

УДК 577.113.5, 577.151.4

Олигонуклеотидный микрочип для идентификации генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D

М. М. Уляшова¹, Ю. И. Халилова¹, М. Ю. Рубцова^{1,2*}, М. В. Эйдельштейн³,
И. А. Александрова⁴, А. М. Егоров¹

¹ Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

² ЗАО «НПП ИММУНОТЕХ», 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11А

³ НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленская государственная медицинская академия, 214019, Смоленск, а/я 5

⁴ НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., д. 16

*E-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 23.08.2010 г.

РЕФЕРАТ Разработан метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах для одновременной идентификации и типирования генов, кодирующих ферменты карбапенемазы, продуцируемые микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний. Метод состоит из нескольких этапов, включающих выделение ДНК из клинического образца, амплификацию генов карбапенемаз методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным включением биотина в качестве метки, гибридизацию меченого ПЦР-продукта с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности ДНК-микрочипа на основе нитроцеллюлозы. Молекулы биотина в ДНК-дуплексах выявляются конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена с последующей колориметрической детекцией фермента. Был выполнен дизайн олигонуклеотидных зондов и оптимизированы условия гибридизационного анализа на мембранных микрочипах для идентификации семи типов генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D с дополнительным типированием на подгруппы. Тестирование микрочипов проводили с использованием контрольных штаммов микроорганизмов, несущих гены карбапенемаз, охарактеризованных методом секвенирования. Разработанный метод гибридизационного анализа применен для исследования клинических штаммов *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp., продуцирующих карбапенемазы различных классов по данным фенотипических тестов. Все штаммы *Acinetobacter baumannii*, резистентные к карбапенемам, являлись носителями генов двух ОХА-карбапенемаз (ОХА-51 в сочетании с ОХА-23 (1 штамм), ОХА-40 (5 штаммов) или ОХА-58 (4 штамма)). У всех резистентных к карбапенемам штаммов *Pseudomonas aeruginosa* был обнаружен ген металло-β-лактамазы VIM-2-типа. При тестировании штаммов, чувствительных к карбапенемам, гены карбапенемаз не обнаружены. Метод идентификации генов карбапенемаз на микрочипе характеризуется хорошей точностью и производительностью. Он может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для идентификации и изучения эпидемиологии карбапенемаз.

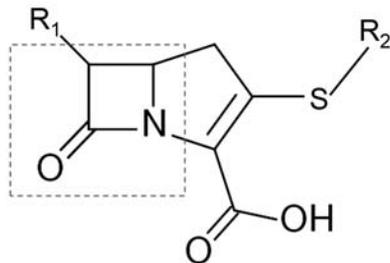
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-микрочипы, пероксидаза хрена, колориметрическая детекция, антибиотикорезистентность, карбапенемазы.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 20 лет β-лактамы антибиотиков прочно удерживают одно из лидирующих положений в лечении широкого круга тяжелых инфекций, вызываемых грамотрицательными микроорганизмами. Среди них одной из наиболее удачных групп антибактериальных препаратов являются карбапенемы, химическая структура которых изображена на рис. 1. Действие этой группы антибиотиков характеризуется широким спектром активности, низкой

токсичностью, хорошими фармакокинетическими параметрами [1]. Вместе с тем эффективность их применения в последнее время ограничена вследствие развития антибиотикорезистентности, или устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков. Устойчивые к карбапенемам штаммы микроорганизмов наиболее часто встречаются у возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций, относящихся к родам *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. В лечебных учреждениях РФ также отмечается

Рис. 1. Химическая структура карбапенемов. β -Лактамное кольцо обозначено пунктиром.



заметный рост числа возбудителей, нечувствительных к действию карбапенемов, среди *Pseudomonas aeruginosa* число таких штаммов составляет уже 38% [2].

Формирование резистентности к β -лактамам антибиотикам у представителей грамотрицательных бактерий может быть связано с различными механизмами, включающими изменение проницаемости наружной клеточной мембраны из-за возникновения дефектов пориновых каналов [3, 4], активацией систем эффлюкса [5], однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция бактериальных ферментов, гидролизующих β -лактаманное кольцо антибиотиков – β -лактамаз [6, 7]. В настоящее время известные β -лактамазы разделяют по структуре первичной последовательности белка на четыре молекулярных класса – А, В, С и D. Ферменты классов А, С и D относятся к гидролазам серинового типа, ферменты класса В являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся один или два атома цинка [8]. Карбапенемазной активностью обладают представители разных молекулярных классов β -лактамаз, однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются карбапенемазы КРС-типа из молекулярного класса А [9], пяти групп металло- β -лактамаз (VIM, IMP, SPM, GIM, SIM) [10], а также ряд ферментов ОХА-типа из молекулярного класса D (подгруппы ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58) [11].

Из всего многообразия β -лактамаз именно карбапенемазы представляют собой наибольшую угрозу, так как обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все классы β -лактаманых антибиотиков. Вследствие плазмидной локализации генов распространение карбапенемаз среди возбудителей инфекционных заболеваний человека происходит достаточно быстро. В связи с многообразием и опасностью широкого распространения карбапенемаз необходимы надежные методы выявления продукции ферментов данного типа как для выбора оптимального способа лечения пациентов, так и для эпидемиологического контроля за распространением данного типа антибиотико-

резистентности. В настоящее время для этих целей в основном используются микробиологические тесты [6, 12, 13]. Однако они длительны и часто малоэффективны при определении типа карбапенемаз. Трактовка их результатов не всегда однозначна, особенно в случаях, когда наблюдается продукция нескольких типов β -лактамаз одновременно. Определение ферментов ОХА-типа с помощью фенотипических тестов практически невозможно [14].

Предложено несколько методов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации генов металло- β -лактамаз, принадлежащих к наиболее распространенным группам – VIM и IMP [15, 16], основных подгрупп карбапенемаз ОХА-типа [17]. Разработан метод мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления полученных ампликонов для идентификации генов 5 групп металло- β -лактамаз [18]. Однако мультиплексная способность метода ПЦР, как правило, ограничена, что не позволяет одновременно детектировать большое количество генов.

Перспективным методом идентификации как с точки зрения времени получения результата анализа, так и его информативности является метод гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах. Данная технология имеет значительные преимущества перед традиционными методами, так как позволяет проводить многопараметрический анализ, а также миниатюризировать исследуемый образец, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения [19, 20].

Целью данной работы являлась разработка метода гибридизационного анализа на мембранных ДНК-микрочипах с колориметрической детекцией для определения генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Набор праймеров для амплификации генов карбапенемаз и аминомодифицированные олигонуклеотидные зонды были синтезированы фирмой «Синтол» (Москва, Россия). Образцы бактериальной ДНК, выделенные из контрольных штаммов *A. baumannii*, *Ps. aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51, ОХА-58, КРС-3, предоставлены сотрудниками НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Культуры клеток микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae, *A. baumannii* и *Ps. aeruginosa*, чувствительные и устойчивые к действию карбапенемов по данным фенотипического определения на автоматическом анализаторе VITEK (BioMerieux, Фран-

ция), предоставлены сотрудниками НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.

Выделение бактериальной ДНК

Выделение бактериальной ДНК из суспензии культуры исследуемого микроорганизма, содержащей не менее 10^5 КОЕ/мл, проводили с помощью температурного лизиса в буфере. Для этого 500 мкл суспензии помещали в центрифужные пробирки и осаждали микробные клетки центрифугированием в течение 1 мин при 10000 *g*. Супернатант удаляли, добавляли 100 мкл буфера (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 7.5) и ресуспендировали осадок с помощью шейкера. Пробирки инкубировали в твердотельном термостате в течение 20 мин при 99°C. После термостатирования образцы центрифугировали в течение 1 мин при 10000 *g*. Для ПЦР использовали 1 мкл супернатанта.

Аmplификация генов карбапенемаз методом мультиплексной ПЦР с одновременным введением биотина в качестве метки

Аmplификацию фрагментов генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D с одновременным включением биотина в качестве метки проводили в процессе двух мультиплексных ПЦР (в одной реакции амплифицировались гены всех групп металло-β-лактамаз, а в другой – гены β-лактамаз ОХА- и КРС-типов). Каждая мультиплексная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 10 мМ Трис-НСl-буфер с 2.5 мМ ацетата магния, 50 мМ КСl, pH 8.3, 2.5 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, 60 мкМ dTTP, 40 мкМ dUTP-11-биотин (Fermentas, Германия), по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров для каждой группы карбапенемаз и 1 мкл раствора матрицы ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C (2 мин), 25 циклов амплификации (20 с – денатурация при 94°C, 30 с – отжиг праймеров при 65°C, 1 мин – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации при 72°C (6 мин). Горизонтальный электрофорез продуктов ПЦР проводили в геле 1% агарозы с использованием ТАЕ-буфера (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, pH 8.5) и с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 1.6 мкг/мл. Визуализацию проводили на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Фрагментация ПЦР-продуктов

Фрагментацию ДНК проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Для этого амплифицированную ДНК растворяли до конечной концентрации 30 нг/мкл в реакционном буфере (40 мМ Трис-НСl,

10 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂, pH 8.0) и добавляли ДНКазу I (Promega, Германия). Реакцию останавливали, добавляя 3 мМ ЭДТА и инкубируя 10 мин при 65°C.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов на мембранном ДНК-микрочипе

В качестве мембранного носителя для ДНК-микрочипов использовали нитроцеллюлозу BioTrace NT (Pall Corporation, США). Модификация мембран осуществлялась с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиды (Sigma, США) по методике, описанной в [21]. Для иммобилизации олигонуклеотиды растворяли в солевом буфере (160 мМ Na₂SO₄, 130 мМ Na₂HPO₄) до концентрации 20 мкМ и наносили роботом XactII™ Arrayer (LabN-EXT Inc., США) с иглами диаметром 300 мкм на мембраны, после чего мембраны инкубировали в термостате при 60°C в течение 30 мин.

Гибридизация на ДНК-микрочипе

Перед проведением гибридизации микрочипы отмывали буфером ФСБТ (0.01 М K₂HPO₄, 0.15 М NaCl, 0.05% Твин-20, pH 7.0) 2 раза по 10 мин при комнатной температуре и блокировали в растворе 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1% казеина (Sigma, США) в буфере ФСБ (0.01 М K₂HPO₄, 0.15 М NaCl, pH 7.0) при 37°C в течение 30 мин. 500 нг фрагментированной меченой ДНК растворяли в гибридизационном буфере 2x SSPE (0.3 М NaCl, 0.02 М NaH₂PO₄, 2 мМ ЭДТА, pH 7.4), содержащем 1.6 пмоль/мл контрольного олигонуклеотида, меченного биотином (положительный контроль гибридизации). Микрочип помещали в гибридизационную смесь (300 мкл на 1 микрочип) и инкубировали в течение 1 ч при 45°C в термомиксере Thermomixer comfort (Eppendorf, Германия). После гибридизации проводили отмывку мембран ФСБТ – 2 раза по 15 мин при комнатной температуре.

Детекция и обработка результатов гибридизации

Для детекции результатов гибридизации микрочипы инкубировали в ФСБТ, содержащем конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (Имтек, Россия) в концентрации 0.2 мкг/мл в ФСБТ, в течение 30 мин при 37°C. Далее микрочипы отмывали ФСБТ 10 мин, ФСБ 10 мин при комнатной температуре при перемешивании и помещали на 10 мин в субстратный раствор на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и H₂O₂ (НВО Иммунотех, Россия) с добавлением декстрасульфата натрия (M_r = 8000, Pharmacia, Швеция) до конечной концентрации 0.5% (по массе), после чего их промывали дистиллированной водой и сушили на воздухе. Мембранные микрочипы сканировали на сканере Perfection V750 Pro (Epson, Германия)

при разрешении 4800 dpi. Полученные изображения (в TIFF-формате) анализировали с использованием программы Scan Array Express (PerkinElmer, version 3.0, Германия) и определяли значения интенсивностей аналитических сигналов в различных участках микрочипа. Далее значения абсолютных интенсивностей сигналов переводили в относительные нормированием на усредненную интенсивность положительного контроля гибридизации на данном микрочипе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный дизайн олигонуклеотидных зондов

На настоящий момент в Международном банке данных GenBank имеется информация о 10 ферментах КРС-типа, 52 металло-β-лактамазах (23 фермента из группы IMP, 26 – из группы VIM и по одному представителю из групп SPM, SIM и GIM), а также 70 карбапенемазах из группы ОХА. Выравнивание аминокислотных и кодирующих последовательностей данных ферментов показало, что лишь ферменты группы КРС имеют высокую степень гомологии внутри группы (отличаются друг от друга наличием 1–2 аминокислотных замен), тогда как многочисленные представители групп IMP, VIM и ОХА отличаются друг от друга по своим последовательностям достаточно сильно. В связи с этим каждую из этих групп дополнительно разделили на подгруппы, внутри которых гены ферментов по своим нуклеотидным последовательностям имели высокую степень гомологии. Так, в группе VIM было выделено 3 подгруппы

ферментов (VIM-1, VIM-2 и VIM-7), в группе IMP – 6 подгрупп (IMP-1, IMP-2, IMP-5, IMP-11, IMP-12 и IMP-14), а карбапенемазы группы ОХА были разделены на 4 подгруппы – ОХА-23, ОХА-40, ОХА-51 и ОХА-58. Разделение карбапенемаз на группы и подгруппы на основании выравнивания аминокислотных последовательностей и их соответствие молекулярным классам β-лактамаз приведены на рис. 2.

Основным этапом разработки ДНК-микрочипа являлся выбор последовательностей олигонуклеотидных зондов для определения генов карбапенемаз различных групп. Выбор последовательностей олигонуклеотидов для идентификации группы ферментов осуществлялся на основе выравнивания кодирующих последовательностей генов всех карбапенемаз, принадлежащих к данной группе. Для этого находили достаточно протяженный участок гена, последовательность которого была консервативна для всех представителей группы и содержала не менее 18 нуклеотидов. Для них рассчитывали температуру плавления, G/C-состав и свободную энергию образования димеров и вторичных структур. Для гибридизационного анализа на микрочипах отбирали олигонуклеотиды, для которых вероятность образования вторичных структур была минимальна и температуры плавления различались не более чем на 10°C. На основе выбранных последовательностей синтезировали по два олигонуклеотидных зонда, последовательность которых была комплементарна прямой и обратной цепи гена. Для дополнительного типирования генов IMP, VIM и ОХА карбапенемаз на уров-

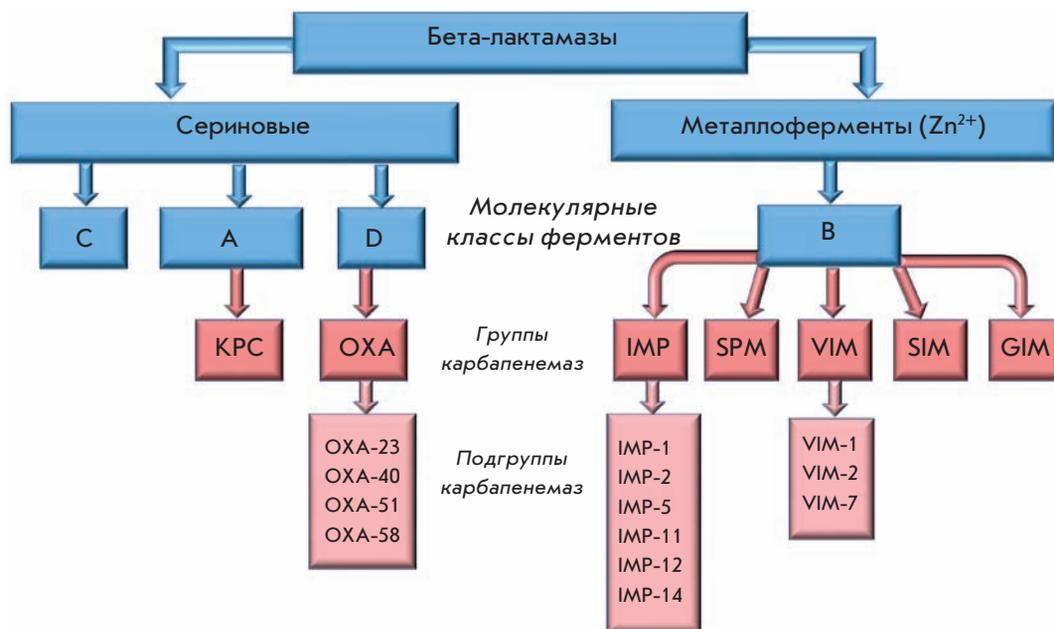


Рис. 2. Разделение карбапенемаз на группы и подгруппы на основании выравнивания аминокислотных последовательностей и их соответствие молекулярным классам β-лактамаз.

не подгрупп последовательности олигонуклеотидных зондов выбирали на основе гомологичных участков генов, не содержащих мутаций внутри данной подгруппы и не имеющих гомологии с генами других подгрупп. Чтобы повысить специфичность анализа, для идентификации каждой подгруппы ферментов выбирали по два варианта олигонуклеотидных зондов, соответствующих разным участкам гена. В этом случае синтезировали зонды, последовательность которых была комплементарна обратной цепи гена.

Последовательности выбранных олигонуклеотидов и их основные характеристики представлены в *табл. 1*. Длина зондов варьировала от 18 до 27 нуклеотидов, G/C-состав – от 30 до 60%, температура плавления – в диапазоне 63–72°C. Во все зонды были введены дополнительные спейсеры на 5'-конце, удаляющие зонд от поверхности носителя, что позволило снизить стерические затруднения при гибридизации и повысить доступность зонда для ДНК-мишени. Было установлено, что оптимальным является использование спейсера из 13 тимидиновых остатков, добавление дополнительных остатков тимидина не оказало существенного влияния на величину получаемых абсолютных гибридизационных сигналов и специфичность гибридизации (данные не приводятся).

Аmplификация генов карбапенемаз различных молекулярных классов с одновременным включением метки

Для амплификации генов карбапенемаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D, разрабатывали метод мультиплексной ПЦР с одновременным введением метки – биотина. Для введения метки использовали меченный биотином дезоксирибоуринтрифосфат (dUTP), который включался в цепь ДНК одновременно с немеченым дезоксириботимидинтрифосфатом (dTTP). В качестве матрицы для ПЦР использовали бактериальную ДНК, выделенную из контрольных штаммов микроорганизмов-продуцентов β-лактамаз VIM-1, VIM-2, VIM-7, IMP-1, IMP-2, SPM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58 и KPC-3.

Выбор праймеров для амплификации генов карбапенемаз различных групп осуществлялся на основе ранее выполненного выравнивания кодирующих последовательностей генов ферментов данных групп. В качестве праймеров для амплификации полноразмерных генов карбапенемаз группы KPC и металло-β-лактамаз групп SPM, SIM и GIM выбирались консервативные для группы участки последовательностей, расположенные на концах генов. Для металло-β-лактамаз групп IMP, VIM и карбапенемаз OXA-типа консервативные участки на концах

генов длиной более 20 п.н. найти не удалось в связи с низкой гомологией ферментов внутри данных групп, поэтому праймеры были выбраны отдельно для каждой подгруппы.

Длина праймеров (20 – 28 нуклеотидов) подбиралась таким образом, чтобы температура плавления была в диапазоне 62 – 68°C, что позволяло бы одновременно амплифицировать все типы генов с одинаковой эффективностью. При выборе структур праймеров учитывали G/C-состав и отбирали структуры, для которых содержание G/C находилось в диапазоне 30 – 60%. Также оценивали вероятность образования праймер-димеров и вторичных структур и выбирали те последовательности, для которых такая вероятность была минимальна. В результате, для каждой группы ферментов было выбрано по несколько прямых и обратных праймеров, различающихся по своим параметрам. Их различные комбинации были проверены в ПЦР в условиях амплификации специфических для них генов, и пара праймеров, позволяющая получить наиболее специфические ПЦР-продукты с хорошим выходом реакции, была использована в дальнейшем для мультиплексной ПЦР. Последовательности данных праймеров представлены в *табл. 2*.

Для выбора температуры отжига праймеров для мультиплексной амплификации всех типов генов карбапенемаз сначала определяли оптимальные температуры отжига (T_a) для каждой пары праймеров отдельно в условиях специфических реакций, затем для мультиплексной ПЦР в качестве T_a выбирали наименьшую. Диапазон значений исследуемых T_a праймеров составил 52 – 68°C. Оптимальной T_a оказалась температура 60°C, при которой для всех типов генов наблюдался эффективный синтез только специфических ПЦР-продуктов.

После оптимизации условий амплификации генов карбапенемаз с выбранными праймерами была исследована возможность проведения мультиплексной ПЦР с 16 парами праймеров для одновременной амплификации генов карбапенемаз всех рассматриваемых групп. Однако в этих условиях для большинства карбапенемаз специфический продукт амплификации отсутствовал либо выход продукта амплификации был очень низким, что делало невозможным последующее проведение гибридизационного анализа на микрочипах. Поэтому было решено проводить амплификацию генов карбапенемаз в процессе двух мультиплексных ПЦР: одну – со смесью праймеров для металло-β-лактамаз (11 пар праймеров), а другую – со смесью праймеров для OXA и KPC карбапенемаз (5 пар праймеров). Результаты электрофоретического разделения ПЦР-продуктов, полученных при амплификации генов различных карбапенемаз

Таблица 1. Последовательности специфических и контрольных олигонуклеотидных зондов

