

## МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ И ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В НИХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

©2010 г. М. Ю. РУБЦОВА<sup>1\*</sup>, М. М. УЛЯШОВА<sup>1</sup>,  
Т. Т. БАХМАН<sup>2</sup>, Р. Д. ШМИД<sup>2</sup>, А. М. ЕГОРОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва;

<sup>2</sup> Институт технической биохимии, Университет г. Штутгарта,  
Германия

I. Введение. II. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, обусловленная бета-лактамазами. III. Молекулярно-биологические методы идентификации детерминант антибиотикорезистентности. IV. Методы гибридизационного анализа на микрочипах для определения нескольких детерминант антибиотикорезистентности. V. Методы мультипараметрического гибридизационного анализа для идентификации бета-лактамаз расширенного спектра. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются одними из наиболее распространенных возбудителей инфекционных заболеваний, включая госпитальные инфекции. Для их лечения в качестве антибактериальных средств применяются бета-лактамные антибиотики, которые в настоящее время составляют более половины всех

---

*Принятые сокращения:* БЛРС – бета-лактамазы расширенного спектра; КРОФ – конформационные различия однонитиевых фрагментов; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; п.н. – пара нуклеотидов; ПСБ – пенициллинсвязывающие белки; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР РРВ – ПЦР в режиме реального времени; ПХ – пероксидаза хрена; dNTPs – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; Tm – температура плавления.

\*Адрес для корреспонденции: [mrubtsova@gmail.com](mailto:mrubtsova@gmail.com)

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Национальная технологическая база» на 2007–2011 годы (государственный контракт ГП/07/442/НТБ/К) и гранта Федерального министерства образования и науки ФРГ ВМВФ в рамках GenoMik project (Genome Research on Microorganisms).

используемых в мире антибиотиков. Однако, все чаще встречаются случаи клинической неэффективности лекарственной терапии данной группой антибиотиков вследствие развития устойчивости микроорганизмов к их действию. Этот биологический феномен получил название «антибиотикорезистентности». Проблема устойчивости бактерий к антимикробным препаратам появилась практически одновременно с началом использования антибиотиков – в 40-х годах XX века. Уже через год после начала применения пенициллина у золотистого стафилококка обнаружился фермент пенициллиназа, разрушающий этот антибиотик. В 70-е годы XX века появились данные о микроорганизмах, устойчивых к группам определенных антибиотиков, а уже в конце XX века были описаны штаммы микроорганизмов, устойчивые ко всем известным антибиотикам. Таким образом, изучение проблем, связанных с антибиотикорезистентностью, и поиск способов их преодоления стало актуальным для всего мира.

Основным механизмом возникновения резистентности микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* к бета-лактамам является появление в их генах случайных мутаций, которые могут изменять спектр активности бактериальных ферментов. Бактериальные ферменты, способные расщеплять бета-лактамы антибиотиков, известны под названием бета-лактамазы. Бета-лактамазы представляют собой суперсемейство генетически и функционально различных ферментов, которые объединяет способность разрушать бета-лактамное кольцо, в результате чего антибиотик теряет свою антимикробную активность. В настоящее время в клинической практике основную проблему составляют грам-отрицательные возбудители семейства *Enterobacteriaceae*, резистентные к цефалоспорином III поколения. Они продуцируют так называемые бета-лактамазы расширенного спектра – БЛРС (ESBL – extended spectrum beta-lactamases) [1]. Первые БЛРС, являвшиеся производными бета-лактамаз широкого спектра, были обнаружены в середине 80-х годов XX века. К настоящему времени описано около 300 таких ферментов, и этот список постоянно пополняется.

БЛРС выявлены у всех представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также у *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. В большинстве случаев гены БЛРС локализованы на плазмидах, что является причиной чрезвычайно быстрого распространения резистентных возбудителей по всему миру [2, 3]. Это осложняет постановку правильного диагноза и выбор адекватного способа лечения, результатом чего является увеличение случаев неэффективности терапии,

увеличение продолжительности и стоимости лечения [4, 5]. Таким образом, необходимость проведения эффективной лабораторной диагностики продукции грам-отрицательными микроорганизмами БЛРС становится очевидной. К практически важной особенности бета-лактамаз следует отнести трудность их детекции в рутинной практике. Стандартные клинические методы определения природы патогенов, вызывающих инфекционные заболевания, и выявления их устойчивости к антибиотикам основаны на фенотипической характеристике микроорганизмов-возбудителей. Эти методы детекции БЛРС позволяют в лучшем случае оценить факт наличия фермента, но не могут дать информации о том, какой именно из ферментов присутствует. Кроме того, эти методы трудно использовать при анализе множественной резистентности – устойчивости к нескольким группам антибиотиков одновременно, а число таких случаев увеличивается.

Широкое распространение бета-лактамаз и возникновение множественной резистентности обуславливает необходимость одновременного определения нескольких генов, а также мутаций в них, т.е. проведение мультипараметрического анализа. Перспективными для решения подобных задач являются молекулярно-биологические методы анализа генов. Исследования в области химии и биохимии нуклеиновых кислот, проводившиеся в последние десятилетия, привели не только к революционным преобразованиям в биологии, но и оказали большое влияние на развитие новых методов в биотехнологии и геномной инженерии, включая технологии, которые могут применяться для мультипараметрического анализа структуры генов и для определения в них точечных мутаций на молекулярном уровне. В последние годы опубликовано несколько обзоров, посвященных резистентности микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам, распространенности и свойствам ферментов семейства бета-лактамаз [6–9]. В то же время отсутствуют обзоры по молекулярно-биологическим методам детекции бета-лактамаз, позволяющим одновременно определять несколько детерминант антибиотикорезистентности. Целью настоящего обзора является обобщение имеющихся в литературе данных в этой области. Отдельные главы посвящены методам мультипараметрического гибридного анализа для определения нескольких детерминант антибиотикорезистентности и идентификации БЛРС.

## II. АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ БЕТА-ЛАКТАМАМИ

Термин «антибиотикорезистентность» характеризует явление устойчивости бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний к действию антибиотиков и является частным случаем более общего явления «антимикробной резистентности» – устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний различной природы (бактерий, вирусов, простейших) к действию лекарственных препаратов. Одним из наиболее широко применяемых классов антибиотиков являются бета-лактамы. Бета-лактамы представляют собой полярные гидрофильные соединения, проникающие в клетки бактерий через пориновые каналы внешней мембраны [10]. По химическому строению бета-лактамы разделяются на несколько групп, общим компонентом которых является наличие бета-лактамного кольца (таблица 1). Для лечения инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями, наиболее часто используются цефалоспорины. Антибиотики группы пенициллинов наиболее часто используются для лечения инфекций, вызванных грамположительными патогенными микроорганизмами. В последнее время возросло использование карбапенемов как антибиотиков широкого спектра действия.

Механизм действия бета-лактамов заключается в связывании их с ферментами транс- и карбоксипептидазами, называемыми пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) и участвующими в образовании пептидогликановых цепей внутренней мембраны бактерий. При взаимодействии ПСБ с бета-лактамами антибиотиками синтез пептидогликана нарушается, клетка перестает делиться и погибает. Связывание антибиотика с ПСБ происходит благодаря сродству бета-лактамной структуры и структуры активного центра ПСБ. Поэтому наличие бета-лактамного кольца является необходимым для проявления антибактериальной активности антибиотика. При взаимодействии бета-лактамого антибиотика с ПСБ образуется комплекс ацил-фермент и разрушается связь C–N в четырехчленном цикле бета-лактамого кольца.

В ходе эволюции в некоторых ПСБ возникали точечные мутации, благодаря которым появились ферменты бета-лактамазы, способные гидролизовать бета-лактамное кольцо антибиотиков. Сравнительный анализ всех последовательностей ПСБ и бета-лактамаз подтверждает гипотезу о наличии у этих белков общего предшественника [11].

К настоящему времени выявлены следующие механизмы возникновения резистентности бактерий к бета-лактамым анти-

Таблица 1.  
Строение основных групп бета-лактамовых антибиотиков  
(бета-лактамовое кольцо обозначено пунктиром)

Группа	Структура
Пенициллины	
Цефалоспорины	
Монобактамы	
Карбапенемы	

биотикам: 1) синтез ферментов бета-лактамаз, разрушающих антибиотики [11–13]; 2) снижение проницаемости внешней мембраны бактерий вследствие потери или сниженной экспрессии поринов [14]; 3) изменение структуры ПСБ [15]; 4) активное выведение антибиотика из клетки микроорганизма (система эффлюкса) [16, 17]. Синтез бета-лактамаз рассматривается как основной механизм, обеспечивающий устойчивость клинически важных штаммов грамотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам [6, 18, 19]. Генетические мутации, приводящие к замене всего нескольких аминокислот в белковой последовательности, изменяют структуру фермента таким образом, что спектр гидролизуемых им антибиотиков значительно расширяется [20, 21]. Мутации могут возникать достаточно быстро – известны случаи, когда микроорганизмы становились нечувствительными к антибиотикам в течение курса лечения.

Резистентность может быть природной и приобретенной. Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для проявления действия антибиотика. Некоторые микроорганизмы способны продуцировать хромосомно-кодируемые бета-лактамазы, например *Klebsiella pneumoniae* продуцирует бета-лактамазу SHV-1, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.* и *Pseudomonas aeruginosa* продуцируют бета-лактамазы класса C. Под приобретенной или вторичной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при концентрациях антибиотиков, подавляющих основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть популяции проявляет приобретенную устойчивость. Формирование приобретенной резистентности во всех случаях обусловлено приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов. Чаще всего детерминанты вторичной резистентности приобретаются с подвижными генетическими элементами. Устойчивость микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* к бета-лактамам антибиотикам относится именно к приобретенной резистентности. Гены БЛРС переносятся различными подвижными генетическими элементами – плазмидами, транспозонами, IS-элементами, интегронами класса 1, интегронами, содержащими ISCR1 элемент [22, 23]. Разнообразие способов генетической передачи способствует быстрому распространению этих генов. С точки зрения диагностики именно детекция возникновения и передачи приобретенной резистентности составляет основную проблему, поскольку ее наличие у возбудителя инфекционного заболевания невозможно прогнозировать.

## КЛАССИФИКАЦИЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗ

К настоящему времени описано более 500 различных бета-лактамаз и это количество стремительно растет с каждым годом. Само семейство этих ферментов вполне может называться суперсемейством, поскольку оно объединяет несколько огромных групп или подсемейств, различающихся по свойствам ферментов. Объединяет их способность гидролизовать бета-лактамы антибиотики, а различия включают происхождение ферментов, структуру аминокислотных последовательностей, спектр субстратной специфичности, каталитические параметры, чувствительность к ингибиторам. Неоднократно предпринимались попытки классификации этих ферментов. Первые способы классификации основывались на сравнении функциональной активности – способности ферментов расщеплять разные классы бета-лактамов соединений (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы), чувствительности к действию ингибиторов и различиях в биохимических параметрах [24–26]. В результате была создана схема классификации бета-лактамаз по нескольким функциональным группам [27]. Также был предложен другой способ классификации бета-лактамаз – молекулярная классификация на основе общности структурных особенностей [28]. На основании определения уровня гомологии, наличия консервативных участков в первичной структуре ферментов и строения активного центра выделяют четыре молекулярных класса. Каждый из способов классификации имеет свои достоинства и недостатки, но ни один из них не является исчерпывающим, поэтому часто их используют вместе. В таблице 2 приводятся данные по классификации бета-лактамаз с использованием деления на молекулярные классы, а также на функциональные группы.

В первую функциональную группу входят ферменты, относящиеся к молекулярному классу С (бета-лактамазы AmpC типа), они могут быть как хромосомно-, так и плазмидно-кодируемыми [30]. Характерной особенностью этой группы является их более высокая активность к цефалоспорином по сравнению с пенициллинами, также эти ферменты малочувствительны к действию ингибиторов.

Во вторую функциональную группу, наиболее обширную и разнообразную, входят бета-лактамазы молекулярных классов А и D. Гены ферментов этой группы входят в состав плазмид, поэтому эффективность их переноса между различными штаммами, а следовательно, и скорость распространения очень высоки. К группе 2а относятся бета-лактамазы грам-положительных бактерий *Staphylococcus spp.* и *Bacillus spp.* Эти ферменты наиболее эффективны в отношении

Таблица 2.  
Классификация бета-лактамаз

Функциональная группа	Под-группа	Молекулярный класс	Основной субстрат	Особенности бета-лактамаз – представителей
1	1	C	Все группы бета-лактамных антибиотиков, кроме карбапенемов	Хромосомно-кодируемые AmpC бета-лактамазы, некоторые плазмидно-кодируемые AmpC бета-лактамазы, не ингибируются clavulanовой кислотой.
2	2a	A	Пенициллины	Пенициллиназы грам-положительных бактерий, ингибируются clavulanовой кислотой.
	2b	A	Пенициллины, цефалоспорины	Бета-лактамазы широкого спектра (TEM-1, TEM-2, SHV-1), ингибируются clavulanовой кислотой.
	2be	A	Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	Бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), ингибируются clavulanовой кислотой.
	2br	A	Пенициллины	Ингибитор-резистентные бета-лактамазы типов TEM, SHV
	2c	A	Пенициллины, карбенициллин	Бета-лактамазы PSE типа, гидролизующие карбенициллин
	2e	A	Цефалоспорины	Индукцибельные цефалоспорины из <i>Proteus spp.</i> , ингибируются clavulanовой кислотой.
	2f	A	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	Сериновые карбапенемазы, ингибируются clavulanовой кислотой.
	2d	D	Пенициллины, оксациллин	Бета-лактамазы OXA типа, гидролизующие оксациллин, в основном, ингибируются clavulanовой кислотой.
3	3a, 3b, 3c	B	Большинство бета-лактамов, включая карбапенемы	Металло-бета-лактамазы, не ингибируются clavulanовой кислотой, ингибируются ЭДТА.
4	Не опр.		Пенициллины	Пенициллиназы, не относящиеся к другим группам.

пенициллинов (за исключением оксациллина и его аналогов). Самыми известными представителями группы 2b являются бета-лактамазы TEM-1, TEM-2 и SHV-1. Наиболее эффективно эти ферменты также гидролизуют пенициллины (за исключением уреидопенициллинов). В подгруппу 2be входят так называемые бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), они являются мутантами ферментов TEM-1 и SHV-1 и могут эффективно расщеплять не только пенициллины, но и цефалоспорины I-IV поколений. К этой же группе относятся многочисленные бета-лактамазы CTX-M типа, эффективно гидролизующие цефотаксим. В отдельную группу 2bg выделены мутанты TEM и SHV типов, устойчивые к действию ингибиторов. К группе 2c относятся бета-лактамазы PSE грамо-трицательных бактерий, способные гидролизовать карбенициллин. К группе 2d относятся бета-лактамазы OXA типа, которые входят в отдельный молекулярный класс D. Часть этих ферментов имеет фенотип БЛРС. Встречаются они, в основном, у штаммов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. Считается, что ключевой является мутация в положении 167. Гены цефалоспориноаз группы 2e локализованы на хромосомах. Они могут находиться как под контролем индуцибельных (*P. vulgaris*, *C. diversus*), так и конститутивных (*Bacteroides spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*) промоторов. Группу 2f образуют карбапенемазы – бета-лактамазы, способные гидролизовать карбапенемы.

В третью функциональную группу входят цинк-содержащие бета-лактамазы. Вследствие этого они получили название металло-бета-лактамаз [31, 32]. По молекулярной классификации они относятся к классу В. Ферменты этой группы эффективно расщепляют все типы бета-лактамов антибиотиков, включая карбапенемы. Они нечувствительны к действию ингибиторов клавулановой кислоты, сульбактама и тазобактама, в культуре могут ингибироваться хелатными агентами, например, ЭДТА.

По механизму действия все бета-лактамазы делятся на сериновые (содержащие серин в активном центре фермента) и металло-ферменты. К сериновым ферментам относятся бета-лактамазы молекулярных классов А, С и D, к металлу – бета-лактамазы класса В.

Наибольшее внимание исследователей в последнее время привлечено к проблеме изучения свойств плазмидно-кодируемых БЛРС [3, 33]. Термин БЛРС, первоначально был использован для обозначения мутантов бета-лактамаз TEM и SHV типов функциональной подгруппы 2be, обладающих способностью гидролизовать оксимино-цефалоспорины. Впоследствии значение этого термина было существенно расширено. К БЛРС стали относить: ферменты со

сходным профилем субстратной специфичности, но отличающихся по структуре ферментов СТХ-М и VEB типов; мутанты TEM и SHV типов с пограничной активностью в отношении цефалоспоринов, например, TEM-12; бета-лактамазы с различным уровнем резистентности, не входящие в функциональную подгруппу 2be, например, бета-лактамазы OXA типа и мутанты AmpC бета-лактамаз с увеличенной ферментативной активностью в отношении цефепима [34].

#### РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА КЛАССА А

Изучением распространения бета-лактамаз, в том числе БЛРС, активно занимаются во многих странах мира. Постоянно растет число публикаций, в которых приводятся данные по распространенности БЛРС в отдельных лечебных учреждениях, регионах и странах. Данные, полученные в Европе [35–37], Северной [38] и Южной Америке [39], Канаде [40], странах Азиатского региона [41, 42], на Ближнем Востоке [43], свидетельствуют о росте устойчивости возбудителей нозокомиальных, т.е. внутрибольничных, и внебольничных инфекций к бета-лактамам антибиотикам и значительной распространенности именно БЛРС, что является серьезной проблемой для здравоохранения. При сравнительном анализе приводимых данных можно заключить, что доля БЛРС среди возбудителей *E. coli* и *Kl. pneumoniae* в странах Восточной и Южной Европы, Южной Америки, странах Азии достигает уже 30% и более; в странах Северной Европы, Северной Америки и Канаде – в среднем, существенно ниже и не превышает 10–15%. Если в 1990-х годах в Европе преимущественно обнаруживали бета-лактамазы TEM и SHV типов, то с началом XXI века ситуация резко изменилась, и доминирующим типом в Европе, Азии и Южной Америке в настоящее время является тип СТХ-М [44–49]. Рост доли бета-лактамаз СТХ-М типа носит экспоненциальный характер, и его уже называют пандемическим [50]. Предполагается, что такая высокая скорость распространения обусловлена не только возникновением новых мутантов, а эффективным переносом генов в составе плазмид и мобильных генетических элементов. В США ситуация остается прежней – наиболее распространенными являются бета-лактамазы SHV и TEM типов, ферменты СТХ-М типа были выявлены только у больных, инфицированных за пределами страны [35, 51].

Исследования по изучению антибиотикорезистентности, в том числе резистентности к бета-лактамам антибиотикам, проводятся и в России, результаты их опубликованы в нескольких работах [52–55]. В них отмечается, что распространение устойчивости к

бета-лактамам среди возбудителей семейства *Enterobacteriaceae* достигает в среднем 50–60% для нозокомиальных инфекций и уже превратилось в национальную проблему. Установлено, что происходит рост числа штаммов, имеющих одновременно гены двух, трех и даже четырех типов бета-лактамаз. Число таких штаммов достигает уже около 30%. Соотношение типов БЛРС, выявленных в России, соответствует данным по распространению различных типов БЛРС в Восточной Европе: значительно преобладают бета-лактамазы СТХ-М типа (около 80%), с достаточно высокой частотой встречаются бета-лактамазы SHV типа. Среди обнаруженных генов СТХ-М типа наиболее распространены ферменты, относящиеся к субкластеру СТХ-М-1. В последние годы отмечается значительный рост встречаемости бета-лактамаз субкластера СТХ-М-9 [52, 56].

#### РАЗНООБРАЗИЕ ОСНОВНЫХ ТИПОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА КЛАССА А

Исходя из данных по изучению молекулярных механизмов устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам и распространенности разных молекулярных классов и функциональных групп бета-лактамаз, особое внимание исследователей направлено на изучение трех основных типов БЛРС: бета-лактамаз TEM, SHV и СТХ-М типов. Все они содержат серин в активном центре и имеют молекулярную массу около 29 Кда. Ниже будут кратко рассмотрены основные особенности строения этих ферментов.

#### *Бета-лактамазы TEM типа*

Первым охарактеризованным ферментом этой группы была пенициллаза TEM-1, обнаруженная в клетках *E. coli*, выделенных из крови инфицированного пациента [57]. Позже плазмиды с TEM-1 были найдены в штаммах других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в штаммах *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* и др. Через несколько лет был выделен фермент TEM-2, отличающийся одной аминокислотной мутацией Gln39Lys с таким же профилем субстратной специфичности [58]. Однако уже следующий обнаруженный фермент TEM-3 характеризовался второй мутацией Glu104Lys в дополнение к уже описанной мутации в положении 39. Этот фермент был способен гидролизовать цефалоспорины и, таким образом, имел более широкий спектр субстратной специфичности [58]. К настоящему времени описано уже более 170 представителей ферментов данного типа, и база данных бета-лактамаз (<http://www.lahey.org/studies>) постоянно пополняется. Первичная структура фермента TEM-1 включает



288 аминокислотных остатков. Все описанные производные бета-лактамаз TEM типа являются вариантами бета-лактамазы TEM-1 и отличаются от исходного фермента единичными аминокислотными заменами (от одной до семи). В настоящее время мутации найдены в 60 положениях, однако частота мутаций в каждом положении сильно варьирует. 90 ферментов TEM типа относятся в типу БЛРС. На рис. 1 представлено распределение выявленных к настоящему времени мутаций в аминокислотной последовательности бета-лактамазы TEM-1, выполненное на основе информации, имеющейся в международной базе данных GenBank. Наиболее часто встречаются мутации в положениях 21, 39, 69, 104, 164, 182, 238, 240, 244, 265 и 275. Среди них ключевыми для расширения профиля субстратной специфичности считаются мутации в положениях 104, 164, 238 и 240. Установлено, что введение в TEM-1 замен Glu104Lys, Arg164Ser(His), Glu240Lys приводит к изменению общего заряда белковой глобулы. Мутация Gly238Ser приводит к появлению ферментов, способных одинаково хорошо разрушать цефотаксим и цефтазидим, в то время как ферменты, содержащие мутацию Arg164Ser, более активны с цефтазидимом и менее – с цефотаксимом [6]. Существуют мутации, приводящие к появлению ферментов, нечувствительных к действию ингибиторов (фенотип устойчивости ИРТ, подгруппа 2br) [60]. Положения мутаций, определяющие устойчивость к действию ингибиторов: 69, 244, 275 и 276 [61]. Комбинация мутаций первого и второго типа позволяет получить варианты TEM, обладающие обоими типами устойчивости – БЛРС +ИРТ. 6 пар бета-лактамаз (TEM-1 и TEM-98, TEM-3 и TEM-14, TEM-10 и TEM-23, TEM-30 и TEM-99, TEM-34 и TEM-97, TEM-63 и TEM-64) идентичны по структуре. Использование методов случайного и направленного мутагенеза [62], инсерционного мутагенеза [63] позволило получить искусственно синтезированные мутанты с расширенным спектром активности и даже предсказать появление новых субтипов TEM бета-лактамаз до того, как они были выделены клинически.

#### *Бета-лактамазы SHV тина*

Ферменты этого типа появились вторыми после бета-лактамаз TEM типа. Особенностью бета-лактамаз этого типа, продуцируемых *Klebsiella pneumoniae*, является наличие хромосомно кодируемой бета-лактамазы SHV-1 [1]. При этом широко распространен фермент SHV-1, кодируемый геном, локализованным на плаزمиде. Мутант SHV-2, отличающийся одной мутацией Gly238Ser, был первой описанной БЛРС [64].

