

УДК 615.779.90

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.А. Черкашин, В.В. Федорчук, Д.В. Иванов, С.В. Сидоренко, В.И. Тишков

(кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Изучено 49 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, проявляющих высокую фенотипическую устойчивость (МПК > 8) к меропенему или имепенему. Установлено, что в 65% штаммов присутствуют ферменты типа VIM1 и VIM2. В 2 штаммах кроме бета-лактамазы VIM1 присутствовал фермент типа IMP1.

Pseudomonas aeruginosa — один из основных возбудителей гнойно-воспалительных процессов, обладающий резистентностью к антимикробным препаратам, что делает терапию неэффективной. Очень важно на ранних стадиях заражения выявить тип антибиотикорезистентности, чтобы подобрать необходимую методику лечения и использовать наиболее эффективный антибактериальный препарат. В настоящее время для лечения заболеваний, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*, используют карбопенемы — меропенем и имепенем. Однако стали возникать штаммы, устойчивые и к этим антибактериальным препаратам. Это происходит в основном за счет появления в этих штаммах гена фермента металло-бета-лактамазы, который может быть локализован как на плазмиде, так и на хромосоме [1, 3]. Бета-лактамазы — ферменты, способные гидролизовать бета-лактамное кольцо, что позволяет патогенным микроорганизмам противостоять бета-лактамным антибиотикам.

Все известные бета-лактамазы можно разделить на четыре больших молекулярных класса — **A**, **B**, **C** и **D**. Ферменты классов **A**, **C** и **D** относятся к хорошо изученным гидролазам серинового типа [1]. Ферменты класса **B** являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся атомы цинка. Появление в микроорганизме гена металло-бета-лактамазы особенно опасно, так как ферменты этого типа способны расщеплять не только пеницилиновые и цефаллоспориновые антибиотики, но и синтетические аналоги бета-лактамов — карбопенемы. Очень часто металло-бета-лактамазы называют карбопенемазами [1, 2]. На сегодняшний день существуют четыре молекулярных типа металло-бета-лактамаз: VIM, IMP, SPM и GIM. Все они содержат по два

атома цинка и сильно различаются аминокислотными последовательностями (уровень гомологии около 70%). Кроме того, каждый из этих типов ферментов делится на несколько подтипов, которые имеют небольшие различия в нуклеотидной последовательности [3, 5].

Поиск и изучение генов, ответственных за возникновение антибиотикорезистентности, помимо теоретического имеют также огромное практическое значение. Быстрое определение антибиотикорезистентности клинических штаммов микроорганизмов очень важно при выборе оптимального лечения пациентов. Методы поиска генов и мутаций, основанные на анализе ДНК, гораздо быстрее и точнее классических методов определения резистентности [4]. Это особенно важно в случае медленно растущих или некультивируемых микроорганизмов.

Для быстрой детекции генов ферментов, отвечающих за устойчивость к различным антибиотикам, используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод позволяет с большой точностью определять природу резистентности к тому или иному антибиотику, что может значительно сократить время, необходимое для выработки правильной стратегии терапии (определение типа антибиотика и концентрации, при которых эффективность препарата будет максимальной). Методом ПЦР можно определить видовую принадлежность патогенного штамма и иногда даже предсказать его происхождение. К основным достоинствам метода ПЦР можно отнести возможность с высокой точностью определить наличие того или иного гена, а также его быстроту (3–4 ч) по сравнению с методом высевания на чашки (1,5–3 дня) [4].

В данной работе проанализированы 49 штаммов рода *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН и Государственный научный центр по антибиотикам.

*Stenotrophomonas maltophi**, проявляющих высокую фенотипическую устойчивость (МПК 8) к меропенему или имепенему. Детекцию металло-бета-лактамаз проводили с помощью ПЦР и специфических праймеров на ферменты [4].

Экспериментальная часть

Исследуемые штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Stenotrophomonas maltophi* культивировали на агаре “Columbia CNA” (США) с добавлением 5% овечьей крови в течение 24 ч при 37°C. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли методом двукратных серийных микроразведений с использованием 96 луночных планшетов в соответствии с методикой, рекомендованной NCCLS (США) [6].

Праймеры выбирали на основании анализа литературы и поиска последовательностей генов, имеющих в базе данных GeneBank [4]. Состав праймеров приведен в табл. 1.

Отдельную колонию каждого штамма ресуспендировали в 200 мкл воды, инкубировали в течение 5 мин при 95°C и центрифугировали (10 000 об/мин, 5 мин). ДНК, находящуюся в надосадочной жидкости, использовали в качестве матрицы для ПