

5. БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 619:616.98-076:579.842.1/.2:577.2.08

DOI 10.36016/VM-2025-111-21

РОЗРОБКА ТЕХНІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ПРОВЕДЕННЯ ПЛР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ГЕНА АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ bla_{NDM} В ІЗОЛЯТАХ ENTEROBACTERIALES І КЛІНІЧНИХ ЗРАЗКАХ

Юрко П. С., Дідик Т. Б., Зленко О. Б., Kim M. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: yurkopolina81@gmail.com

Резистентність мікроорганізмів до антибіотиків — одна із ключових проблем сучасності. Серед усіх генів стійкості слід відмітити — гени резистентності до β -лактамів взагалі та відносно новий ген метало- β -лактамази Нью-Делі (bla_{NDM}) зокрема. Усе більше розповсюдження зазначеного гена серед збудників як госпітальних інфекцій, так і в птахівництві та тваринництві вказує на необхідність постійного контролю наявності гена bla_{NDM} у мікроорганізмів. У статті показано етапи розробки параметрів ПЛР для виявлення гена bla_{NDM} . Установлено оптимальну температуру відпалу на рівні 62 °C, кількість циклів — 40 (за умови використання ампліфікатора T-3000 «Biometra»). За результатами проведення первинних валідаційних випробувань встановлено високий рівень аналітичної чутливості, специфічності, повторюваності та відтворюваності методики. Розроблений метод дозволить ефективно виявляти ген bla_{NDM} як в штамах мікроорганізмів, так і в клінічному матеріалі

Ключові слова: метало- β -лактамаза Нью-Делі, полімеразна ланцюгова реакція, праймери

Протягом останніх десятиліть вирішення питання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків є однією із найголовніших проблем сучасної біотехнології та медицини, як гуманної, так і ветеринарної. Формування та поширення резистентності до β -лактамів, зокрема до карбапенемів у грамнегативних бактерій є однією з найбільш актуальних проблем антибіотикорезистентності [1]. З моменту першого використання карбапенемів у 1985 році, вони активно використовувалися у клінічній практиці та були основними протимікробними засобами вибору для лікування важких інфекцій, спричинених багатьма грамнегативними бактеріями завдяки широкому спектру дії, до моменту набуття представниками бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* резистентності [1–5].

Центр з контролю та профілактики захворювань США (Center for Disease Control and Prevention, CDC) присвоїв “терміновий” рівень загрози резистентним до карбапенему *Enterobacteriaceae*, а Всесвітня організація з охорони здоров’я (World Health Organization, WHO) виявила продукцію карбапенемази бактеріями *Klebsiella pneumoniae* та *Escherichia coli* проблемою міжнародного рівня [6].

Карбапенемази є β -лактамазами, що належать до різних класів за класифікацією Амблера (класи A, B, C і D), які включають більш ніж 2000 видів ферментів, що відрізняються між собою за будовою свого активного центру, гомологією амінокислотної послідовності, генетичною локалізацією (хромосомна або/та плазмідна), чутливістю до дії інгібіторів, ферментативною стабільністю, а також за субстратною специфічністю [7]. Ферменти класу B, відомі як метало- β -лактамази (МБЛ), істотно відрізняються від усіх інших β -лактамаз наявністю одного або двох атомів цинку (Zn^{2+}) в активному центрі та мають найбільший широкий спектр гідролітичної активності (включає всі β -лактами) і у зв’язку з цим мають особливе клінічне та епідеміологічне значення [2].

Однією з більш 10 відомих генетичних груп, що кодують MBL, є Нью-Делі метало- β -лактамаза (NDM), яка відрізняється універсальністю та дуже високою здатністю розщеплювати усі види β -лактамних антибіотиків.