SHV-1	K 63	L 104	B 109	M 121	V 124	D 125	S 126	I 127	C 128	H 129	T 130	K 131	H 132	E 133	I 134	I 135	V 136	V 137	R 138	F 139	L 140	V 141	D 142	S 143	V 144	K 145	V 146	S 147	G 148	N 149	A 150	B 151	G 152	V 153	G 154	V 155	N 156	L 157	N 158	L 159	H 160	G 161	A 162	R 163	A 164	G 165	H 166	I 167	I 168	I 169	I 170	I 171	I 172	I 173	I 174	I 175	I 176	I 177	I 178	I 179	I 180	I 181	I 182	I 183	I 184	I 185	I 186	I 187	I 188	I 189	I 190	I 191	I 192	I 193	I 194	I 195	I 196	I 197	I 198	I 199	I 200	I 201	I 202	I 203	I 204	I 205	I 206	I 207	I 208	I 209	I 210	I 211	I 212	I 213	I 214	I 215	I 216	I 217	I 218	I 219	I 220	I 221	I 222	I 223	I 224	I 225	I 226	I 227	I 228	I 229	I 230	I 231	I 232	I 233	I 234	I 235	I 236	I 237	I 238	I 239	I 240	I 241	I 242	I 243	I 244	I 245	I 246	I 247	I 248	I 249	I 250	I 251	I 252	I 253	I 254	I 255	I 256	I 257	I 258	I 259	I 260	I 261	I 262	I 263	I 264	I 265	I 266	I 267	I 268	I 269	I 270	I 271	I 272	I 273	I 274	I 275	I 276	I 277	I 278	I 279	I 280	I 281	I 282	I 283	I 284	I 285	I 286	I 287	I 288	I 289	I 290	I 291	I 292	I 293	I 294	I 295	I 296	I 297	I 298	I 299	I 300	I 301	I 302	I 303	I 304	I 305	I 306	I 307	I 308	I 309	I 310	I 311	I 312	I 313	I 314	I 315	I 316	I 317	I 318	I 319	I 320	I 321	I 322	I 323	I 324	I 325	I 326	I 327	I 328	I 329	I 330	I 331	I 332	I 333	I 334	I 335	I 336	I 337	I 338	I 339	I 340	I 341	I 342	I 343	I 344	I 345	I 346	I 347	I 348	I 349	I 350	I 351	I 352	I 353	I 354	I 355	I 356	I 357	I 358	I 359	I 360	I 361	I 362	I 363	I 364	I 365	I 366	I 367	I 368	I 369	I 370	I 371	I 372	I 373	I 374	I 375	I 376	I 377	I 378	I 379	I 380	I 381	I 382	I 383	I 384	I 385	I 386	I 387	I 388	I 389	I 390	I 391	I 392	I 393	I 394	I 395	I 396	I 397	I 398	I 399	I 400	I 401	I 402	I 403	I 404	I 405	I 406	I 407	I 408	I 409	I 410	I 411	I 412	I 413	I 414	I 415	I 416	I 417	I 418	I 419	I 420	I 421	I 422	I 423	I 424	I 425	I 426	I 427	I 428	I 429	I 430	I 431	I 432	I 433	I 434	I 435	I 436	I 437	I 438	I 439	I 440	I 441	I 442	I 443	I 444	I 445	I 446	I 447	I 448	I 449	I 450	I 451	I 452	I 453	I 454	I 455	I 456	I 457	I 458	I 459	I 460	I 461	I 462	I 463	I 464	I 465	I 466	I 467	I 468	I 469	I 470	I 471	I 472	I 473	I 474	I 475	I 476	I 477	I 478	I 479	I 480	I 481	I 482	I 483	I 484	I 485	I 486	I 487	I 488	I 489	I 490	I 491	I 492	I 493	I 494	I 495	I 496	I 497	I 498	I 499	I 500	I 501	I 502	I 503	I 504	I 505	I 506	I 507	I 508	I 509	I 510	I 511	I 512	I 513	I 514	I 515	I 516	I 517	I 518	I 519	I 520	I 521	I 522	I 523	I 524	I 525	I 526	I 527	I 528	I 529	I 530	I 531	I 532	I 533	I 534	I 535	I 536	I 537	I 538	I 539	I 540	I 541	I 542	I 543	I 544	I 545	I 546	I 547	I 548	I 549	I 550	I 551	I 552	I 553	I 554	I 555	I 556	I 557	I 558	I 559	I 560	I 561	I 562	I 563	I 564	I 565	I 566	I 567	I 568	I 569	I 570	I 571	I 572	I 573	I 574	I 575	I 576	I 577	I 578	I 579	I 580	I 581	I 582	I 583	I 584	I 585	I 586	I 587	I 588	I 589	I 590	I 591	I 592	I 593	I 594	I 595	I 596	I 597	I 598	I 599	I 600	I 601	I 602	I 603	I 604	I 605	I 606	I 607	I 608	I 609	I 610	I 611	I 612	I 613	I 614	I 615	I 616	I 617	I 618	I 619	I 620	I 621	I 622	I 623	I 624	I 625	I 626	I 627	I 628	I 629	I 630	I 631	I 632	I 633	I 634	I 635	I 636	I 637	I 638	I 639	I 640	I 641	I 642	I 643	I 644	I 645	I 646	I 647	I 648	I 649	I 650	I 651	I 652	I 653	I 654	I 655	I 656	I 657	I 658	I 659	I 660	I 661	I 662	I 663	I 664	I 665	I 666	I 667	I 668	I 669	I 670	I 671	I 672	I 673	I 674	I 675	I 676	I 677	I 678	I 679	I 680	I 681	I 682	I 683	I 684	I 685	I 686	I 687	I 688	I 689	I 690	I 691	I 692	I 693	I 694	I 695	I 696	I 697	I 698	I 699	I 700	I 701	I 702	I 703	I 704	I 705	I 706	I 707	I 708	I 709	I 710	I 711	I 712	I 713	I 714	I 715	I 716	I 717	I 718	I 719	I 720	I 721	I 722	I 723	I 724	I 725	I 726	I 727	I 728	I 729	I 730	I 731	I 732	I 733	I 734	I 735	I 736	I 737	I 738	I 739	I 740	I 741	I 742	I 743	I 744	I 745	I 746	I 747	I 748	I 749	I 750	I 751	I 752	I 753	I 754	I 755	I 756	I 757	I 758	I 759	I 760	I 761	I 762	I 763	I 764	I 765	I 766	I 767	I 768	I 769	I 770	I 771	I 772	I 773	I 774	I 775	I 776	I 777	I 778	I 779	I 780	I 781	I 782	I 783	I 784	I 785	I 786	I 787	I 788	I 789	I 790	I 791	I 792	I 793	I 794	I 795	I 796	I 797	I 798	I 799	I 800	I 801	I 802	I 803	I 804	I 805	I 806	I 807	I 808	I 809	I 810	I 811	I 812	I 813	I 814	I 815	I 816	I 817	I 818	I 819	I 820	I 821	I 822	I 823	I 824	I 825	I 826	I 827	I 828	I 829	I 830	I 831	I 832	I 833	I 834	I 835	I 836	I 837	I 838	I 839	I 840	I 841	I 842	I 843	I 844	I 845	I 846	I 847	I 848	I 849	I 850	I 851	I 852	I 853	I 854	I 855	I 856	I 857	I 858	I 859	I 860	I 861	I 862	I 863	I 864	I 865	I 866	I 867	I 868	I 869	I 870	I 871	I 872	I 873	I 874	I 875	I 876	I 877	I 878	I 879	I 880	I 881	I 882	I 883	I 884	I 885	I 886	I 887	I 888	I 889	I 890	I 891	I 892	I 893	I 894	I 895	I 896	I 897	I 898	I 899	I 900	I 901	I 902	I 903	I 904	I 905	I 906	I 907	I 908	I 909	I 910	I 911	I 912	I 913	I 914	I 915	I 916	I 917	I 918	I 919	I 920	I 921	I 922	I 923	I 924	I 925	I 926	I 927	I 928	I 929	I 930	I 931	I 932	I 933	I 934	I 935	I 936	I 937	I 938	I 939	I 940	I 941	I 942	I 943	I 944	I 945	I 946	I 947	I 948	I 949	I 950	I 951	I 952	I 953	I 954	I 955	I 956	I 957	I 958	I 959	I 960	I 961	I 962	I 963	I 964	I 965	I 966	I 967	I 968	I 969	I 970	I 971	I 972	I 973	I 974	I 975	I 976	I 977	I 978	I 979	I 980	I 981	I 982	I 983	I 984	I 985	I 986	I 987	I 988	I 989	I 990	I 991	I 992	I 993	I 994	I 995	I 996	I 997	I 998	I 999	I 1000
-------	---------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-----------

Рис. 2. Положения и типы аминокислотных замен в бета-лактамазах SHV типа, описанные до января 2010 г.

В базе данных <http://www.lahey.org/studies/> имеется информация о 126 мутантах бета-лактамаз SHV типа. Все они являются производными фермента SHV-1 и отличаются от него не только наличием точечных мутаций, но и делеций (у SHV-9 и SHV-10) или вставок (у SHV-16). На рис. 2 представлено распределение выявленных к настоящему времени мутаций в аминокислотной последовательности бета-лактамазы SHV-1, выполненное на основе информации, имеющейся в международной базе данных GenBank. Мутации найдены в 79 положениях, описаны также делеция в положении 54 у SHV-9 и вставка 163DRWET167 в SHV-16. В зависимости от типа замены, как и в случае ферментов TEM, мутантные SHV различаются профилем субстратной специфичности по отношению к цефалоспорином. Наиболее часто наблюдаются мутации в положениях 35, 238 и 240, они же рассматриваются как ключевые для изменения профиля субстратной специфичности. Описана бета-лактамаза SHV-10 с фенотипом устойчивости IRT. Она отличается от БЛРС SHV-9 только одной аминокислотной заменой (Ser130Gly), но сама не является БЛРС.

#### *Бета-лактамазы CTX-M типа*

Бета-лактамазы CTX-M типа получили свое название вследствие того, что они более эффективно гидролизуют цефотаксим по сравнению с цефтазидимом. Первый фермент этого типа был выделен в 1989 г. из штамма *E. coli* [65]. Впоследствии он получил название CTX-M-1. Гены ферментов этой группы имеют плазмидную локализацию. Известно более 90 ферментов этого типа. Среди БЛРС класса А группа CTX-M бета-лактамаз наиболее разнородна по строению аминокислотной последовательности белков и, соответственно, по строению кодирующих их генов. В настоящее время ферменты бета-лактамаз CTX-M типа разделяют на 5 субкластеров [66]. Каждый субкластер состоит из основного фермента (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 и CTX-M-25) и его мутантов – ферментов, отличающихся от одной до нескольких мутаций. Распределение ферментов CTX-M типа по субкластерам и мутаций, описанных для каждого субкластера, приведено на рис. 3. Гомология бета-лактамаз CTX-M типа с другими типами бета-лактамаз класса А выражена слабо (менее 40%) [67]. Гораздо более высокая гомология (более 70%) наблюдается с хромосомно кодируемыми ферментами из *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* и *Serratia fonticola* [68]. Это позволяет предположить, что плазмидно-кодируемые ферменты CTX-M типа произошли от ферментов, входящих в состав хромосом. Отличие бета-лактамаз CTX-M типа от бета-лактамаз TEM и SHV

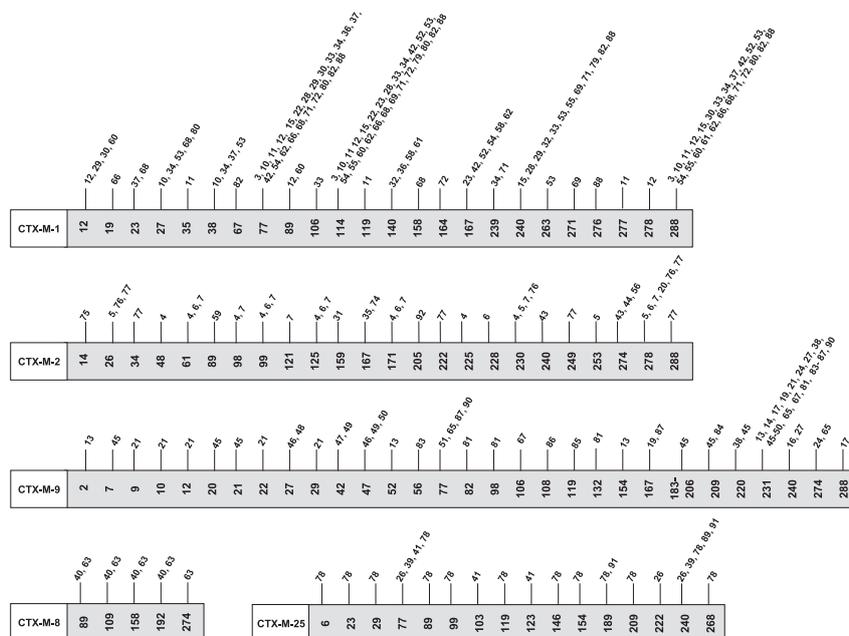


Рис. 3. Разделение бета-лактамаз СТХ-М типа на субкластеры и положения аминокислотных замен в них, описанные до января 2010 г.

типов по субстратной специфичности состоит в том, что все они гидролизуют цефалоспорины, т.е. все являются БЛРС. Различия между ферментами СТХ-М типа состоят в изменениях каталитической активности в отношении различных цефалоспоринов: цефотаксима, цефтазидима, цефепима. Установлено, что для этого типа ферментов также существуют ключевые мутации, например в положениях 167 и 240, которые приводят к изменению профиля субстратной специфичности. Отмечается, что бета-лактамазы СТХ-М типа часто выявляются у возбудителей внебольничных инфекций [19].

#### ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БЛРС

К практически важной особенности БЛРС следует отнести трудность их детекции в клинической практике. Стандартные микробиологические методы определения природы патогенов, вызывающих инфекционные заболевания, и определения устойчивости к антибиотикам основаны на фенотипической характеристике микроорганизмов-возбудителей. Они основаны на оценке минимально подавляющей

концентрации (МПК) антибиотика, необходимой для подавления роста клеток в культуре, тестируемой при использовании панели антибиотиков и их комбинаций с ингибиторами различными методами [69, 70]. Критерии чувствительности грам-отрицательных микроорганизмов к цефалоспорином III поколения по уровню МПК антибиотика Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) установил только для *E.coli* и *Klebsiella spp.*. В то же время продукция БЛРС описана практически у всех представителей семейства *Enterobacteriaceae* и ряда других грам-отрицательных микроорганизмов. Эти методы достаточно длительны по времени и, кроме того, данные в отношении чувствительности штаммов к антибиотикам могут быть трактованы неоднозначно. Ни один из традиционных микробиологических методов, основанных на оценке фенотипа микроорганизма, не обеспечивает детекцию БЛРС у 100% штаммов. Обнаружен «эффект инокулюма», который заключается в резком повышении величины МПК антибиотика при увеличении посевной дозы возбудителя, т.е. определяемый уровень чувствительности может зависеть от концентрации клеток в культуре. Определение резистентности существенно затрудняется при наличии у микроорганизмов нескольких детерминант устойчивости, а число таких случаев постоянно растет. Например, продукция штаммами *E. coli* AmpC бета-лактамаз (класс C) маскировало присутствие БЛРС, и они не обнаруживались при использовании E-теста (5 образцов из 7) или автоматического анализатора Phoenix (3 образца из 7) [71]. В этом же исследовании были получены и ложно положительные результаты, показывающие присутствие БЛРС в отрицательных образцах, причем наибольшее число таких результатов (9 ложных результатов для 19 образцов) было получено при использовании метода диффузии на дисках. Традиционные микробиологические методы детекции БЛРС в лучшем случае позволяют оценить факт наличия фермента, но не могут дать информации о том, какой именно из ферментов присутствует. Поэтому становится очевидным, что использование фенотипических методов тестирования чувствительности штаммов возбудителей бактериальной природы недостаточно для правильного понимания природы и свойств инфекционного агента [72, 73]. Необходимость подбора адекватных методов диагностики для корректного определения типа резистентности активно обсуждается [74]. Эту информацию можно получить, используя молекулярно-биологические методы анализа генов.

### III. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Из анализа данных, приведенных в предыдущем разделе, становится очевидным, что для определения устойчивости грам-отрицательных микроорганизмов к бета-лактамам необходимо изучение нуклеотидной последовательности кодирующих бета-лактамазы генов для идентификации типа генов и наличия в них мутаций. Точечными мутациями в генах (однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) или *single nucleotide polymorphism* (SNP)) называют однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, для которых в некоторой популяции имеются различные варианты последовательностей (аллелей) [75]. Для определения ОНП необходимо установление либо полной последовательности гена, либо структуры его фрагментов. Все имеющиеся сегодня молекулярно-биологические методы анализа нуклеотидных последовательностей генов основаны на амплификации генов из биологического материала. Наиболее часто для этих целей используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для установления полной или частичной структуры синтезируемой в ходе реакции ДНК необходимо использовать дополнительные методы. «Золотым стандартом» молекулярного типирования генов является секвенирование – определение первичной структуры, т.е. последовательности нуклеотидных остатков в цепи гена. Использование секвенирования позволяет идентифицировать не только известные, но и новые варианты генов. Основным недостатком этого метода является его трудоемкость и сравнительно высокая стоимость. Использование секвенирования затрудняется при необходимости определения нескольких генов в одном образце, особенно в случае принадлежности этих генов к одной генетической группе, внутри которой различия заключаются в отдельных мутациях.

#### *Мультиплексная ПЦР*

Для амплификации нескольких генов одновременно используется мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР – реакция ко-амплификации нескольких ДНК-матриц в одной реакционной среде с использованием нескольких пар праймеров. Для повышения специфичности метода большое значение имеет дизайн праймеров и выявление вероятности амплификации неспецифических фрагментов. В настоящее время описаны методы мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации фрагментов генов БЛРС трех основных типов (TEM, SHV, CTX-M) [76]. Метод позволяет идентифицировать принадлежность

гена фермента к определенному типу бета-лактамаз. Более подробная дифференцировка гена методом мультиплексной ПЦР возможна на уровне субкластера для БЛРС СТХ-М типа, однако в этом случае анализ проводится только для ферментов одного типа (в данном случае – СТХ-М) [77, 78]. Метод мультиплексной ПЦР приобретает все большее значение при совместном использовании его с другими методами, позволяющими более детально характеризовать структуру гена. Так, разработан метод мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации бета-лактамаз СТХ-М типа, однако вследствие амплификации генов, относящихся к разным субкластерам, в виде фрагментов одного размера необходимо дальнейшее изучение их структуры с целью установления типа гена [79].

*Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени*

Активно развивающейся в настоящее время технологией является проведение ПЦР в режиме реального времени (ПЦР РРВ). В качестве метки используют флуоресцентные красители различных типов. Для определения результата гибридизации меченого олигонуклеотида используют либо перенос энергии донорного флуорофора на акцепторный с другим спектром испускания, либо перенос энергии на темновой гаситель флуоресценции.

В основе технологии Tagman лежит метод разрушаемых зондов. Олигонуклеотид модифицируется флуорофором и гасителем флуоресценции. В отсутствие мишени флуорофор и гаситель сближены, и флуоресценция подавлена. При наличии специфической матрицы зонд гибридизуется на ампликон, что ведет к его разрушению и появлению флуоресценции вследствие 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы (способности гидролизовать последовательность ДНК в направлении 5'–3'). Использование данного подхода описано для идентификации субкластера генов БЛРС СТХ-М типа [80]. Метод характеризуется быстротой и хорошей производительностью по сравнению со стандартными методиками ПЦР.

Другой вариант метода ПЦР РРВ – метод примыкающих проб, основанный на использовании двух олигонуклеотидных зондов, гибридизующихся с матричной ДНК в непосредственной близости друг от друга. В один зонд вводится флуорофор-донор, в другой – флуорофор-акцептор. Гибридизация зондов с матрицей ведет к сближению флуорофоров и переносу энергии с донора на акцептор (флуоресцентно-резонансный перенос энергии). Этот подход нашел свое применение для детекции ОНП. Так, например, его возможности были продемонстрированы при определении ключевых мутаций в БЛРС

SHV, TEM и CTX-M типов [81–84]. Ограничением метода является возможность одновременного определения только нескольких ОНП вследствие ограниченного набора флуоресцентных меток.

#### МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ

##### *Метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)*

Для детекции полиморфных участков ДНК и определения ОНП используют метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ или RFLP – restriction fragment length polymorphism). Для этого амплифицированный ген расщепляют соответствующей рестриктазой и определяют изменения в рестрикционных сайтах [85]. Для каждого типа генов получается свой набор продуктов рестрикции, который анализируется методом электрофореза. Метод показывает наличие изменений в нуклеотидной последовательности, но требует дальнейшего анализа фрагментов либо сравнения с профилем разделения известных вариантов гена. Этот подход применен для идентификации бета-лактамаз SHV типа в штаммах *Pseudomonas aeruginosa* по наличию ключевых мутаций в положениях 35, 238 и 240 [86]. Метод достаточно простой в исполнении и может быть использован для скрининга большого количества образцов; его ограничением является возможность детекции только тех мутаций, которые расположены в сайтах рестрикции, а также сложность выявления большого количества мутаций.

##### *Метод анализа конформационных различий однонитиевых фрагментов ДНК*

Метод анализа конформационных различий однонитиевых фрагментов (КРОФ или SSCP – single strand conformation polymorphism) был разработан для анализа ОНП и основан на изменении конформации однонитиевой ДНК после ее денатурации. Это выражается в изменении подвижности фрагментов при их анализе методом электрофореза. Метод КРОФ показывает наличие изменений в нуклеотидной последовательности, но требует дальнейшего анализа фрагментов либо сравнения с профилем разделения известных вариантов гена. Данный метод использовался для анализа БЛРС TEM и SHV типов [87, 88].

##### *Метод время-пролетной масс-спектрометрии*

Альтернативой существующим методам детекции полиморфных участков ДНК является дифференциальное секвенирование методом время-пролетной масс-спектрометрии. Ионизированные молекулы

ДНК отрываются от подложки методами MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionisation), разгоняются в электрическом поле и направляются через вакуумную камеру к детектору. Регистрируемое время движения обратно пропорционально скорости молекулы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна отношению массы летящей молекулы к ее заряду. Параметр отношения массы к заряду является уникальным для каждой молекулы и определяется исключительно ее нуклеотидной последовательностью, поэтому чувствительность метода очень высокая. Время, затрачиваемое на анализ каждого образца этим методом, составляет всего несколько секунд. Была продемонстрирована возможность применения данного подхода для быстрой детекции БЛРС ТЕМ типа по ключевым мутациям в положениях 104, 164, 238 [89]. Метод обладает высокой чувствительностью – для определения достаточно иметь в образце 50 бактериальных клеток. Возможно определение типа нуклеотида в позиции мутации и, соответственно, распознавание генов с различными заменами. Метод отличается высокой производительностью и возможностью одновременного анализа нескольких образцов. К несомненным достоинствам метода относится возможность обнаружения новых, еще не описанных мутаций.

#### *Метод высокоэффективной хроматографии*

Для анализа образующегося в ходе реакции амплификации продукта был разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в денатурирующих условиях, который был использован для детекции БЛРС СТХ-М типа [90]. Гены бета-лактамаз СТХ-М типа были амплифицированы методом мультиплексной ПЦР [78], причем фрагменты генов, принадлежащих к разным субкластерам, различались по размерам. Затем амплифицированные фрагменты смешивались с равным количеством ДНК контрольных штаммов, продуцирующих охарактеризованные по генотипу бета-лактамазы СТХ-М типа. Смеси быстро нагревали для денатурации и затем охлаждали с определенной скоростью для образования гомо- и гетеро-дуплексов ДНК. Дуплексы анализировали методом ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила. Была оптимизирована температура, при которой можно было различить 13 вариантов генов бета-лактамаз СТХ-М типа по форме хроматографических пиков. Для достижения максимальной чувствительности и специфичности необходимо было проводить анализ дуплексов для субкластера СТХ-М-1 при двух температурах – 64<sup>0</sup>С и 65<sup>0</sup>С, для субкластеров СТХ-М-2, -25/26 – при температуре 64<sup>0</sup>С, для субкластера СТХ-М-9 – при 67<sup>0</sup>С.

Метод отличается высокой производительностью (100 образцов за 6 часов), при этом затраты на него существенно меньше, чем при секвенировании. Авторы данной работы предполагают также, что появление новых мутаций можно будет отслеживать при получении аномальных хроматографических пиков. Ограничением метода является определение только части мутаций.

#### *Метод пиросеквенирования*

Для анализа мутаций было предложено использовать метод пиросеквенирования, который основан на детекции пирофосфата, отщепляемого в процессе синтеза ДНК. Пирофосфат является первым субстратом в каскаде ферментативных реакций, в результате которых выделяется свет. Интенсивность выделяемого света пропорциональна количеству включенных нуклеотидов. Детекция интенсивности выделяемого света в режиме реального времени позволяет проводить быструю идентификацию коротких фрагментов генов длиной до 100 п.н. Метод пиросеквенирования был использован для детекции ОНП в генах БЛРС СТХ-М типа [91] и БЛРС GES типа [92]. Определение генетического субкластера для бета-лактамаз СТХ-М типа оказалось возможным при анализе фрагмента ДНК длиной 13 п.н. Анализ другого участка гена, длиной 16 п.н., позволил идентифицировать отдельные субтипы СТХ-М бета-лактамаз. Метод характеризуется очень высокой скоростью анализа – общее время определения, включая ПЦР, составляет 3 часа.

#### *Метод гибридизации*

Для специфического выявления отдельных фрагментов ДНК используют предложенный Э. Саузерном метод гибридизации на нерастворимых носителях [93]. Этот метод часто применяют после фрагментирования ДНК, например, методом ПДРФ, после чего переносят разделенные методом электрофореза фрагменты на пористую мембрану методом иммуноблоттинга. Для идентификации используют реакцию гибридизации – комплементарного взаимодействия полинуклеотидной цепи исследуемой ДНК и меченого олигонуклеотида. В данном случае меченый олигонуклеотид называют зондом. После отмывки определяют активность метки в дуплексах ДНК на носителе. Гибридизационный анализ использовался для выявления генов БЛРС и AmpC бета-лактамаз при скрининговом обследовании штаммов *Salmonella enterica* и *Pseudomonas aeruginosa* [94, 95]. Применение реакции гибридизации в детекции амплифицированной ДНК позволяет существенно повысить специфичность определения фраг-

ментов гена. В зависимости от типа метки, которая вводится в олигонуклеотидный зонд (флуороресцентные красители, гаптены), реализуются различные способы детекции гибридизационного комплекса (прямое измерение флуоресценции, детекция с помощью конъюгатов специфических антител с ферментом). Подходы, развитые для детекции генов методом гибридизации на твердой фазе, послужили прообразом для создания методов гибридизационного анализа на микрочипах.

#### *Метод гибридизационного анализа на микрочипах*

Первое сообщение о технологии биологических микрочипов для изучения уровня экспрессии генов появилось в 1995 г. [96]. За прошедшие чуть более 10 лет эта технология значительно развилась и находит всё новые области своего применения. ДНК-микрочип представляет собой пластину из стекла или полимерных носителей площадью небольшого размера (1–10 см<sup>2</sup>), на которой в строго определенном порядке размещены ячейки, каждая из которых содержит одноцепочечные олигонуклеотиды с определенной последовательностью оснований. Количество таких ячеек, а следовательно, и количество различных нуклеотидных последовательностей может достигать 1 млн. на 1 см<sup>2</sup>, их длина варьирует от 15 до 1000 нуклеотидов. Метод гибридизационного анализа на микрочипах основан на амплификации исследуемого участка ДНК с одновременным введением метки и последующей гибридизацией исследуемой нуклеотидной последовательности на поверхности микрочипа с иммобилизованными в определенном порядке олигонуклеотидами или ДНК-последовательностями [97]. Отличие метода гибридизационного анализа на микрочипах от классического метода гибридизации, рассмотренного выше, состоит в том, что на носителе иммобилизуются олигонуклеотиды, и они называются зондами, а метка вводится в исследуемую ДНК. Результат гибридизации образца меченой ДНК с иммобилизованными олигонуклеотидами (зондами) определяется по активности метки на различных участках носителя с помощью специальных устройств – сканеров высокого разрешения. В ДНК-микрочипах используется, в основном, пассивная гибридизация, т.е. взаимодействие ДНК-мишени с иммобилизованными олигонуклеотидами является вероятностным процессом и зависит от нескольких факторов: длины ДНК-пробы, химического состава меченой ДНК-мишени, температуры, при которой проводится гибридизация, состава гибридизационной смеси, типа вводимой метки.

Известно использование различных типов меток для гибридизационного анализа на микрочипах. Для мечения анализируемой ДНК предлагалось использование радиоактивной метки, обычно  $P^{33}$ , включенного в фосфатный остаток нуклеотида, который вводится в цепь ДНК при её синтезе [93]. При этом каждая молекула ДНК содержит несколько атомов радиоактивного фосфора, максимальное количество которых может быть равно количеству нуклеотидов. Наличие нескольких меток в составе исследуемой ДНК повышает чувствительность реакции гибридизации. Использование изотопной технологии в микрочипах позволяет достичь высокой чувствительности, хотя имеется и ряд ограничений. Прежде всего они связаны с недостаточно высокой разрешающей способностью пленки, используемой в качестве детектора, а также со сложностью работы с радиоактивными материалами.

В настоящее время наиболее распространённой меткой в методе гибридизационного анализа на ДНК-микрочипах является флуоресцентная. При этом в качестве генератора флуоресцентного сигнала могут использоваться красители, непосредственно присоединённые к изучаемой последовательности [98]. Флуоресцентная метка обычно вводится в ДНК в процессе ПЦР в составе праймеров или конъюгатов флуоресцентных красителей с dСТР или dУТР [99]. Описаны способы проведения гибридизационного анализа с использованием наночастиц золота с последующей визуальной [100] или электрохимической детекцией [101].

Предложены методы использования так называемого «непрямого» метода детекции результата гибридизации, при котором в качестве метки используется биотин, выявляемый конъюгатом стрептавидина с флуоресцентным красителем [102] или с ферментами пероксидазой [103] или щелочной фосфатазой [104].

Метод гибридизационного анализа на микрочипах имеет значительные преимущества перед традиционными молекулярно-биологическими методами, заключающиеся в возможности проводить мультипараметрическое определение – определение множества параметров (от десятков до сотен и даже тысяч генов и мутаций в них) в одном образце благодаря проведению множества параллельных реакций на поверхности микрочипа в одинаковых условиях.

Технология микрочипов – это принципиально новый уровень лабораторных исследований, позволяющий проводить сотни и тысячи реакций параллельно. Примеры использования данного метода для идентификации и генотипирования различных генов, отвечающих за возникновение антибиотикорезистентности микроорганизмов, будут рассмотрены в отдельных разделах.

#### IV. МЕТОДЫ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА НА МИКРОЧИПАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

##### МИКРОЧИПЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ

Возможности технологии гибридационного анализа на микрочипах, позволяющие обеспечить мультипараметрическое определение генов были продемонстрированы при выявлении генов, отвечающих за развитие антибиотикорезистентности, в том числе к бета-лактамам антибиотикам.