Название	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Длина, нуклеотиды	G/C, %	T _{пл} , °C
Контрольные олигонуклеотиды				
Контроль иммобилизации	TCTAGACAGCCACTCATA-Биотин	18	44.4	60.4
Положительный контроль гибридизации	GATTGGACGAGTCAGGAGC	19	57.9	66.1
Отрицательный контроль гибридизации	TCTAGACAGCCACTCATA	18	44.4	60.4
Олигонуклеотидные зонды для определения группы карбапенемаз				
KPC_прямой	GCTTCCCCTGTGCAGCTCATTC	23	56.5	72.0
KPC_обратный	GAATGAGCTGCACAGTGGGAAGC	23	56.5	72.0
VIM_прямой	GGAGATTGAAAAGCAAATTGGACT	24	37.5	66.6
VIM_обратный	AGTCCAATTTGCTTTTCAATCTCC	24	37.5	66.6
IMP_прямой	GGAATAGAGTGGCTTAATTCCTCG/A	23	41.3	64.7
IMP_обратный	C/TGAGAATTAAGCCACTCTATTCC	23	41.3	64.7
SPM_прямой	GATGGGACCGTTGTCATTG	19	52.6	64.9
SPM_обратный	CAATGACAACGGTCCCATC	19	52.6	64.9
SIM_прямой	CCTTGGCAATCTAAGTGACGCAA	23	47.8	69.7
SIM_обратный	TTGCGTCACTTAGATTGCCAAGG	23	47.8	69.7
GIM_прямой	CACACTGGGAAATGGGCTTATA	22	45.5	66.7
GIM_обратный	TATAAGCCATTTCCAGTGTG	22	45.5	66.7
OXA_прямой	CCACAA/GGTG/AGGC/TTGGTTG/AAC	20	55.0	67.0
OXA_обратный	GTC/AAACCAG/ACCC/ТАСТ/СТGTGG	20	55.0	67.0
Олигонуклеотидные зонды для определения подгруппы карбапенемаз				
VIM-1_568	TCAGCGAACGTGCTATACGG	20	55.0	68.3
VIM-1_590	GTTGTGCCGTTTCATGAGTTGT	21	47.6	67.9
VIM-2_568	TCTGCGAGTGTGCTCTATGG	20	55.0	67.9
VIM-2_590	GTTGTGCCGATTTATGAGTTGT	21	38.1	63.7
VIM-7_127	GTTCGGCTGTACAAGATTGGCG	22	54.5	70.0
VIM-7_181	CTCGGTGACACGGTGTAC	18	61.1	65.8
IMP-1_135	GTGGGGCGTTGTTCCATAACATG	23	52.2	70.2
IMP-1_387	GGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGC	25	40.0	67.8
IMP-2_264	TCAAAGGCACTATTTCCCTCACATTC	26	38.5	68.2
IMP-2_497	TACCTGAAAAGAAAATTTTATTTCGGTG	27	29.6	65.7
IMP-5_506	AATAGAGTTTTGTTCCGGTGGTT	22	36.4	65.0
IMP-5_459	TGGTCCAGGGCACACTCC	18	66.7	70.4
IMP-11_570	TGTTGAAGCATGGCCACATT	20	45.0	67.6
IMP-11_621	TGCAAAACTGGTTGTTCCAAGCC	23	47.8	70.9
IMP-12_226	AAATTAGTTGCTTGGTTTGTAGGG	24	37.5	66.4
IMP-12_495	GCTACCTGAAAACAAAATTTTATTTCG	26	30.8	64.8
IMP-14_292	GGTGACAGTACGGCTGGAATAG	22	54.5	68.4
IMP-14_374	AAAAAGACAATAAGGTACAAGCTA	24	29.2	63.4
OXA-23_225	AAATACAGAATATGTGCCAGCCTCT	25	40.0	68.8
OXA-23_309	GAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTAC	24	45.8	68.0
OXA-40_225	AAATAAAGAATATGTCCCTGCATCA	25	32.0	65.6
OXA-40_329	GAACTTATCCTATGTGGGAGAAAG	24	41.7	64.8
OXA-51_225	TTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCG	25	52.0	71.7
OXA-51_578	GCCCAAAAGTCCAAGATGAAG	21	47.6	65.8
OXA-58_225	AAAAACAGCTTATATTCCTGCATCT	25	32.0	66.0
OXA-58_206	GCACGCATTTAGACCGAGC	19	57.9	67.7

Таблица 2. Последовательности праймеров для мультиплексных ПЦР-амплификаций генов карбапенемаз

Тип		Последовательность 5'→3'	Длина, нуклеотид	G/C, %	T _{пл} , °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.
KPC	прямой	TTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGG	23	47.8	64.7	801
	обратный	CCTCGCTGTGCTTGTTCATCC	20	60.0	65.7	
IMP-1	прямой	GGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTTG	25	40.0	64.4	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGTGATGCGTCTCC	26	46.2	65.6	
IMP-2	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACATCGTTCG	25	40.0	63.8	584
	обратный	GTACGTTTCAAGAGTGATGCGTCCCC	26	53.8	67.8	
IMP-5	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACTTCGTTTG	25	36.0	62.5	584
	обратный	GTACGTTTCAAGAGTGATACATCTCC	26	42.3	63.4	
IMP-11	прямой	GGTGTTTATGTTTCATACATCGTTTG	25	36.0	62.6	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGCGACGCATCTCC	26	53.8	67.8	
IMP-12	прямой	GGTGTTTATCTTCATACATCTTTTG	25	32.0	60.5	584
	обратный	GTAAGTTTCAAGAGTGATGCGTCTCC	26	46.2	66.0	
VIM-1	прямой	GTAGTTTATTTGGTCTACATGACCGCGTC	28	46.4	66.9	743
	обратный	CGCTGTGTGCTGGAGCAAGTC	21	61.9	68.1	
VIM-2	прямой	GTAAGTTATTTGGTCTATTTGACCGCGTC	28	42.9	65.9	743
	обратный	CGTTGTGTGCTTGAGCAAGTC	21	52.4	64.7	
VIM-7	прямой	AGCATATTTCCGCACAGCCTGG	21	57.1	67.5	685
	обратный	CCGGCGGTCTGGAATTGCTC	21	66.7	67.7	
SPM	прямой	CGTTTTGTTTGTGCTCGTTGCGGG	25	52.0	67.4	648
	обратный	CCTTCACATTGGCATCTCCCAGATAAC	27	48.1	67.2	
SIM	прямой	GTTTGCAGGAAGAAGCCCAGCC	21	61.9	68.6	613
	обратный	CTCCGATTTCACTGTGGCTTGGG	23	56.5	67.6	
GIM	прямой	CTTGTAGCGTTGCCAGCTTTAGCTC	25	52.0	67.8	638
	обратный	CTGAACTTCCAACTTTGCCATGCC	24	50.0	66.9	
OXA-23	прямой	GAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAG	25	48.0	65.8	686
	обратный	GGCATTCTGACCGCATTTCC	21	52.4	64.8	
OXA-40	прямой	GTTTCTCTCAGTGCATGTTTCATC	23	43.5	62.3	714
	обратный	CATTTCTAAGTTGAGCGAAAAGGGG	25	44.0	64.6	
OXA-51	прямой	CGAAGCACACACTACGGGTG	20	60.0	65.4	649
	обратный	CTCTTTTCGAACAGAGCTAGGTATTC	26	42.3	63.4	
OXA-58	прямой	CTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTC	24	45.8	63.3	684
	обратный	CCACTTGCCCATCTGCCTTTTC	22	54.5	66.5	

из контрольных штаммов микроорганизмов, представлены на рис. 3.

Выход меченых специфических продуктов мультиплексных ПЦР для всех типов исследуемых карбапенемаз составил 40–50 нг/мкл, что являлось достаточным для дальнейшего проведения гибридного анализа на микрочипах. Амплификация неспецифических продуктов наблюдалась только для генов подгрупп VIM-1 и VIM-2, однако выход их был небольшим, и, как показали последующие экс-

перименты, их наличие не влияло на специфичность гибридного анализа.

Олигонуклеотидный микрочип для определения генов карбапенемаз молекулярных классов А, В и D
ДНК-микрочип для идентификации основных типов карбапенемаз представлял собой нитроцеллюлозную подложку размером 6.0 x 9.5 мм, на которой в определенном порядке были иммобилизованы 40 олигонуклеотидных зондов (14 зондов для идентификации генов

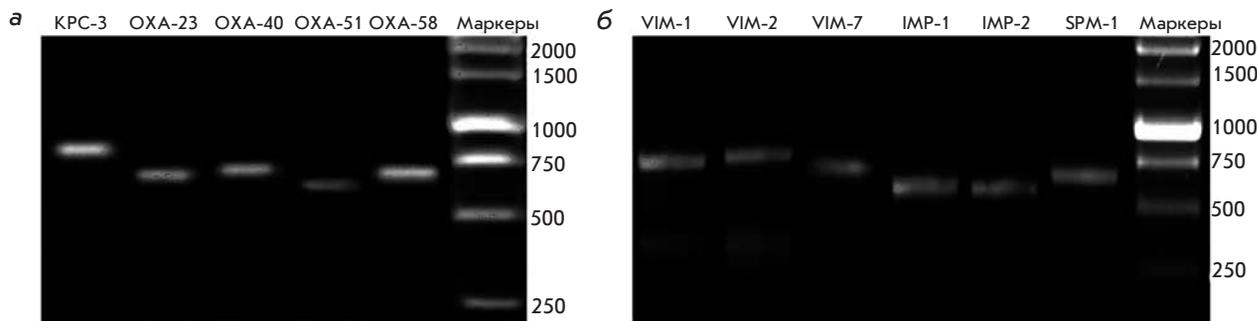


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов мультиплексных ПЦР для амплификации генов карбапенемаз ОХА- и КРС-типов (а) и металло-β-лактамаз (б).

7 различных групп карбапенемаз и 26 зондов для дополнительного типирования генов на подгруппы). Также каждый микрочип содержал 3 типа контрольных олигонуклеотидов: контроль иммобилизации (олигонуклеотид, меченный биотином), положительный контроль гибридизации (олигонуклеотид, нуклеотидная последовательность которого комплементарна меченному биотином олигонуклеотиду, добавляемому к гибридизационной смеси), отрицательный контроль гибридизации (олигонуклеотид со случайной последовательностью оснований). Для повышения воспроизводимости анализа каждый олигонуклеотидный зонд наносился на микрочип в трех повторах. Схема расположения специфических и контрольных олигону-

клеотидных зондов на поверхности ДНК-микрочипа изображена на рис. 4.

Процесс идентификации генов карбапенемаз методом гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе состоял из следующих этапов: 1) амплификации гена β-лактамазы из клинического материала ДНК в процессе двух мультиплексных ПЦР; 2) гибридизации меченной биотином ДНК с олигонуклеотидными зондами на поверхности микрочипа; 3) детекции результатов гибридизации с использованием конъюгата стрептавидин-пероксидаза с последующей колориметрической детекцией фермента.

Нами была проведена оптимизация условий гибридизации. Диапазон исследованных температур