NDM-1 вперше була виявлена в 2009 році у ізоляту *Klebsiella pneumoniae*, виділеного у шведського пацієнта з інфекцією сечових шляхів після подорожі до Нью-Делі. Проблема NDM-1 здобула світову популярність після публікації у вересні 2010 р. у журналі «Lancet Infectious Diseases» статті Kumarasamy et al., що свідчила про виділення штамів з NDM-1 в Індії, Пакистані та Великій Британії [8]. Поява нових повідомлень про виявлення NDM-позитивних штамів в багатьох країнах Європи, а також США, що спричинило значне підвищення рівня смертності, викликало серйозне занепокоєння у організацій з охорони здоров'я у всьому світі [6].

Після 2009 року NDM було виявлено не тільки в ізолятах *Klebsiella pneumoniae*, а також в інших представників сімейства *Enterobacteriaceae*, а саме у *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., крім того і у видів *Acinetobacter* і *Pseudomonas* [9, 10].

Таке швидке зростання поширеності клінічних інфекцій, викликаних NDM-позитивними штамми ентеробактерій, в основному пояснюється горизонтальною передачею плазмід, що несуть гени *bla_{NDM}* між різними штамми *Enterobacteriaceae* [5, 11, 12, 14, 15].

До недавнього часу дослідження NDM-позитивних бактерій стосувалось лише гуманної медицини. Однак, після 2015 року почали з'являтися повідомлення про носійство *bla_{NDM}* серед мікроорганізмів, виділених від домашніх птахів [16]. Так, Bao-Tao Liu et al. встановили наявність гена *bla_{NDM}* у мікроорганізмів, виділених із зразків біоматеріалу курей [17], Min-Ge Wang et al. — антибіотикорезистентних бактерій із зразків, отриманих з качиних ферм [18], Wang Y. виявив його при дослідженні зразків з інкубаторів, курячих клоак, сліпої кишки та м'яса курей з курячої ферми [19]. Підтверджено, що NDM-позитивні ізоляти *E. coli* широко поширені у домашніх тварин, включаючи курей, худобу, собак і мух [18]. Liu et al. виявили NDM-позитивні *E. coli* від свиней [11]. Згідно з останніми даними, присутність *bla_{NDM}* в ізолятах *K. pneumoniae* від корів, хворих на мастит, викликає серйозне занепокоєння щодо здоров'я людини, оскільки молоко може бути джерелом великої кількості бактеріальних інфекцій та поширювати резистентні мікроорганізми [20].

У останні роки з'являється багато повідомлень про виявлення гена *bla_{NDM}* у зразках навколишнього середовища, таких як проби ґрунту та стічні води, що становить серйозну загрозу для здоров'я населення [14, 21, 22].

Існує кілька повідомлень про те, що NDM-позитивні штамми були виявлені у здорових осіб, що також сприяє розповсюдженню гена *bla_{NDM}* через представників нормальної мікрофлори [3].

Подальше вивчення шляхів формування та поширення резистентності клінічних штамів ентеробактерій до β-лактамних антибіотиків потребує використання сучасних методів досліджень, у тому числі молекулярно-генетичних. ПЛР-результати вивчення гена *bla_{NDM}* можна використовувати з метою проведення протиепізоотичних заходів, що будуть спрямовані на своєчасне виявлення джерела інфекцій та переривання механізмів і шляхів передачі збудників.

В даний час в Україні недостатньо відомостей про закономірності поширення гена *bla_{NDM}*, що пов'язано з відсутністю технічних умов визначення цього гена [7]. Тому, розробка технічних параметрів ПЛР для виявлення гена *bla_{NDM}* є дуже необхідною та актуальною задачею.

Метою роботи було визначити та перевірити послідовність праймерів та відпрацювати оптимальні параметри проведення полімеразної ланцюгової реакції на виявлення гена *bla_{NDM}*.

Матеріали та методи. Для проведення досліджень в якості тест-об'єктів були використані культури колекційних польових ізолятів сальмонел, клебсієл та кишкової палички, які знаходяться на зберіганні у лабораторії молекулярної діагностики та сектору за умов наднизьких температур (–70 °C).

Нуклеїнові кислоти із зразків екстрагували за допомогою комерційного набору ДНК/РНК Patho Gene-spin™ (iNtRON Biotechnology).

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції були використані праймери, які є специфічними для гена метало-β-лактамази Нью-Делі (*bla_{NDM}*):

bla_{NDM} F 5'-ATGGAATTGCCCAATATTAT-3'

bla_{NDM} R 5'-TCAGCGCAGCTTGTCGGCCA-3' [3].

Для ефективної ампліфікації були проведені випробування з готовими комерційними сумішами для полімеразної ланцюгової реакції. Відпрацьовано температурні режими ампліфікації для встановлення оптимального для практичного використання методики.

Електрофорез продуктів ампліфікації проводили у 1,5 %-му агарозному гелі за 140 V 30 хвилин. Візуалізували зразки за допомогою етидія броміду в ультрафіолетовому спектрі.

Для первинної валідації методики постановки полімеразної ланцюгової реакції була використана стандартна схема випробувань, яка складається із визначення наступних показників: специфічність, визначення межі детекції, оцінка відтворюваності, оцінка надійності методу, оцінка відсутності перехресної контамінації. Проведення випробування діагностичної ефективності методики з встановленням параметрів діагностичної чутливості, специфічності, прогностичної значимості позитивних та негативних результатів.

Результати та обговорення. В ході досліджень було визначено параметри проведення ампліфікації з використанням праймерної системи для виявлення гена метало- β -лактамази Нью-Делі (*bla_{NDM}*) та складу реакційної суміші для постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для постановки ПЛР було використано праймери, що є специфічними для гена метало- β -лактамази Нью-Делі (*bla_{NDM}*) та фланкують ділянку розміром 813 п. н. [2].

На першому етапі було теоретично та за використання платформи Primer-BLAST розраховано температуру відпалу для кожного праймеру (рис. 1).

Primer-BLAST » JOB ID:ERvOpc0EwKznktqX1_f-pa3s75eA_SKgQ

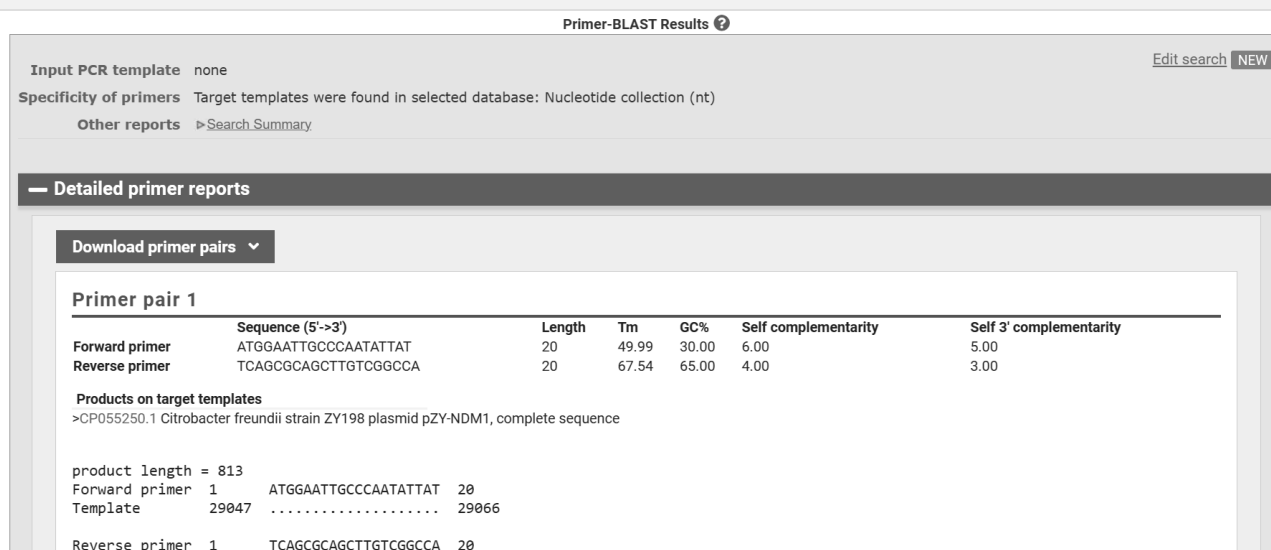


Рис. 1. Результати розрахунку температури відпалу за використання платформи Primer-BLAST.

За результатами підрахунків температура відпалу складає для прямого праймеру на рівні 50 °C, в той час, як для зворотнього праймеру — 67 °C. Таким чином, різниця температур більше 10 °C.

За протоколом Feng et al. [2] для обраних нами праймерів температура відпалу встановлена на рівні 55 °C, однак у публікації вирізано із електрофореграми тільки частину з цільовим фрагментом, що не дозволяє оцінити якість результатів ампліфікації (рис. 2).

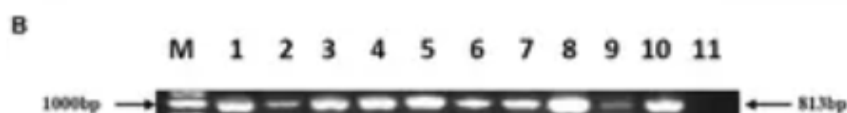


Рис. 2. Електрофореграма із публікації Feng et al. [2].

Тому для досліджень була обрана низка температур відпалу від 50 до 64 °C з кроком в 1 °C. Фрагмент результатів досліджень наведено на рис. 3.

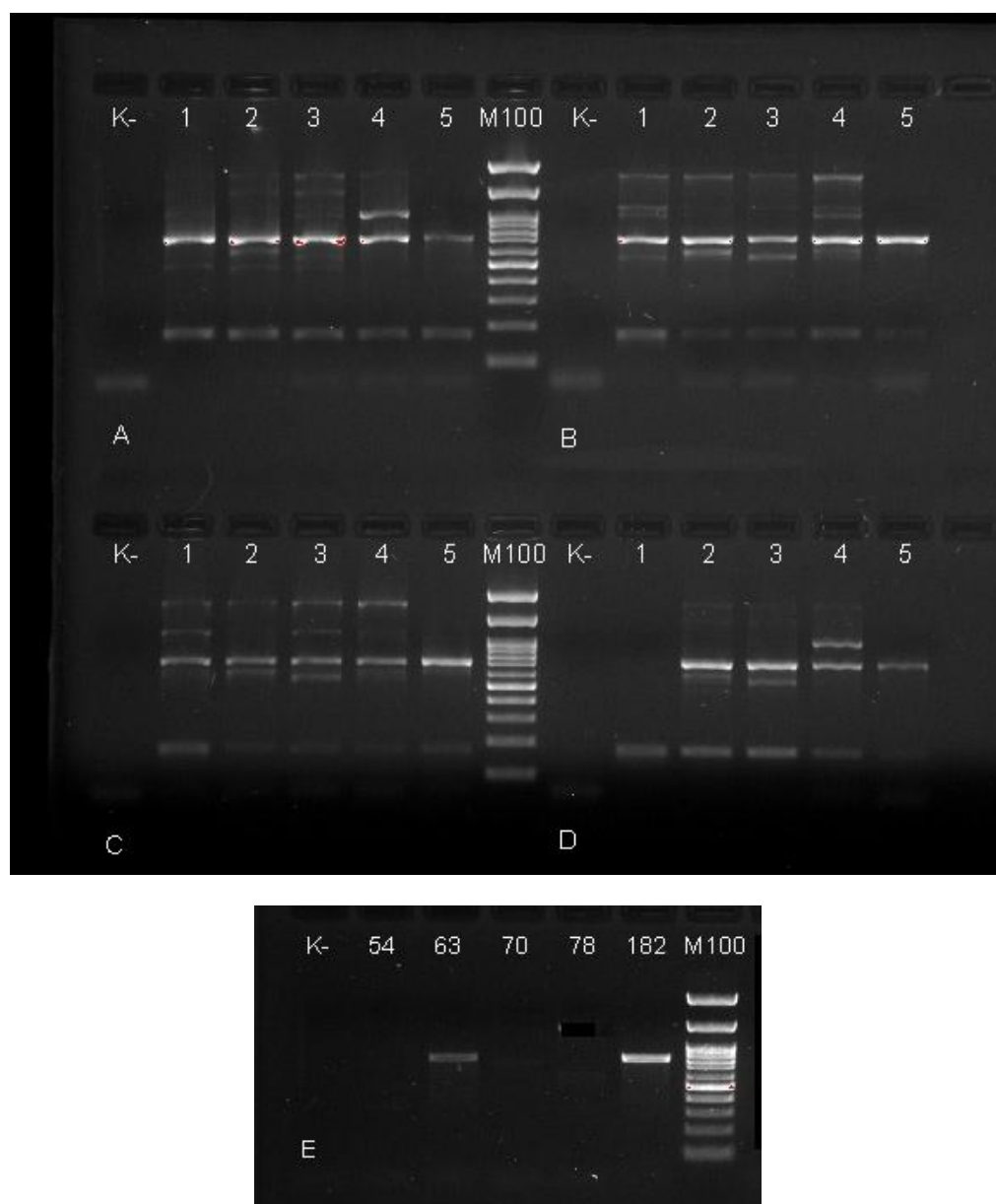


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікації *bla_{NDM}* *E. coli*. К- — негативний контроль, 1–5 — номери позитивних зразків *E. coli*, 54, 63, 70, 78 — дослідні зразки, 182 — позитивний контроль, М100 — маркер молекулярних мас. А — температура відпалу 55 °С, В — 56 °С, С — 57 °С, D — 50 °С, Е — 62 °С.

З підвищенням температури спостерігалось і підвищення специфічності реакції. Оптимальна температура відпалу встановлена на рівні 62 °С.

Також відпрацьовано кількість та тривалість циклів ампліфікації.

За результатами досліджень оптимальний режим ампліфікації наведено в табл. 1.

Таблиця 1 — Програма ампліфікації

Крок		Температура, °С	Тривалість
Ініціація ПЛР		94	5 хв
40 циклів	Денатурація	94	30 с
	Відпал	62	30 с
	Елонгація	72	30 с
	Фінальна елонгація	72	5 хв

Як видно з табл. 1, оптимальна кількість циклів складає 40, однак цей показник варіює в залежності від обладнання, яке використовується. У даному випадку — це ампліфікатор T-3000 «Biometra». За умов використання програмуемого термоциклера «Терцик» оптимальна кількість циклів була визначена на рівні 35, що показує необхідність валідації методики за умов роботи на різному обладнанні.

Для проведення реакцій застосовували комерційну суміш PCR Master Mix (Thermo Scientific™, США).

Для проведення первинної валідації використовували зразки ДНК резистентних та чутливих до антибіотиків мікроорганізмів — *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp.

Для визначення специфічності реакції ДНК дослідних мікроорганізмів виділяли із рідких та щільних поживних середовищ, шматочків органів, змивів. Також використовували зразки вірусмісних рідин — культур клітин, екстраембріональної рідини. Встановлено високу специфічність реакції — 99 %.

Для визначення межі детекції використана концентрація контрольного штаму *Klebsiella pneumoniae*, позитивного на наявність *bla_{NDM}*, — $1,5 \times 10^8$ КУО/см³. Мінімальна концентрація збудника, що дає не менше 95 % позитивних результатів, складає $1,5 \times 10^6$ КУО/см³.

За результатами випробувань метод є відтворюваним, надійним, при його проведенні відсутня перехресна контамінація. За результатами досліджень діагностична чутливість та передбачувана цінність позитивного результату знаходились на рівні 85 %; діагностична специфічність та передбачувана цінність негативного результату складали 98 %, а діагностична ефективність — 97 %.

Висновок. Таким чином, за результатами досліджень відпрацьовано основні параметри проведення полімеразної ланцюгової реакції на виявлення гена *bla_{NDM}*. Методика є достатньо чутливою та може бути використана для дослідження стійких до β-лактамних антибіотиків мікроорганізмів.