Был предложен метод определения 9 типов бета-лактамаз (TEM, SHV, PSE, OXA, FOX, MEN, SMY, OXY, AmpC) на микрочипе из стекла с флуоресцентной детекцией [105]. Специфические зонды размером около 1000 п.н. были амплифицированы методом ПЦР с использованием специфических праймеров. Исследуемую ДНК амплифицировали методом мультиплексной ПЦР с введением флуоресцентной метки. Гибридацию проводили при 70°C в течение двух часов. В работе была показана возможность определения генов устойчивости при использовании всего одной бактерии в качестве матрицы для ПЦР. Таким образом предполагается, что чувствительность метода позволяет проведение анализа без предварительного культивирования клинических образцов. Экспериментально была продемонстрирована возможность определения двух типов генов устойчивости (OXY и PSE) в одном образце.

Разработан метод определения 23 генов резистентности и 25 генов вирулентности штаммов *Salmonella spp.* и *E. coli* [106]. На чип из мембранного носителя иммобилизовали последовательности длиной 400–800 п.н., полученные методом ПЦР. В качестве метки ДНК использовали диоксигенин, который выявляли конъюгатом антител к диоксигенину с щелочной фосфатазой. Фермент на носителе определялся колориметрически. Среди различных детерминант антибиотикорезистентности выявляли бета-лактамазы типов TEM, SMY и PSE.

Предложен метод типирования штаммов *St. aureus spp.*, *E. coli spp.*, *Ps. aeruginosa spp.* с одновременным определением детерминант устойчивости этих бактерий к нескольким группам антибиотиков [107]. На микрочип из стекла наносили 120 специфических зонда длиной 200–800 п.н., которые были амплифицированы из рекомбинантных плазмид. Были протестированы зонды для идентификации типа патогенов, а также зонды, гомологичные участкам генов, кодирующих факторы вирулентности и детерминанты антибиотикоустойчивости у

штаммов *St. aureus* к оксациллин-метициллину (*mecA*), гентамицину (*aacA-aphD*), эритромицину (*ermA*), пенициллину (*blaZ*), а у штаммов *E. coli* – к пенициллину (*bla*<sub>TEM-106</sub>) и аминогликозидам (*aacC2*). Образцы крови культивировались на специальных средах, дальнейшей амплификации ДНК не проводили. Для анализа использовали общую ДНК, меченую несколькими типами флуоресцентных меток. Время гибридизации составило 18 часов при 60°C. Несмотря на то, что выделенная из крови инфицированного пациента ДНК содержит смесь ДНК бактерий и человека, была достигнута высокая специфичность идентификации. Было получено 100 % совпадение результатов идентификации на микрочипе с данными фенотипирования для *St. aureus spp.*, резистентных к пенициллину, оксациллину, эритромицину, гентамицину. К преимуществам метода можно отнести: 1) для синтеза панели зондов использовались рекомбинантные плазмиды, что позволяет легко расширить число и состав зондов; 2) использование для проведения анализа общей ДНК; 3) отсутствие стадии амплификации исследуемой ДНК; 4) отсутствие необходимости предварительного титрования патогена. Недостатком с точки зрения идентификации БЛРС является использование достаточно длинных зондов, что не позволяет применять данный подход для определения точечных мутаций в генах.

Разработан метод гибридизационного анализа с колориметрической детекцией на микрочипах для идентификации 90 генов устойчивости к антибиотикам у грам-положительных микроорганизмов [108]. Для определения 81 гена выбрали по два зонда, специфичных гомологичным участкам изучаемых генов, для 9 генов – по одному зонду. Всего на микрочипе было иммобилизовано 137 олигонуклеотидов длиной 26–33 основания, из них специфичность выявления генов была исследована для 125 зондов. В качестве метки использовался биотин. Его вводили в ДНК в процессе ПЦР, а затем выявляли на поверхности микрочипа инкубацией с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза с последующей детекцией ферментативной активности. Требуемая специфичность анализа достигалась при гибридизации в течение 1 часа при 60°C.

В данной работе обсуждаются преимущества метода гибридизации на микрочипах, заключающиеся в его более высокой специфичности по сравнению с методом ПЦР. Использование олигонуклеотидных зондов имеет также преимущества перед использованием более длинных ПЦР-продуктов как в плане более высокой специфичности, так и в плане сокращения времени анализа. К положительным моментам разработанного метода несомненно отно-

сится возможность автоматизации различных стадий: микрочип помещается в специальную пробирку Array Tube (технология компании Clontia), что существенно упрощает проведение стадий гибридизации, отмывки и детекции. К недостаткам метода можно отнести невозможность специфичного выявления точечных мутаций из-за недостаточной длины олигонуклеотидных зондов.

Эта же технология была использована при разработке микрочипа для определения 47 генов, отвечающих за развитие резистентности к 5 группам антибиотиков (бета-лактамам, аминогликозидам, триметоприму, сульфонидамидам, тетрациклину, хлорамфениколу, хинолонам) у грам-отрицательных бактерий [109]. Микрочип был протестирован с использованием 50 клинических штаммов *E. coli* и 37 клинических штаммов *Salmonella spp.*. В 99% случаев отмечено совпадение результатов детекции детерминант устойчивости методом микрочипов и методом ПЦР, который выполнялся в формате нескольких мультиплексных реакций. У штаммов *E. coli* было обнаружено намного больше генов резистентности (13 детерминант резистентности выявлено более, чем у 30% образцов) по сравнению с *Salmonella spp.* (выявлено 7 детерминант резистентности). Что касается идентификации бета-лактамаз, то метод позволял определять только тип генов бета-лактамаз TEM и SHV. Гены БЛРС CTX-M и OXA типов выявляли только на уровне субкластера (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9; OXA-1, OXA-2, OXA-7 и OXA-9).

Разработан микрочип для одновременного определения 65 генов, обуславливающих развитие резистентности к макролидам у нескольких типов грам-отрицательных и грам-положительных бактерий [110]. Для типирования генов использовали панель из 100 зондов длиной 40–60 оснований. Зонды наносили на микрочип из стекла. Геномную ДНК выделяли из бактериальных культур, вводили флуоресцентную метку и гибридизовали на микрочипе. Была продемонстрирована хорошая специфичность метода, при этом удалось выявить наличие одного из генов *msr(SA)*, ответственных за систему эффлюкса у грам-отрицательных микроорганизмов *B. fragilis*, чего не было описано ранее.

#### МИКРОЧИПЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОНП

Метод гибридизационного анализа на микрочипах позволяет не только идентифицировать гены, но и распознавать единичные различия в структурах зонда и гибридизующейся последовательности, что необходимо для определения ОНП. Для этих целей наиболее часто используется метод аллель специфической гибридизации.

Для определения устойчивых к фторхинолонам штаммов *E. coli* использовали аллель специфическую гибридизацию на микрочипе из стекла [111]. Были предложены структуры олигонуклеотидов для идентификации полиморфизма нуклеотидов в гене *gyrA*, кодирующих аминокислотные замены в позициях 83 и 87. Олигонуклеотиды состояли из 19 оснований, и определяемая мутация находилась в центральной позиции. Для определения одной мутации использовали группу из четырех олигонуклеотидов, различающихся основанием в центральной позиции. Оптимизация структур олигонуклеотидов позволила достичь высокой специфичности определения: во всех изученных случаях результат комплементарной гибридизации превышал значение некомплементарной в 4–13 раз. В работе была сделана попытка дизайна универсальных зондов с использованием инозина, однако это приводило в значительному снижению аналитических сигналов.

Описан метод гибридизационного анализа на микрочипах для детекции нескольких типов БЛРС (TEM, SHV, CTX-M-3, CTX-M-9, MOX, CMY, DHA, ACC, FOX, MIR-1, ACT-1) и плазмидно-кодируемой AmpC бета-лактамазы, включая определение 6 точечных мутаций в гене бета-лактамазы SHV [112]. Олигонуклеотидные зонды длиной 19–23 оснований иммобилизовали на чипе из стекла. Для детекции точечной мутации использовали два олигонуклеотида с последовательностью оснований, комплементарной ферменту дикого типа и мутанту. Для амплификации использовали метод несимметричной ПЦР, которую проводили в два этапа. На первом использовали смесь специфичных праймеров с целью амплификации фрагментов изучаемых генов. Вторым этапом проводили при более высокой температуре отжига с универсальными мечеными флуоресцентной меткой праймерами в более высоких концентрациях. Оптимизация условий позволила получить преимущественно одноцепочные цепи, таким образом, удалось исключить стадию денатурации ДНК перед гибридизацией. Была установлена достаточно хорошая корреляция данных типирования на микрочипе с данными фенотипирования и секвенирования.

Для определения 9 детерминант резистентности и 1 мутации в гене *grlA*, кодирующем  $\alpha$ -субединицу ДНК топоизомеразы, у клинических образцов *St. aureus* разработан микрочип на основе иммобилизованных на стекле олигонуклеотидов [113]. Длина олигонуклеотидов составляла 17–24 основания. Для определения точечной мутации использовали набор из четырех олигонуклеотидов. Флуоресцентная метка вводилась в ДНК после амплификации.

Гибридизацию на микрочипе проводили в течение четырех часов при 42<sup>o</sup>C. Микрочип позволяет проводить одновременно тестирование устойчивости бактерий к бета-лактамам, тетрациклинам, гентамицину, макролидам, соединениям стрептограмина А и фторхинолонам. Предел детекции составил 100 пг ДНК, что соответствует 104 бактериальных клеток.

В Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта была разработана оригинальная технология гелевых биологических чипов для идентификации генов и ОНП [114]. В этом методе олигонуклеотидные зонды иммобилизуются на поверхности микрочипа в виде полусферических гидрогелевых ячеек с диаметром от 100 микрон до 1 мм. Иммобилизация осуществляется с образованием ковалентных связей при облучении ультрафиолетовым светом. Высокопористый гель позволяет иммобилизовать олигонуклеотиды длиной до 200 оснований. В анализируемую ДНК вводится флуоресцентный краситель. Для ускорения кинетики гибридизации меченой ДНК с олигонуклеотидами в геле используется поперечное к поверхности микрочипа электрическое поле или индуцирование гидродинамических потоков. При таком способе нанесения зондов на поверхность микрочипа их концентрация на единицу площади почти в 10<sup>3</sup> раз выше по сравнению с иммобилизацией зондов в виде точек или пятен на поверхности, что позволяет существенно увеличить чувствительность метода. Данный подход был применен для выявления антибиотикорезистентных форм *Mycobacterium tuberculosis* [115]. Для этого определяли ОНП, определяющие устойчивость к рифампицину, в 28 положениях гена *groV*, а также ОНП, определяющие устойчивость к изониазиду, в 11 положениях гена *katG*, в 5 положениях промоторной части гена *inhA* и в 5 положениях регуляторной области гена *ahpC-oxuR*. Флуоресцентная метка вводилась в праймеры для ПЦР, время анализа составило 12 часов.

#### **V. МЕТОДЫ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОГО ГИБРИДАЦИОННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА**

Разнообразие типов и вариантов бета-лактамаз делает задачу их идентификации для клинической лабораторной диагностики и эпидемиологического контроля возникновения и распространения инфекций достаточно сложной. Наличие нескольких молекулярных классов ферментов, а также их разнообразие даже внутри одной

функциональной группы, делает необходимым применение методов, которые обеспечивали бы одновременное определение как нескольких типов генов, так и множества точечных мутаций в них. На первый взгляд может показаться, что задача идентификации БЛРС является более узкой, т.к. формально БЛРС являются небольшой частью семейства бета-лактамаз и относятся к одной функциональной подгруппе из 12 описанных. Однако, эта подгруппа является одной из самых многочисленных по обнаруженным и описанным вариантам генов и точечных мутаций в них. Поэтому задача генотипирования БЛРС, т.е. установление генотипа фермента, продуцируемого изучаемым штаммом бактерий, подразумевает одновременное определение нескольких типов генов и нескольких сотен мутаций в них. В таблице 3 приводятся данные по использованию различных молекулярно-генетических методов для детекции основных типов БЛРС, основанных на модификациях ПЦР и анализа продуктов амплификации различными методами. Использование методов на основе ПЦР и ПЦР в комбинации с методами анализа продуктов на основе гель-электрофореза, хроматографии и мини-секвенирования, как правило, позволяет определять лишь ограниченное количество генов и ОНП в одном анализе. Поэтому данные методы не могут быть использованы в тех случаях, когда необходимо определить генотип фермента. Единственными адекватными технологиями для проведения многопараметрического генотипирования БЛРС из всего разнообразия описанных молекулярных методов представляются методы мультипараметрического гибридационного анализа на микрочипах, которые будут рассмотрены в этой главе.

