannii* // *Journal of Medical Microbiology.* – 2011. – V. 60. – P. 211-215.
178. Fu Y., Zhang F., Zhang W., Chen X., Zhao Y. et all. Differential expression of bla (SHV) related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumonia* // *Int J Antimicrob Agents.* – 2007. – V. 29. - № 3. – P. 344-7.
179. Enne V.I., Delsol A.A., Roe J.M., Bennett P.M. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli* // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006. – V. 50. - № 9. – P. 3003-10.
180. Cai W., Fu Y., Zhang W., Chen X., Zhao J., Song W., Li Y., Huang Y., Wu Z., Sun R., Dong C., Zhang F. Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumonia* through inhibiting CTX-M-1 gene expression // *BMC Microbiology.* – 2016. – V. 16. – P. 181.
181. Emrich S.J., Barbazuk W.B., Li L., Schnable P.S. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing // *Genome Res.* – 2007. – V. 17. – P. 69–73.
182. Fan H.C., Fu G.K., Fodor S.P.A. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry // *Science.* – 2015. – V. 347. - № 6222. – P. 1258367.

183. Stark R., Grzelak M., Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years // *Nat Rev Genet.* - 2019. - V. 20. - № 11. - P. 631-656.
184. Jousset A.B., Chupin I.R., Takissian J., Glaser P., Bonnin R.A., Naas T. Transcriptional landscape of a bla KPC-2 plasmid and response to imipenem exposure in *Escherichia coli* TOP10 // *Front Microbiol.* - 2018. - V. 9. - P. 2929.
185. Long D., Zhu L.I., Du F., Xiang T., Wan L.G., Wei D., Zhang W., Liu Y. Phenotypical profile and global transcriptomic profile of Hypervirulent *Klebsiella pneumonia* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition // *BMC Genomics.* - 2019. - V. 20. - P. 480.
186. Ozsolak F., Platt A.R., Jones D.R., Reifengerger J.G., Sass L.E., McInerney P., Thompson J.F., Bowers J., Jarosz M., Milos P.M. Direct RNA sequencing // *Nature.* - 2009. - V. 461. - № 7265. - P. 814—818.
187. Kuo H.Y., Chang K.C., Kuo J.W., Yueh H.W., Liou M.L. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* // *International Journal of Antimicrobial Agents.* - 2012. - V. 39. - P. 33-38.
188. Coverc S., Caroff N., Espaze E., Marraillac J, Drugeon H., Reynaud A. Comparison of two RT-PCR methods for quantifying ampC specific transcripts in *Escherichia coli* strains // *FEMS Microbiology Letters.* - 2003. - V. 228. - P. 187-191.
189. Paltansing S., Kraakman M., Boxtel R., Kors I., Wesselts E., Goessens W., Tommassen J., Bernards A. Increased expression levels of chromosomal AmpC β -lactamase in clinical *Escherichia coli* isolates and their effect on susceptibility to Extended-spectrum cephalosporins // *Microbial Drug Resistance.* - 2014. - V.00. - P. 1-10.
190. Shakeel M, Rodriguez A, Tahir U B Jin F. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects // *Biotechnol Lett.* - 2018. - V. 40. - № 2. - P. 227-236.
191. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method // *Methods.* - 2001. - V. 25. - № 4. - P. 402.
192. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research // *Eur. J. Clin. Invest.* - 2017. - V. 47. - № 10. - P. 756.
193. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin Chem.* - 2009. - V. 55. - № 4. - P. 611-22.

194. Wang Y., Quc J., Baa Q., Donga J., Zhang L., Zhanga H., Wue A., Wangf D., Xia Z., Peng D., Shuf Y., Caoc B., Jiang T. Detection and typing of human-infecting influenza viruses in China by using a multiplex DNA biochip assay // *J. Virol. Methods.* - 2016. - V. 234. - P. 178.
195. 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.
196. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M., et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd // *Science.* – 1995. - V. 28. - № 269(5223). – P. 496-512.
197. Segundo-val I.S., Sanz-Lozano C.S. Introduction to gene expression analysis // *Methods Mol Biol.* – 2016. – V. 1434. – P. 29-43.
198. Katagiri F., Minnesota S.P. Overview of mRNA expression profiling using DNA microarrays // *Curr Protoc Mol Biol.* – 2009. – V. 22. – P. uit 22.4.
199. Domingues A., Munoz E., Lopez M.C., Martinez J.P., Vinas M. Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets // *Biotechnol Lett.* – 2017. -V. 39. - № 6. – P. 819-828.
200. Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays // *Bioessays.* – 1996. - V. 18. - № 5. – P. 427-31.
201. Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., Givskov M., Greenberg E.P., Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. - № 4. – P. 1175-1187.
202. Cummings J.E., Slayden R.A. Transient in vivo resistance mechanisms of *Burkholderia pseudomallei* to ceftazidime and molecular markers for monitoring treatment response // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2017. – V. 12,11. - № 1. – P. e0005209.
203. Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Edelstein M.V., Egorov A.M. Oligonucleotide microarrays with horseradish peroxidase-based detection for the identification of extended-spectrum β -lactamases // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2010. – V. 26. - P 1252-1260.
204. Naas T., Cuzon G., Truong H., Bernabeu S., Nordmann P. Evaluation of DNA microarray, the check-points ESBL/KPC Array, for rapid detection of TEM, SHV and CTX_M Extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. -V. 54. - № 8. – P. 3086-3092.
205. Cuzon G., Naas T., Bogaerts P., Glupczynski Y., Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-