Список літератури

1. Wang X., Wang Y., Zhou Y., Li J., Yin W., Wang S., Zhang S., Shen J., Shen Z., Wang Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*. 2018. Vol. 7, No. 1. P. 1–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>.
2. Feng Y., Xue G., Feng J., Yan C., Cui J., Gan L., Zhang R., Zhao H., Xu W., Li N., Liu S., Du S., Zhang W., Yao H., Tai J., Ma L., Zhang T., Qu D., Wei Y., Yuan J. Rapid detection of new delhi metallo-β-lactamase gene using recombinase-aided amplification directly on clinical samples from children. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 691289. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.691289>.
3. Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z. NDM metallo-β-lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. Vol. 32, No. 2. P. e00115-18 DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00115-18>.
4. Sampah J., Owusu-Frimpong I., Aboagye F. T., Owusu-Ofori A. Prevalence of carbapenem-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a teaching hospital in Ghana. *Plos One*. 2023. Vol. 18, No. 10. P. e0274156. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274156>.
5. Ye L., Chan E. W. C., Chen S. Selective and suppressive effects of antibiotics on donor and recipient bacterial strains in gut microbiota determine transmission efficiency of bla_{NDM}-1-bearing plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. Vol. 74, No. 7. P. 1867–1875. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz137>.
6. Bordin A., Trembizki E., Windsor M., Wee R., Tan L. Y., Buckley C., Syrmis M., Bergh H., Cottrell K., Zowawi H. M., Sidjabat H. E., Harris P. N. A., Nimmo G. R., Paterson D. L., Whitley D. M. Evaluation of the SpeDx Carba (beta) multiplex real-time PCR assay for detection of NDM, KPC, OXA-48-like, IMP-4-like and VIM carbapenemase genes. *BMC Infectious Diseases*. 2019. Vol. 19, No. 1. P. 571. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4176-z>.
7. Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А., Скляр Н. І., Большакова Г. М., Холодна Т. В. Бета-лактамази ентеробактерій: загальна характеристика, механізми та регіональні особливості розповсюдження. *Annals of Mechnikov Institute*. 2022. No. 3. С. 7–12. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7070850>.
8. Kumarasamy K. K., Toleman M. A., Walsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010. Vol. 10, No. 9. P. 597–602. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70143-2).
9. Sawa T., Kooguchi K., Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*. 2020. Vol. 8. P. 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>.
10. Akereuke U. E., Onwuezobe I. A., Ekuma A. E., Edem E. N., Uko N. S., Okon R. S., Bawonda E. O., Ekpenyong E. N. Molecular profile of metallo-β-lactamase producing bacterial isolates from clinical samples; South-South Nigeria perspective. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2023. Vol. 85, No. 6. P. 15–25. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.06.015>.