Для идентификации наиболее распространенных вариантов генов бета-лактамаз СТХ-М типа предложен метод гибридационного анализа с биотином в качестве метки, выявляемым конъюгатом стрептавидин-пероксидаза с последующей хемилюминесцентной детекцией фермента [119]. Бiotин вводили в обратные праймеры, которые использовали для мультиплексной ПЦР. Структура праймеров была подобрана таким образом, что амплифицированные фрагменты генов СТХ-М бета лактамаз, относящихся к четырем различным генетическим субкластерам, различались по размерам. Ферменты субкластеров СТХ-М-8 и СТХ-М-25 были объединены в один субкластер. На макрочипе из мембранного носителя олигонуклеотиды были иммобилизованы в иммуноблоттере в виде полос. Для проведения гибридазации чип поворачивали на 90° относительно начальной ориентации, и каналы иммуноблоттера заполняли растворами амплифицированной ДНК в гибридационном буфере. Особенностью

Таблица 3.  
Молекулярно-генетические методы идентификации БЛРС

Метод	Уровень идентификации	Ограничения метода	Ссылка
<b>Основные типы БЛРС (TEM, SHV, CTX-M) в одном анализе</b>			
Мультиплексная ПЦР	Идентификация типа гена	Невозможность детекции мутаций	76
Гибридизация на микрочипе	Идентификация типа гена и известных ОНП на одном чипе	Определение только известных ОНП	125
<b>БЛРС TEM типа</b>			
ПЦР РРВ	Идентификация типа и ключевых ОНП	Определение ограниченного количества ОНП	83, 84
ПЦР-КРОФ	Выявление отдельных ОНП		88
ПЦР-ПДРФ	Выявление отдельных ОНП		86
ПЦР- время-пролетная масс-спектрометрия	Выявление ключевых ОНП		89
ПЦР-гибридизация на микрочипе	Идентификация типа гена и 96% описанных ОНП на одном чипе	Определение только известных ОНП	120
<b>БЛРС SHV типа</b>			
ПЦР РРВ	Идентификация типа и ключевых ОНП	Определение ограниченного количества ОНП	81, 82, 84
ПЦР-ПДРФ	Выявление мутации G238S		86
ПЦР-КРОФ	Выявление отдельных ОНП		87
<b>БЛРС CTX-M типа</b>			
Множественная ПЦР	Идентификация субкластера	Невозможность детекции мутаций	116, 117
Мультиплексная ПЦР	Идентификация субкластера Идентификация типа		77–79
ПЦР РРВ	Идентификация субкластера, выявление ключевых ОНП	Определение ограниченного количества ОНП	80, 84
ПЦР-ПДРФ	Идентификация субкластера		118
ПЦР-ВЭЖХ	Идентификация субкластера и отдельных ОНП		90
ПЦР-РРВ-пиросеквенирование	Идентификация субкластера и отдельных ОНП		91
ПЦР-гибридизация на макро-чипе	Идентификация отдельных ОНП для каждого субтипа CTX-M	Отдельные чипы для идентификации различных субкластеров, определение ограниченного количества ОНП	119
ПЦР-гибридизация на микрочипе	Идентификация типа гена и всех описанных ОНП на одном чипе	Определение только известных ОНП	123

данного метода являлось проведение гибридизации в кинетическом режиме, для увеличения специфичности анализа отмывку проводили при повышенной температуре. После отмывки выявляли количество метки в дуплексах ДНК на носителе по активности пероксидазы в реакции хемилюминесценции.

Различия в  $T_m$  выбранных панелей олигонуклеотидов не позволили подобрать одинаковые условия проведения гибридизационного анализа для всех четырех генетических субкластеров. Поэтому для определения мутаций внутри каждого из субкластеров использовался отдельный мембранный чип и различные температуры отмывочного буфера после гибридизации (от 58°C до 65°C). Для определения, какой из чипов необходим для проведения типирования того или иного образца, тип субкластера определяли по размеру ампликона, полученного в мультиплексной ПЦР. Выбранные олигонуклеотиды позволили провести идентификацию наиболее распространенных в настоящее время вариантов генов бета-лактамаз СТХ-М типа: СТХ-М-1, -2, -3, -9, -14, -15. К достоинствам разработанного метода можно отнести его высокую производительность (43 образца могут быть протестированы параллельно), достаточно короткое время анализа – около 7 часов, использование недорогого оборудования. Ограничением метода является как неуниверсальность условий проведения гибридизационного анализа для различных субкластеров генов СТХ-М бета-лактамаз, так и ограниченное число определяемых ОНП (по 4 для субкластеров СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8 и 5 для субкластера СТХ-М-9).

Для генотипирования бета-лактамаз ТЕМ типа на основе определения всех ОНП предложен метод гибридизационного анализа на микрочипах из стекла [120]. В методе использовали флуоресцентную метку, которая вводилась в ген в процессе ПЦР в виде модифицированного дезоксирибозинтрифосфата (dCTP-Cy5). Схема метода гибридизационного анализа с флуоресцентной детекцией представлена на рис. 4А. Амплифицированная меченая ДНК перед гибридизацией фрагментировалась ДНКазой для получения олигонуклеотидных цепей с длиной около 50 оснований. Ранее было показано, что это способствует повышению эффективности гибридизации [121]. После гибридизации проводилось сканирование флуоресцентной активности на поверхности микрочипа. Для определения одного ОНП использовали набор из четырех олигонуклеотидов с уникальной последовательностью оснований, соответствующих структуре гена ТЕМ β-лактамазы в данном участке и отличающихся друг от друга только нуклеотидом в центральной позиции, в качестве

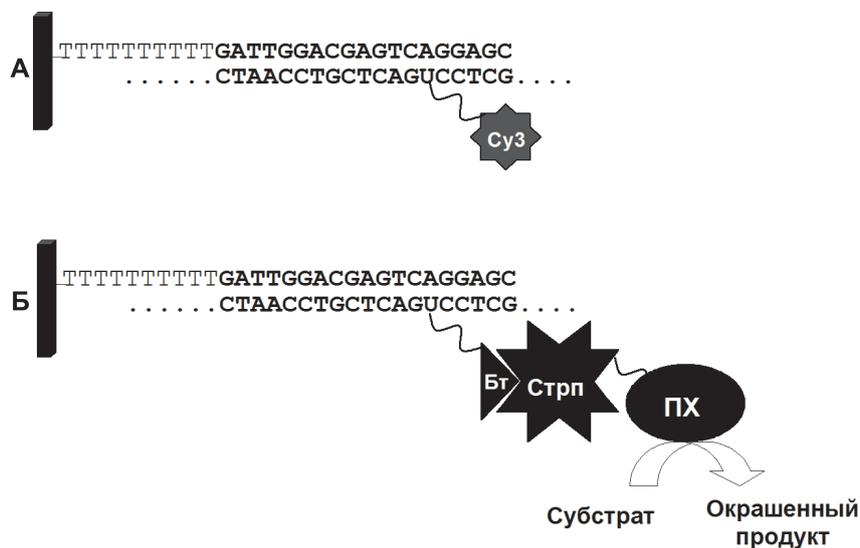


Рис. 4. Схема метода гибридационного анализа ДНК на микрочипах с различными метками: А – флуоресцентный краситель, Б – биотин.

которого использовали один из четырех нуклеотидов А, G, С или Т (рис. 5А). Наиболее стабильный дуплекс образуется при гибридизации меченого фрагмента с полностью комплементарным олигонуклеотидом и, соответственно, в этом случае детектируется более высокий аналитический сигнал (PM – perfect match) (рис. 5Б). Если дуплексы образуются в результате гибридизации с тремя остальными олигонуклеотидами или только некоторыми из них, то наблюдаемый сигнал (MM – mismatch) свидетельствует об уровне неспецифической гибридизации.

В работе выполнен молекулярный дизайн структур олигонуклеотидов для определения 41 ОНП в генах ТЕМ бета-лактамаз. Основными правилами подбора структур олигонуклеотидов для распознавания ОНП являлись следующие [122]: 1) длина олигонуклеотида должна составлять 17–26 оснований; 2) содержание оснований (С+G) должно находиться в диапазоне 35–70 %; 3) вероятность образования димеров и циклических структур должна быть минимальной; 4) различия в  $T_m$  для разных групп олигонуклеотидов должны составлять не более 5–10°C.

Для определения типа нуклеотида в исследуемой позиции гена использовали принцип внутренней нормировки сигнала. Для этого все результаты гибридизации с набором четырех олигонуклеотидов

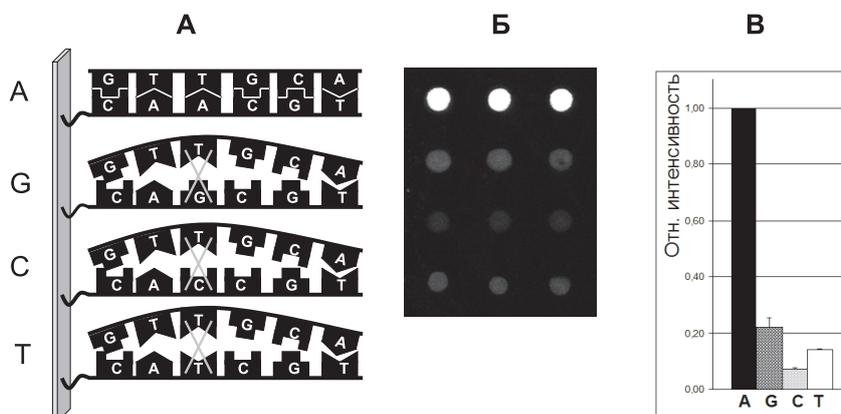


Рис. 5. А: Схема определения точечных мутаций в гене методом аллель специфической гибридизации.

Б: Результат определения точечных мутаций в гене методом гибридизационного анализа на микрочипе.

В: Представление результатов гибридизационного анализа для определения одной точечной мутации в гене в относительных единицах.

нормировали на сигнал комплементарной гибридизации. Таким образом получали гибридизационные сигналы в относительных единицах: сигнал комплементарной гибридизации становился равным 1, а три остальных сигнала некомплементарной гибридизации выражались в долях от него (рис. 5В):

$$RI_{PM} = I_{PM}/I_{PM} = 1,$$

$$RI_{MM} = I_{MM}/I_{PM},$$

где  $I_{PM}$  – интенсивность сигнала гибридизации с полностью комплементарным одигонуклеотидом,  $I_{MM}$  – интенсивность сигнала гибридизации с остальными тремя олигонуклеотидами,  $RI_{PM}$  – доля комплементарной гибридизации,  $RI_{MM}$  – доля некомплементарной (неспецифической) гибридизации.

Для оценки специфичности выявления ОНП использовали параметр доли неспецифической гибридизации  $RI_{MM} = I_{MM}/I_{PM}$ . Если доля неспецифической гибридизации превышала 0.7, то выявление ОНП рассматривалось как неспецифичное. Проведенный молекулярный дизайн структур олигонуклеотидов для выявления ОНП у бета-лактамаз TEM типа позволил достичь высокой специфичности определения мутаций: более 99% значений  $RI_{MM}$  не превышали 0.4, и только одна группа олигонуклеотидов характеризовалась значением  $RI_{MM} = 0.52$ . Авторами этой работы была сделана попытка

существенно сократить время гибридизации с трех часов до 15 мин. с целью разработки метода экспресс-анализа резистентных штаммов, который мог бы использоваться в клинических лабораториях. Было установлено, что при проведении реакции гибридизации в течение 1 часа 84% значений  $RI_{MM}$  не превышают 0.4, значения 14%  $RI_{MM}$  не превышают 0.6, и при определении одной мутации наблюдается значение  $RI_{MM}$ , близкое 0.7. Сокращение времени гибридизации до 30 мин. показало сходную специфичность, но худшую воспроизводимость результатов. При дальнейшем сокращении времени гибридизации до 15 мин. отмечено существенное ухудшение специфичности определения: шесть положений были определены неправильно, а 21% значений  $RI_{MM}$  превышали 0.7. Таким образом было установлено, что время гибридизации может быть снижено до 30 мин. При этом общее время анализа составило 3.5 часа, что является существенным улучшением по сравнению со стандартными фенотипическим тестами, проведение которых занимает 2–3 дня.

Такой же подход был использован нами для разработки гибридизационного анализа на микрочипах для генотипирования бета-лактамаз СТХ-М типа [123], отличие которых от других БЛРС класса А состоит в меньшей гомологии между генами одного типа. Поэтому наряду с олигонуклеотидами для идентификации точечных мутаций в генах были также подобраны структуры олигонуклеотидов для определения генетического субкластера.

В целом, бета-лактамазы СТХ-М типа отличаются от бета-лактамаз TEM и SHV типов более высоким G–C составом, что приводило к более высокому уровню неспецифической гибридизации по сравнению с ранее полученными данными [120]. Для уменьшения уровня неспецифической гибридизации проводили тщательный молекулярный дизайн структур специфических олигонуклеотидов. В качестве одного из способов повышения специфичности выявления центрального олигонуклеотида использовали введение искусственных замен в структуру олигонуклеотида. На рис. 6А приводятся результаты тестирования контрольного штамма, продуцирующего бета-лактамазу СТХ-М-3, методом гибридизационного анализа на микрочипах с использованием в качестве метки ДНК флуоресцентного красителя Су3. Специфичность выявления отдельных ОНП при проведении реакции гибридизации при 45°C оказалась недостаточно высокой: 16 % значений  $RI_{MM}$  превышали 0.7. При увеличении температуры гибридизации до 47°C специфичность идентификации ОНП улучшилась незначительно: увеличилась доля  $RI_{MM}$  со значениями менее 0.4, однако 10% значений  $RI_{MM}$  превышали 0.7 (рис. 6Б).

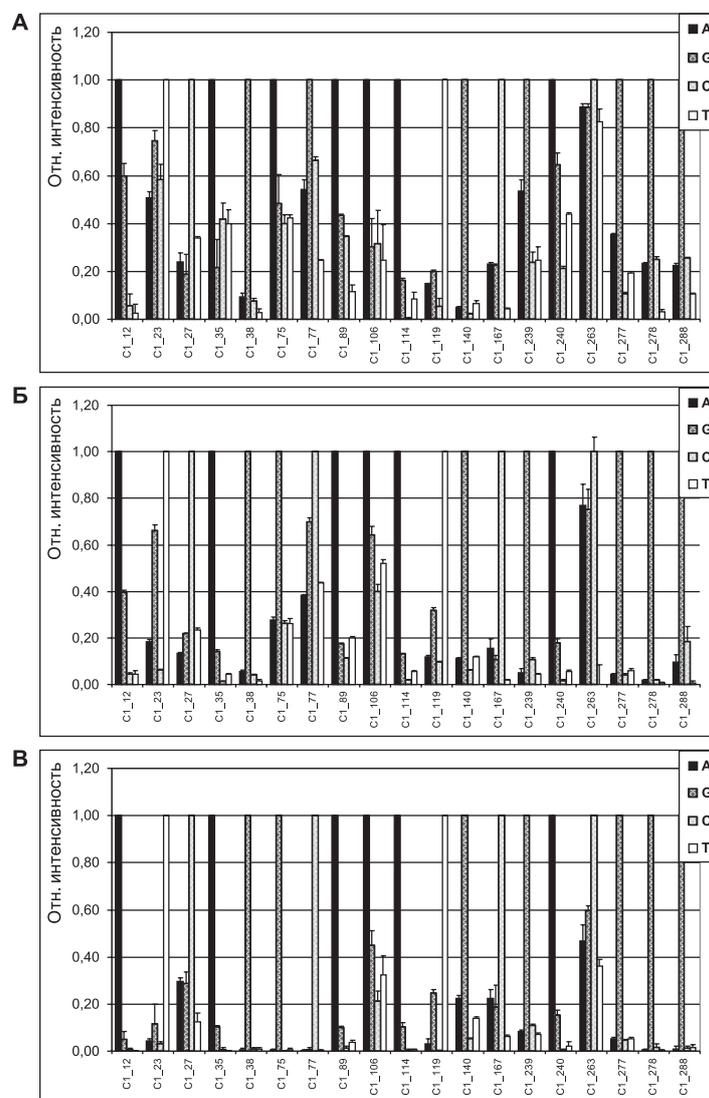


Рис. 6. Профили интенсивностей сигналов гибридизации меченой ДНК, амплифицированной из контрольного штамма, продуцирующего бета-лактамазу СТХ-М-3. По линии абсцисс обозначены номера мутаций в последовательности бета-лактамазы СТХ-М-1.