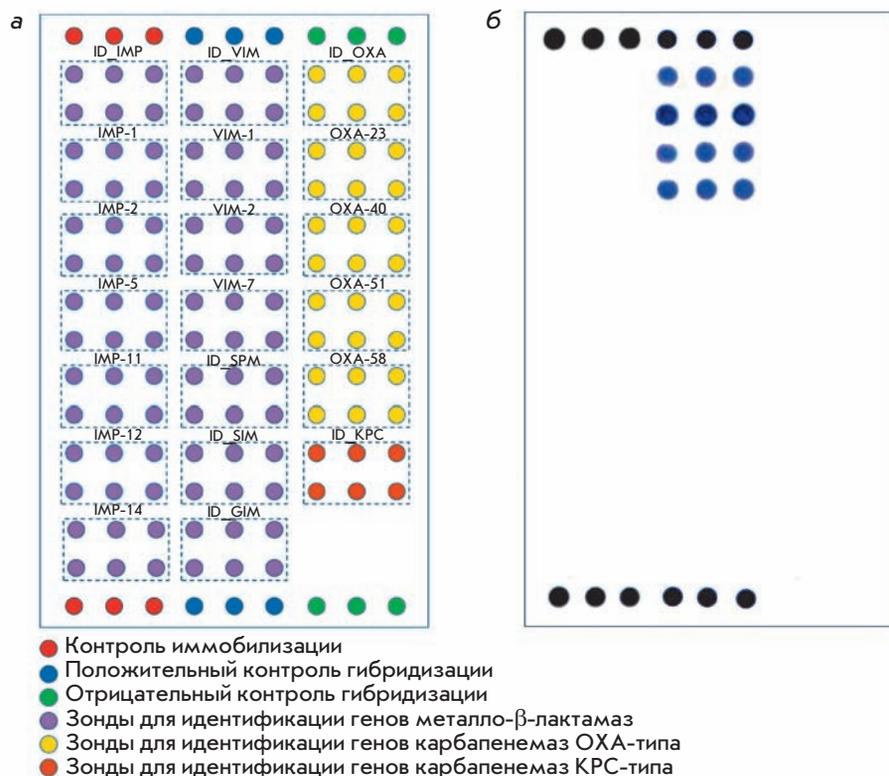


Рис. 4. а – Схема расположения специфических и контрольных олигонуклеотидных зондов на поверхности ДНК-микрочипа для определения генов карбапенемаз классов А, В и D. б – Результат гибридизационного анализа на ДНК-микрочипе контрольного образца *Ps. aeruginosa*, продуцирующего карбапенемазу VIM-1.

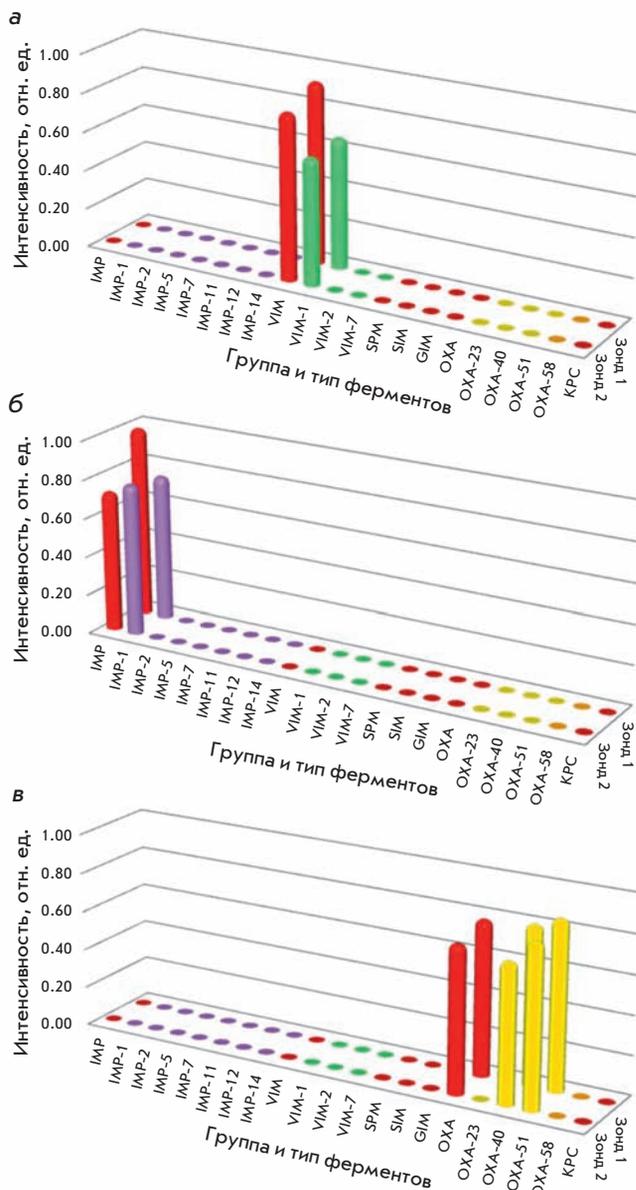


Рис. 5. Результаты гибридационного анализа на ДНК-микрочипе контрольных образцов *Ps. aeruginosa* (а, б) и *A. baumannii* (в), продуцирующих карбапенемазы VIM-1 (а), IMP-1 (б), OXA-51 и OXA-40 (в).

гибридизации составил от 40 до 50°C: он не превышал температуру плавления ($T_{пл}$) отдельных олигонуклеотидных зондов и ограничивался температурой, при которой наблюдали высокий уровень неспецифической гибридационной. При проведении гибридационной при температуре 40°C интенсивность сигналов была достаточно высокой, однако при этом для большинства зондов наблюдали перекрестную гибридационную с фрагментами генов других карбапенемаз. При проведении гибридационной при 50°C интенсивность гибридационных сигналов была низкой для многих

зондов. Поэтому в качестве оптимальной температуры для проведения гибридационной была выбрана температура, равная 45°C. В качестве гибридационного буфера использовали буфер 2x SSPE с добавлением 0.2 % додецилсульфата натрия для улучшения смачиваемости мембраны.

Критическим параметром, определяющим эффективность гибридационной, оказался размер меченой ДНК-мишени. Гибридационная меченых ПЦР-продуктов, размер которых составлял 580–800 нуклеотидов, с соответствующими олигонуклеотидными зондами характеризовалась сигналами небольшой интенсивности. Дополнительная фрагментация с помощью ДНКазы до фрагментов размером 50–150 нуклеотидов приводила к значительному увеличению интенсивности гибридационных сигналов практически для всех зондов.

Оптимизация времени гибридационной была проведена в диапазоне от 0.5 до 4.0 ч. Было показано, что реакция гибридационной меченой биотином ДНК с иммобилизованными на микрочипе зондами достигает состояния равновесия в течение 2 ч при интенсивном перемешивании. Также было установлено, что при проведении реакции гибридационной в кинетическом режиме (1 ч) интенсивность регистрируемых сигналов незначительно ниже равновесных значений (на 10 – 20% в зависимости от типа зонда), при этом специфичность анализа сохранялась на хорошем уровне, что позволяло достоверно идентифицировать наличие генов всех типов карбапенемаз в гибридационной смеси.