11. Liu Z., Wang Y., Walsh T. R., Liu D., Shen Z., Zhang R., Yin W., Yao H., Li J., Shen J. Plasmid-Mediated Novel bla_{NDM}-17 Gene encoding a carbapenemase with enhanced activity in a sequence type 48 *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017. Vol. 61, No. 5. P. e02233-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02233-16>.
12. Khalid S., Ahmad N., Ali S. M., Khan A. U. Outbreak of efficiently transferred carbapenem-resistant bla_{NDM}-producing gram-negative bacilli isolated from neonatal intensive care unit of an Indian hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2020. Vol. 26, No. 3. P. 284–289. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0092>.
13. Razaq L., Uddin F., Ali S., Abbasi S. M., Sohail M., Yousif N. E., Abo-Dief H. M., El-Bahy Z. M. In vitro activity of new β -lactamase inhibitor combinations against bla_{NDM}, bla_{KPC}, and ESBL-producing enterobacteriales uropathogens. *Antibiotics*. 2023. Vol. 12, No. 10. P. 1481. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101481>.
14. Sugawara Y., Akeda Y., Hagiya H., Sakamoto N., Takeuchi D., Shanmugakani R. K., Motooka D., Nishi I., Zin K. N., Aye M. M., Myint T., Tomono K., Hamada S. Spreading patterns of NDM-producing enterobacteriaceae in clinical and environmental settings in Yangon, Myanmar. *Agents and Chemotherapy*. 2018. Vol. 63, No. 3. P. e01924-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01924-18>.
15. Liu Z., Li J., Wang X., Liu D., Ke Y., Wang Y., Shen J. Novel variant of new delhi metallo- β -lactamase, NDM-20, in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 248. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00248>.
16. Zhang R., Li J., Wang Y., Shen J., Shen Z., Wang S. Presence of NDM in non-*E. coli* Enterobacteriaceae in the poultry production environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019. Vol. 74, No. 8. P. 2209–2213. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz193>.
17. Liu B. T., Song F. J., Zou M., Zhang Q. D., Shan H. High incidence of escherichia coli strains coharboring mcr-1 and bla_{NDM} from chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017. Vol. 61, No. 3. P. e02347-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02347-16>.
18. Wang M. G., Zhang R. M., Wang L. L., Sun R. Y., Bai S. C., Han L., Fang L. X., Sun J., Liu Y. H., Liao X. P. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* from duck farms in south-east coastal China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020. Vol. 76, No. 2. P. 322–329. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa433>.
19. Wang Y., Zhang R., Li J., Wu Z., Yin W., Schwarz S., Tyrrell J. M., Zheng Y., Wang S., Shen Z., Liu Z., Liu J., Lei L., Li M., Zhang Q., Wu C., Zhang Q., Wu Y., Walsh T. R., Shen J. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nature Microbiology*. 2017. Vol. 2. P. 16260. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.260>.
20. Mr Saddam, Khan M., Jamal M., Rahman S. U., Qadeer A., Khan I., Mahmoud M. H., Batiha G. E., Shah S. H. Nutritional analysis and characterization of carbapenemase producing-Klebsiella pneumoniae resistant genes associated with bovine mastitis infected cow's milk. *Plos One*. 2023. Vol. 18, No. 10. P. e0293477. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293477>.
21. Sun S., Cai M., Wang Q., Wang S., Zhang L., Wang H. Emergency of the plasmid co-carrying bla_{KPC}-2 and bla_{NDM}-1 genes in carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2023. Vol. 36. P. 26–32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.11.008>.
22. Zornic S., Lukovic B., Petrovic I., Jencic A. Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria from blood cultures and rapid detection of beta-lactamase-encoding genes by multiplex PCR assay. *Germs*. 2022. Vol. 12, No. 4. P. 434–443. DOI: <https://doi.org/10.18683/germs.2022.1349>.

DEVELOPMENT OF TECHNICAL PARAMETERS FOR PCR TO DETECT THE bla_{NDM} ANTIBIOTIC RESISTANCE GENE IN ENTEROBACTERIALES ISOLATES AND CLINICAL SAMPLES

Yurko P. S., Didyk T. B., Zlenko O. B., Kit M. Yu.
National Scientific Center "Institute of Experimental
and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Microbial resistance to antibiotics is one of the most pressing issues of our time. Among these resistance genes, the genes for resistance to β -lactams, particularly the relatively new New Delhi metallo- β -lactamase (bla_{NDM}) gene, are of particular note. The increasing prevalence of the bla_{NDM} gene among pathogens causing hospital and poultry/livestock infections indicates the need for constant monitoring of its presence in microorganisms. This article describes the process of developing PCR parameters to detect the bla_{NDM} gene. The optimal annealing temperature was determined to be 62 °C with 40 cycles using the T 3000 "Biometra" amplifier. Preliminary validation tests showed the method had a high level of analytical sensitivity, specificity, repeatability, and reproducibility. This method will effectively detect the bla_{NDM} gene in microbial strains and clinical material

Keywords: New Delhi metallo- β -lactamase, polymerase chain reaction, primers