А: метка – Су3, условия гибридизации: 45<sup>0</sup>С, 1 час;

Б: метка – Су3, условия гибридизации: 47<sup>0</sup>С, 1 час;

В: метка – биотин, условия гибридизации: 45<sup>0</sup>С, 2 часа.

Поскольку эффективность реакции гибридизации и ее специфичность определяются вторичной структурой олигонуклеотидных цепей, на которую может оказывать влияние вводимая в ген метка, мы изучили введение альтернативной метки ДНК – биотина, молекула которого имеет существенно меньшие размеры по сравнению с флуоресцентными метками группы цианинов [124]. Схема проведения гибридизационного анализа с биотином в качестве метки изображена на рис. 4Б. В ген бета-лактамазы вводили биотин в процессе ПЦР (в составе dUTP-биотин). Введенный биотин выявляли с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена (ПХ) и колориметрической детекции ПХ с использованием субстратов, окисление которых сопровождается образованием интенсивно окрашенного продукта, адсорбирующегося на поверхности стекла вблизи локализации молекул фермента. На рис. 6В приводятся результаты тестирования контрольного штамма, продуцирующего бета-лактамазу СТХ-М-3, методом гибридизационного анализа на микрочипах с использованием в качестве метки ДНК биотина. Специфичность выявления ОНП методом гибридизационного анализа с биотином в качестве метки была существенно выше даже при проведении реакции гибридизации при 45° С. На рис. 7 приводятся данные по сравнению специфичности выявления 19 различных ОНП, описанных для бета-лактамаз субкластера СТХ-М-1, методом гибридизационного анализа с флуоресцентной и колориметрической детекцией. Использование биотина в качестве метки позволило добиться наилучшей специфичности определения точечных мутаций: 94% значений  $RI_{MM}$  не превышали 0.4. Всего были подобраны структуры олигонуклеотидных зондов для выявления 67 ОНП в генах бета-лактамаз СТХ-М типа. Разработанный метод был апробирован с использованием коллекции из 94 клинических штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*. Было получено 100% совпадение данных генотипирования методом гибридизационного анализа на микрочипе с данными полного секвенирования гена.

Таким образом, выполненные исследования по мультипараметрическому типированию ОНП в генах бета-лактамаз TEM и СТХ-М типов методом аллель-специфической гибридизации на микрочипах показали хороший потенциал данного метода. Особенностью рассматриваемого подхода является его достаточная универсальность и возможность расширения типа идентифицируемых генов и мутаций.

В дальнейшем это было подтверждено при разработке интегрированного метода микроматриц для одновременного генотипирования трех наиболее клинически значимых БЛРС (TEM, SHV и СТХ-М

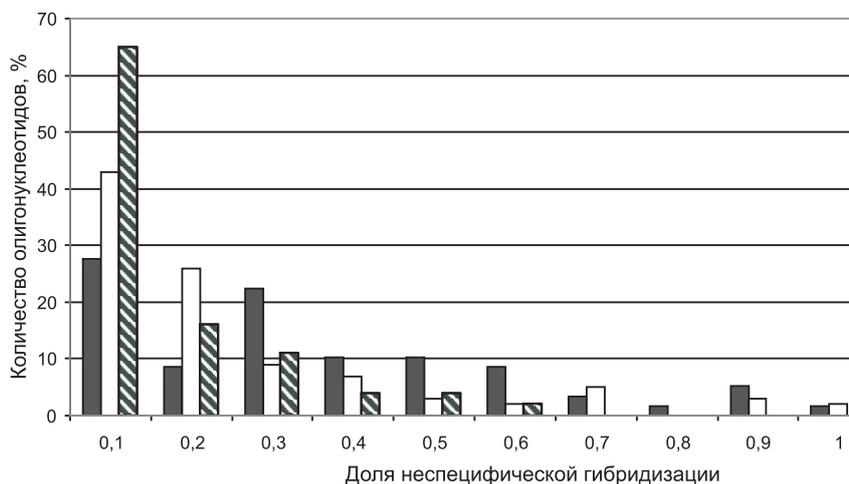


Рис. 7. Относительная специфичность выявления точечных мутаций в генах бета-лактамаз СТХ-М типа методом гибридизационного анализа на микрочипах с флуоресцентной и колориметрической детекцией.

- – метка ДНК – Су3, условия гибридизации: 45° С, 1 час;
- – метка ДНК – Су3, условия гибридизации: 47° С, 1 час;
- ▨ – метка ДНК – биотин, условия гибридизации: 45° С, 2 часа.

типов) на основе определения ОНП в кодирующих генах [125]. Для амплификации генов были разработаны две мультиплексные ПЦР: в одной амплифицировались гены бета-лактамаз TEM и SHV типов, во второй – два фрагмента генов бета-лактамаз СТХ-М типа, относящихся ко всем четырем субкластерам и в сумме составляющих полноразмерный ген (открытую рамку считывания). В качестве метки ДНК была использована флуоресцентная метка Су3, которая вводилась в ген в процессе ПЦР. Для определения одного ОНП использовали набор из четырех олигонуклеотидов, различающихся типом нуклеотида в центральной позиции или в позиции, близкой к центральной. Предложено располагать группы олигонуклеотидов на микрочипе в виде модулей, каждый из которых содержит группы олигонуклеотидов для определения мутаций в генах бета-лактамаз одного типа. Это позволит в будущем добавлять новые группы олигонуклеотидов для выявления новых мутаций в исследуемых типах генов, а также новые модули олигонуклеотидов для выявления новых типов бета-лактамаз.

Основная проблема интеграции разработанных ранее трех панелей олигонуклеотидов для генотипирования, соответственно, TEM, SHV и CTX-M типов бета-лактамаз в один микрочип заключается в оптимизации условий, обеспечивающих эффективную гибридизацию олигонуклеотидов разной структуры при сохранении высокой чувствительности и специфичности анализа. Вследствие различий в структурах генов исследуемых типов БЛРС и более высокого G–C состава генов CTX-M типа для повышения специфичности анализа температура гибридизации была увеличена до 47°C по сравнению с температурой, выбранной ранее для генотипирования бета-лактамаз TEM типа. Гибридизацию проводили в автоматическом режиме на гибридизационной станции в течение 1 часа. Для уменьшения вероятности образования димеров и других стабильных элементов вторичной структуры в последовательности некоторых олигонуклеотидов были введены искусственные замены. Проведенный молекулярный дизайн структур специфических олигонуклеотидов позволил добиться очень высокой специфичности определения ОНП: в 94% олигонуклеотидов доля неспецифической гибридизации не превышала значение 0.4. Разработанный метод позволяет определять одновременно более 150 ОНП, что значительно превышает количество определяемых одновременно параметров другими методами.

Интегрированный микрочип был протестирован с использованием 60 образцов, которые были охарактеризованы стандартными фенотипическими тестами определения чувствительности штаммов к панели антибиотиков и их комбинаций с ингибиторами. Данные гибридизационного анализа на микрочипе показали 93% чувствительность и 100% специфичность метода. У 54 образцов были обнаружены БЛРС одного или нескольких типов. Для 4 образцов фенотипически установленная резистентность не могла быть объяснена продукцией БЛРС. К преимуществам разработанного метода можно отнести успешную идентификацию смеси генотипов, принадлежащих не только к разным типам генов (например, TEM-1 и SHV-12; TEM-1, SHV-1 и CTX-M-15), но и смеси двух генов, принадлежащих к одному генетическому типу (например, CTX-M-15 и CTX-M-14b; SHV-1 и SHV-14). Данные результаты были подтверждены методом секвенирования. Следует отметить, что детекция смесей двух генов на микрочипе осуществляется более четко и надежно, особенно если гены относятся к одному типу, в то время как при секвенировании обнаружение двух пиков на хроматограмме вызывает затруднения, особенно при автоматической обработке результатов.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие бета-лактамаз и чрезвычайно быстрое распространение известных детерминант резистентности, появление как новых детерминант, так и новых сочетаний описанных ранее детерминант устойчивости вызывают необходимость разработки адекватных способов их клинической диагностики для выбора правильного курса терапии, а также контроля за распространением инфекционных заболеваний. Молекулярно-биологические методы изучения структур генов являются незаменимыми для решения этих задач. Амплификационные и гибридизационные технологии позволили уже в настоящее время поднять на качественно новый уровень диагностику многих инфекционных и генетических заболеваний.

Тестирование устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам проводится как на «микро» уровне, когда определяется резистентность в отдельном клиническом учреждении или у отдельной группы пациентов, так и на «макро» уровне, когда проводятся межцентровые, национальные и интернациональные исследования, в которых анализируются сотни, тысячи и десятки тысяч штаммов возбудителей, собранных в различных лечебных учреждениях. Для проведения масштабных исследований желательно иметь методы, позволяющие определять множество параметров в одной реакции, характеризующиеся достаточной чувствительностью и специфичностью и при этом высокой производительностью.

Широкое внедрение для этих целей методов секвенирования затруднено как вследствие сложности и трудоемкости метода, необходимости специализированного дорогостоящего оборудования, так и достаточно высокой стоимости анализа. Использование методов мультипараметрического анализа на микрочипах представляется удобной альтернативой методу секвенирования. Осуществление мультипараметрического определения генов и мутаций в них методом гибридизационного анализа на микрочипах имеет большой потенциал для использования его при изучении молекулярных механизмов резистентности и распространения инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Livermore, D.M.* (1995) *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 557–584.
2. *Pitout, J.D., Laupland, K.B.* (2008) *Lancet Infect. Dis.*, **8**, 159–166.
3. *Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., Bonomo, R.A.* (2000) *Curr. Opin Pharmacol.*, **7**, 459–469.
4. *Schwaber, M. J., Carmeli, Y.* (2007) *J. Antimicrob. Chemother.*, **60**, 913–9205.
5. *Schwaber, M. J., Navon-Venezia, S., Kaye, K. S., Ben Ami, R., Schwartz, D., and Carmeli, Y.* (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 1257–1262.
6. *Bradford, P.* (2001) *Clin. Microbiol. Reviews*, **14**, 933–951.
7. *Babic, M., Hujer, A.M., and Bonomo, R.A.* (2006) *Drug Resistance Updates*, **9**, 142–156.
8. *Paterson, D.L., Bonomo, R.A.* (2005) *Clin. Microbiol. Reviews*, **18**, 657–686.
9. *Сидоренко С.В., Тишков В.И.* (2004) *Успехи биол. химии*, **44**, 263–306.
10. *Page, M.I.* (1987) *Advan. Phys. Organic Chem.*, **23**, 165–170.
11. *Massova, I., Mobashery, S.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1–17.
12. *Nukaga, M., Haruta, S., Tanimoto, K., Kogure, K., Taniguchi, K., Tamaki, M., Sawai, T.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5729–5735.
13. *Ghuysen, J.M.* (1994) *Trends Microbiol.*, **2**, 372–380.
14. *James, P.A., Reeves, D.S.* (1996) *J. Chemother.*, **8**, Suppl 2, 37–47.
15. *Chambers, H.F.* (1997) *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 781–791.
16. *Heritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann, P.* (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3198–3202.
17. *Heritier, C., Poirel, L., Fournier, P.E., Claverie, J.M., Rauolt, D., Nordmann, P.* (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4174–4179.
18. *Livermore, D.M., Pearson, A.* (2007) *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, Suppl.2, 7–16.
19. *Harada, S., Yoshikazu, I., and Keizo, Y.* (2008) *Korean J. Lab. Med.*, **28**, 401–412.
20. *Woodford, N., Ellington, M.J.* (2007) *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, 5–18.
21. *Medeiros, A.A.* (1997) *Clin. Infect. Dis.*, **24**, Suppl 1, S19–S45.
22. *Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P.* (2008) *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, 75–81.
23. *Weldhagen, G.F.* (2004) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **23**, 556–562.
24. *Fleming, P.C., Goldner, M., Glass, D.G.* (1963) *Lancet*, **1**, 1399–1401.
25. *Richmond, M.H., Sykes, R.B.* (1973) *Adv. Microb. Physiol.*, **9**, 31–38.
26. *Sykes, R.B., Matthew, M.* (1976) *J. Antimicrob. Chemother.*, **2**, 115–157.
27. *Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1211–1233.
28. *Ambler, R.P.* (1980) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **289**, 321–331.
29. *Bush, K.* (2001) *Clin. Infect. Diseases*, **32**, 1085–1089.
30. *Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A.* (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1–11.
31. *Maltezou, H.C.* (2009) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, e1–e7.
32. *Tamilselvi, A., Govindasamy, M.* (2008) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 1039–1053.