- like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM) // *J Antimicrob Chemother.* – 2012. – V. 67. - № 8. – P. 1865-9.
206. Cohen Stuart J., 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. - № 6. – P. 809-812.
207. Endimiani A., Hujer K.M., Hujer A.M., Kurz S., Jacobs M.R., Perlin D.S., Bonomo R.A. Are we ready for novel detection methods to treat respiratory pathogens in hospital-acquired pneumonia? // *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 52. – P. S373-83.
208. Torres Fink I., Tormo Palop N., Borrás Salvador R., Buesa Gómez J., Gimeno Cardona C., Navarro Ortega D. Evaluation of the DNA microarray "AMR Direct Flow Chip Kit" for detection of antimicrobial resistance genes from Gram-positive and Gram-negative bacterial isolated colonies // *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* – 2019. – V. 37. - № 7. – P. 454-457.
209. Protonotariou E., Meletis G., Papadopoulou D., Kachrimanidou M., Toptsi L., Skoura L. Evaluation of the "AMR Direct Flow Chip Kit" DNA microarray for detecting antimicrobial resistance genes directly from rectal and nasopharyngeal clinical samples upon ICU admission // *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* – 2021. -V. 39. - № 6. – P. 276-278.
210. Galiana A., Coy J., Gimeno A., Guzman N.M., Rosales F., Merino E., Royo G., Rodríguez J.C. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections // *PLoS One.* - 2017. – V. 12. - № 5. – P. e0177627.
211. Rodríguez-Lucas C., Rodicio M.R., Costales I., Boga J.A., Vazquez F., Fernández J. Evaluation of Sepsis Flow Chip for identification of Gram-negative bacilli and detection of antimicrobial resistance genes directly from positive blood cultures // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2018. – V. 91. - № 3. – P. 205-209.
212. Rubtsova M.Y., Ulyashova M.M., Pobolelova Y.I., Presnova G.V., Egorov A.M. Biochip for the simultaneous identification of beta-lactamase and carbapenemase genes conferring bacterial resistance to beta-lactam antibiotics // *Applied Biochemistry and Microbiology.* - 2020. – V. 56. - № 2. - P. 130-140.
213. Уляшова М. М., Халилова Ю. И., Рубцова М. Ю., Эйдельштейн М. В., Александрова И. А., Егоров А. М. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D // *Acta Nature.* – 2010. – V. 2. - № 3. – P. 70-79.
214. Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Deygen I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. Novel non- β -lactam inhibitor of β -lactamase TEM-171 based on acylated phenoxyaniline // *Biochimie.* - 2017. - V. 132. - P. 45.

215. Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid // *Journal of clinical microbiology*. - 1994. - V. 32. - № 2. - P. 335.
216. Waley SG. A spectrophotometric assay of beta-lactamase action on penicillins // *Biochem J*. - 1974. -V. 139. - № 3. - P. 789-90.
217. Pobolelova Yu.I., Ulyashova M.M., Rubtsova M.Yu., Egorov A.M. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D // *Biochemistry (Moscow)*. - 2014. - V. 79. - № 6. - P. 566.
218. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* - 1973. - V. 241. - P. 20-22.
219. Presnova G.V., Rubtsova M.Yu., Presnov D.E., Grigorenko V.G., Yaminsky I.V., Egorov A.M. Streptavidin conjugates with gold nanoparticles for visualization of single DNA interactions on the silicon surface // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* - 2014. - V. 8. - P. 164-167.
220. Lamture J.B., Beattie K.L., Burke B.E., Eggers M.D., Ehrlich D.J., Fowler R., Hollis M.A., Kosicki B.B., Reich R.K., Smith S.R. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - V. 22. - P. 2121-2125.
221. Adobe® RGB (1998) Color Image Encoding. San Jose, CA: ADOBE SYSTEMS INCORPORATED. - 2005. - P. 1-20.
222. Kumar S., Kumar D., Ahirwar R., Nahar P. Exploring the flexible chemistry of 4-fluoro-3-nitrophenyl azide for biomolecule immobilization and bioconjugation // *Anal Bioanal Chem.* - 2016. -V. 408. - № 25. - P. 6945-56.
223. Gong S., Li J., Pan W., Li N., Tang B. Duplex-Specific Nuclease-Assisted CRISPR-Cas12a Strategy for MicroRNA Detection Using a Personal Glucose Meter // *Anal Chem.* - 2021. - V. 93. - № 30. - P. 10719-10726.
224. Zhang D., Wu C., Luan C., Gao P., Wang H., Chi J., Kong T. Distance-based quantification of miRNA-21 by the coffee-ring effect using paper devices // *Mikrochim Acta.* - 2020. -V. 187. - № 9. - P. 513.
225. Jiang Y., Zhang S., Qin H., Meng S., Deng X., Lin H., Xin X., Liang Y., Chen B., Cui Y., Su Y., Liang P., Zhou G., Hu H. Establishment of a quantitative RT-PCR detection of SARS-CoV-2 virus // *Eur J Med Res.* - 2021. - V. 26. - № 1. - P. 147.
226. Sanders R., Bustin S., Huggett J., Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR // *Biomol Detect Quantif.* - 2018. - V. 15. - P. 13-17.
227. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and d problems // *J. Mol. Endocrinol.* - 2002. - V. 29. - P. 23.

228. Group, Huggett J.F. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020 // Clin Chem. – 2020. – V. 66. - № 8. – P. 1012-1029.
229. Vatansever C., Ozer B., Atac N., Guler O.U., Kilicoglu B.K., Berkkan M., Baskurt D., Sever E., Dogan O., Can F. Efficacy of Amikacin and Meropenem on Colistin-Induced *Klebsiella pneumoniae* Persists // Microb Drug Resist. – 2022. – V. 28. - № 7. – P. 765-772.