На рис. 5 приведены результаты тестирования на ДНК-микрочипе контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих металло-β-лактамазы VIM-1 и IMP-1 и карбапенемазы OXA-51 и OXA-40. Идентификацию группы β-лактамазы проводили по интенсивности гибридационной с групп-специфическим зондом, дополнительное типирование проводили по интенсивности гибридационной с подгрупп-специфическими зондами. К преимуществам метода гибридационного анализа на микрочипах можно отнести возможность одновременной детекции нескольких генов, что было продемонстрировано при тестировании карбапенемаз OXA-типа, продуцируемых контрольным штаммом *A. baumannii*.

Тестирование клинических штаммов микроорганизмов, устойчивых к действию карбапенемов

Разработанный ДНК-микрочип был апробирован на клинических штаммах грамотрицательных микроорганизмов, устойчивых и чувствительных к действию карбапенемов по данным фенотипирования. В табл. 3 представлены результаты тестирования 28 клинических штаммов *Ps. aeruginosa*, *A. baumannii*

Таблица 3. Результаты тестирования клинических образцов на ДНК-микрочипе

Тип микроорганизма	Чувствительность к карбапенемам по данным фенотипирования	Число образцов	Типы найденных карбапенемаз				
			ОХА-23	ОХА-40	ОХА-51	ОХА-58	VIM-2
<i>A. baumannii</i>	Резистентные	10	1	5	10	4	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		11	-	-	-	-	11
<i>A. baumannii</i>	Чувствительные	2	-	-	-	-	-
<i>K. pneumonia</i>		3	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>		2	-	-	-	-	-

и *Enterobacteriaceae* spp. с различным уровнем чувствительности к карбапенемам, полученных из НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко и НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Все штаммы *A. baumannii*, резистентные к карбапенемам по данным фенотипических тестов, были продуцентами генов двух ОХА-карбапенемаз (ОХА-51 и ОХА-23 (1 штамм), ОХА-40 (5 штаммов), ОХА-58 (4 штамма)). У всех резистентных к карбапенемам штаммов *Ps. aeruginosa* был обнаружен ген металло- β -лактамазы VIM-2-типа. При тестировании штаммов, чувствительных к карбапенемам, гены карбапенемаз не обнаружены. Таким образом, результаты гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах хорошо согласуются с данными фенотипирования. Кроме того, для двух образцов – одного *A. baumannii* и одного *Ps. aeruginosa*, резистентных к действию карбапенемов, структура обнаруженных карбапенемаз ОХА-40, ОХА-51 и VIM-2 была подтверждена методом секвенирования.

Таким образом, разработанный метод гибриди-

зационного анализа на ДНК-микрочипах для идентификации и типирования генов карбапенемаз характеризуется хорошей точностью и производительностью и может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для идентификации и изучения эпидемиологии карбапенемаз. Используемые в настоящее время фенотипические тесты длительны по времени (от 24 до 48 ч) и не всегда эффективны при определении карбапенемаз, особенно карбапенемаз ОХА-типа. Идентификация генов карбапенемаз на ДНК-микрочипах позволяет осуществлять быструю диагностику, весь анализ от выделения культуры клеток до получения конечного результата занимает около 4.5 ч, включая 0.5 ч на выделение бактериальной ДНК, 1.5 ч на амплификацию генов карбапенемаз и фрагментацию полученных ПЦР-продуктов, 1.5 ч на гибридизацию с последующей отмывкой и 1 ч на колориметрическую детекцию результатов гибридизации. Важной особенностью метода является возможность идентификации нескольких генов в одном образце одновременно. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкин Д.В. // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. С. 133–152.
2. Skleenova E., Shevchenko O., Edelstein M., et al. // Abstracts of 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria, 2010, 10–13 April. O 562.
3. Livermore D. // J. Antimicrob. Chemother. 2001. V. 47. P. 247–250.
4. Jacoby G., Mills D.M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48. P. 3203–3206.
5. Ziha-Zarifi I., Llanes C. // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 287–291.
6. Queenan A.M., Bush K. // Clin. Microbiol. Rev. 2007. V. 20. P. 440–458.
7. Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M. // Clin. Microbiol. Infect. 2010. V. 16. P. 112–122.
8. Bush K., Jacoby G. // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. P. 969–976.
9. Rasmussen J.W., Hoiby N. // J. Antimicrob. Chemother. 2007. V. 60. P. 470–482.
10. Walsh T.R., Toleman M.A. // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. P. 306–325.
11. Rasmussen J.W., Hoiby N. // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. P. 373–383.
12. Moland E.S., Hong S.G. // Clin. Microbiol. Newsletter. 2008. V. 30. P. 79–85.
13. Noval M.J., Menezes G.A., Harish B.N., et al. // Indian. J. Med. Res. 2009. V. 129. P. 707–712.
14. Poirel L., Naas T., Nordmann P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. V. 54. P. 24–38.
15. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. С. 211–218.
16. Pitout J.D., Gregson D.B., Poirel L. // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 3129–3135.
17. Woodford N., Ellington M. // Int. J. Antimicrobial Agents. 2006. V. 27. P. 351–353.
18. Mendes R.E., Kiyota K.A. // J. Clin. Microbiol. 2007. V. 45. P. 544–547.
19. Bilitewski U. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 509. P. 1–14.
20. Ehrenreich A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 255–273.
21. Zhang Y., Coyne M.Y., Will S.G., et al. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 3929–3935.