33. Pitout, J.D., Laupland, K.B. (2008) *Lancet Infect. Dis.*, **8**, 159–166.
34. Livermore, D.M. (2008) *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, Suppl 1, 3–10.
35. Empel, J., Baraniak, A., Literacka, E., Mrowka, A., Fielt, J., Sadowy, E. et al. (2008) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 2449–2454.
36. Rodríguez-Bano, J., Navarro, M.D., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M.A., Perea, E.J., Pérez-Cano, R., and Pascual, A. (2004) *J. Clin. Microb.*, **42**, 1089–1094.
37. Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B. et al. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 3554–3560.
38. Bush, K. (2008) *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, Suppl 1, 134–143.
39. Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodriguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, Couto, D., Gutkind, G. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2864–2867.
40. Mulvey, M.R., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-Agostini, M., Christianson, S., Simor, A.E., Paton, Sh. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1204–1214.
41. Hawkey, P.M. (2008) *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, Suppl 1, 159–165.
42. Wu, T.L., Chia, J.H., Su, L.H., Kuo, A.J., Chu, C., Chiu, C.H. (2003) *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4836–4838.
43. Schlesinger, J., Navon-Venezia, S., Chmelnitsky, I., Hammer-Munz, O., Leavitt, A., Gold, H.S. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 1150–1156.
44. Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G, Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., and Woodford, N. (2007) *J. Antimicrob. Chemother.*, **59**, 165–174.
45. Livermore, D.M., and Hawkey, P.M. (2005) *J. Antimicrob. Chemother.*, **56**, 451–454.
46. Lartigue, M.F., Zinsius, C., Wenger, A., Bille, J., Poirel, L., and Nordmann, P. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 2855–2860.
47. Mugnaioli, C., Luzzaro, F., De Luca, F., Brigante, G., Perilli, M., Amicosante, G., Stefani, S., Toniolo, A., and Rossolini, G.M. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2700–2706.
48. Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., and Rossolini, G.M. (2003) *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 4264–4269.
49. Wang, H., Kelkar, S., Wu, W., Chen, M., and Quinn J.P. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 790–793.
50. Canton, R., and Coque, T.M. (2006) *Curr. Opinion Microbiol.*, **9**, 466–475.
51. Jones, J.L., Muccioli, C., Belfort, R., Holland, G.N., Roberts, J.M., and Silveira, C. (2007) *Emerging Infect. Dis.*, **13**, 513–514.
52. Мудрак Д.Е., Икрянникова Л.Н., Сидоренко С.В., Ильина Е.Н. (2007) *Антибиотики и химиотерапия*, **52**, 10–16.
53. Egorova, S., Kaftyreva, L., Grimont, P.A., Weill, F.X. (2007) *Microb. Drug Resist.*, **13**, 102–107.
54. Иванов Д.В., Егоров А.М. (2008) *Биомедицинская химия*, **54**, 104–113.
55. Сидоренко С.В., Березин А.Г., Иванов Д.В. (2004) *Антибиотики и химиотерапия*, **49**, 6–15.
56. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3724–3732.

57. Datta, N., Kontomichalou, P. (1965) *Nature*, **208**, 239–241.
58. Du Bois, S.K., Marriott, M.S., Amyes, S.G. (1995) *J. Antimicrob. Chemother.*, **35**, 7–22.
59. Mabilat, C., Lourencao-Vital, J., Goussard, S., Courvalin, P. (1992) *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 113–121.
60. Chaibi, E.B., Sirot, D., Paul, G., Labia, R. (1999) *J. Antimicrob. Chemother.*, **43**, 447–458.
61. Strynadka, N.C., Adachi, H., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutton, K., James, M.N. (1992) *Nature*, **359**, 700–705.
62. Petrosino, J.F., Palzkill, T. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 1821–1828.
63. Hayes, F., Hallet, B., Cao, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 28833–28836.
64. Knothe, H., Shah, P., Kremery, V., Antal, M., Mitsuhasi, S. (1983) *Infection*, **11**, 315–317.
65. Bauernfeld, A., Grimm, H., Shweighart, S. (1990) *Infection*, **18**, 294–298.
66. Bonnet, R. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1–14.
67. Tzouveleakis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., Legakis, N.J. (2000) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **14**, 137–143.
68. Bonnet, R., Champs, C.D., Sirot, D., Chanal, C., Labia, R., Sirot, J. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2671–2677.
69. Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J.E. Jr., Tenover, F.C. (2001) *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2864–2872.
70. Weigand, I., Geiss, H.K., Mack, D., Stürenburg, E., and Seifert, H. (2007) *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1167–1174.
71. Robberts, F.J.L., Kohner, P.C., and Patel, R. (2009) *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 358–361.
72. Drioux, L., F. Brossier, Sougakoff, W., and Jarlier, V. (2008) *Clin. Microbiol. Infect.*, **14**, 90–103.
73. Wiegand, I., Geiss, H.K., Mack, D., Stürenburg, E., Seifert, H. (2007) *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1167–1174.
74. Paterson, D.L. (2008) *Curr. Opin Infect. Dis.*, **14**, 697–701.
75. Brookes, A.J. (1999) *Gene*, **234**, 177–186.
76. Monstein, H.J., Östholm-Balkhed, A., Nilsson, M.V., Nilsson, M., Dornbusch, K., and Nilsson, L.E. (2007) *APMIS*, **115**, 1400–1408.
77. Woodford, N., Fagan, E.J., and Ellington, M.J. (2006) *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**, 154–155.
78. Xu, L., Ensor, V., Gossain, S., Nye, K., and Hawkey, P. (2005) *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1183–1187.
79. Pitout, J.D.D., Hamilton, N., Church, D.L., Nordmann, P., and Poirel, L. (2007) *Clin. Microbiol. Infect.*, **13**, 291–297.
80. Birkett, C.I., Ludlam, H.A., Woodford, N., Brown, D.F.G., Brown, N.M., Roberts, M.T.M., Milner, N., and Curran, M.D. (2007) *J. Med. Microbiol.*, **56**, 52–55.
81. Szabó, D., Melan, M.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Hujer, K.M., Bethel, C.R., Kristóf, K., Paterson, D.L. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 4716–4720.
82. Randegger, C.C., Hächler, H. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1730–1736.
83. Nikulin, A., Alexeev, Y., Edelstein, M. (2007) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **29**, Suppl. 2, S222.

84. Stepanova, M., Nikulin, A., Sukhorukova, M., Edelstein, M. (2007) Abstracts of 17th European Congress Clin. Microbiol. & Infect. Dis. / 25th Int. Congress Chemother., March 31 – April 3, 2007, Munich, Germany, 1732–130.
85. Schumm, J.W., Knowlton, R.G., Braman, J.C., Barker, D.F., Botstein, D., Akots, G., Brown, V.A., Gravius, T.C., Helms, C., Hsiao, K. (1989) *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 143 – 159.
86. Kalai Blagui, S., Achour, W., Abdeladhim, A., Ben Hassen, A. (2009) *Pathol. Biol.*, **57**, 420–424.
87. M'Zali, F.-H., Gascoyne-Binzi, D.M., Heritage, J., and Hawkey, P.M. (1996) *J. Antimicrob. Chemother.*, **37**, 797–802.
88. Alonso, R., Fernández-Aranguiz, A., Colom, K., Cisterna, R. (2002) *J. Microbiol. Meth.*, **50**, 85–90.
89. Ikryannikova, L.N., Shitikov, E.A., Zhivankova, D.G., Il'ina, E.N., Edelstein, M.V., Govorun, V.M. (2008) *J. Microbiol. Meth.*, **75**, 385–391.
90. Xu, L., Evans, J., Ling, T., Nye, K., and Hawkey, P. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 1446–1454.
91. Naas, T., Oxacelay, C., and Nordmann, P. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 223–230.
92. Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P. (2006) *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3008–3011.
93. Southern, E.M., Maskos, U. and Elder, J.K. (1992) *Genomics*, **13**, 1008–1017.
94. Doss, V.A., Parvathi, S., Raju, B.A., Devi, N.A. (2004) *Dis. Markers*, **20**, 317–323.
95. Rodríguez, I., Barownick, W., Helmut, R., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Schroeter, A., Guerra, B. (2009) *J. Antimicrob. Chemother.*, **64**, 301–309.
96. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) *Science*, **270**, 467–470.
97. Heller, M.J. (2002) *Annu. Rev. Biomed.*, **4**, 129–153.
98. Guckenberger, M., Kurz, S., Aepinus, C., Theiss, S., Haller, S., Leimbach, T., Panzner, U., Weber, J., Paul, H., Unkmeir, A., Frosch, M., Dietrich, G. (2002) *Amer. Soc. Microbiol.*, **184**, 2546–2551.
99. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., and Levy, D.D. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3258–3263.
100. Cao, X., Wang, Y.F., Zhang, C.F., Gao, W.J. (2006) *Biosens. & Bioelectron.*, **15**, 393–398.
101. Ozsoz, M. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 2181 – 2187.
102. Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X.C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D.J., Morris, M.S., Fodor, S.P. (1996) *Science*, **274**, 610–614.
103. Shogo, M., Shigehiko, U., Suzuki, O., Urano, A., and Abe S. (2005) *Mar. Biotechnol.* **6**, 430–434.
104. Michikawa, Y., Fujimoto, K., Kinoshita, K., Kawai, S., Sugahara, K., Suga, T., Otsuka, Y., Fujiwara, K., Iwakawa, M., Imai, T. (2006) *Anal. Sci.*, **22**, 1537–1545.
105. Lee, Y., Lee, C. S., Kim, Y.J., Chun, S., Park, S., Kim, Y.S. and Han, B.D. (2002) *Mol. Cells*, **14**, 192–197.
106. Chen, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Schroeder, C. M., White, D. G. and Meng, J. (2005) *Mol. Cell Probes*, **19**, 195–201.

107. Cleven, B.E.E., Palka-Santini, M., Gielen, J., Meembor, S., Krönke, M., and Krut, O. (2006) *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 2389–2397.
108. Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., and Frey, J. (2005) *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2291–2302.
109. Batchelor, M., Hopkins, K.L., Liebana, E., Slickers, P., Ehricht, R., Mafura, M., Aarestrup, F., Mevius, D., Clifton-Hadley, F.A., Woodward, M.J., Davies, R.H., Threlfall, E.J., Anjum, M.F. (2008) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 440–451.
110. Cassone, M., Andrea, M.M.D., Ianelli, F., Oggioni, M.R., Rossolini, G.M., and Pozzi, G. (2006) *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **50**, 2038–2041.
111. Yu, X., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R.D., and Bachmann, T.T. (2004) *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 4083–4091.
112. Zhu, L. X., Zhang, Z. W., Liang, D., Jiang, D., Wang, C., Du, N., Zhang, Q., Mitchelson, K., and Cheng, J. (2007) *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3707–3713.
113. Strommenger, B., Schmidt, C., Werner, G., Roessle-Lorch, B., Bachmann, T.T., and Witte, W. (2007) *Mol. Cell Probes*, **21**, 161–170.
114. Rubina, A.Yu., Pan'kov, S.V., Dementieva, E.I., Pen'kov, D.N., Butygin, A.V., Vasiliskov, V.A., Chudinov, A.V., Mikheikin, A.L., Mikhailovich, V.M., Mirzabekov, A.D. (2004) *Anal. Biochem.*, **325**, 92–106.
115. Gryadunov, D., Mikhailovich, V., Lapa, S., Roudinskii, N., Donnikov, M., Pan'kov, S., Markova, O., Kuz'min, A., Chernousova, L., Skotnikova, O., Moroz, A., Zasedatelev, A., Mirzabekov, A. (2005) *Clin. Microb. Infect.*, **11**, 531–539.
116. Shibata, N., Kurokawa, H., Doi, Y., Yagi, T., Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Ishikawa, S., Kato, H., Ozawa, Y., Shibayama, K., Kai, K., Konda, T., Arakawa, Y. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 791–795.
117. Pitout, J.D.D., Hossain, A., Hanson, N.D. (2004) *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5715–5721.
118. Schmitt, J., Jacobs, E., Schmidt, H. (2007) *J. Med. Microbiol.*, **56**, 241–249.
119. Ensor, V.M., Livermore, D.M., Hawkey, P.M. (2007) *J. Antimicrob. Chemotherapy*, **59**, 387–395.
120. Grimm, V., Ezaki, S., Susa, M., Knabbe, C., Schmid, R.D., and Bachmann, T.T. (2004) *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3766–3774.
121. Hughes, T.R., Mao, M., Jones, A.R., Burchard, J., Marton, M.J., Shannon, K.W., Lefkowitz, S.M., Ziman, M., Schelter, J.M., Meyer, M.R., Kobayashi, S., Davis, C., Dai, H., He, Y.D., Stephaniants, S.B., Cavet, G., Walker, W.L., West, A., Coffey, E., Shoemaker, D.D., Stoughton, R., Blanchard, A.P., Friend, S.H., Linsley, P.S. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 342–347.
122. Bodrossy, L. (2003) *A Beginner's Guide to Microarrays*. New York: Kluwer Academic Publishers, 43–92.
123. Rubtsova, M.Yu., Ulyashova, M.M., Ignatenko, O.V., Edelstein, M.V., Egorov, A.M., Schmid, R.D., Bachmann, T.T. (2008) Abstracts of 8<sup>th</sup> Int. Meeting on Microb. Epidemiol. Markers, Zakopane, Poland, May 14–17, 109.
124. Уляшова М.М., Рубцова М.Ю., Бахманн Т., Егоров А.М. (2008) Вестник Московского Университета, серия 2, Химия, **49**, 96–101.

125. *Leinberger, D.M., Grimm, V., Rubtsova, M., Weile, Y., Schröppe, K., Wichelhaus, T.A., Knabbe, C.,*

*Schmid, R.D., Bachmann, T.T.* (2010)  
*J. Clin. Microbiol.*, **48**, 460–471.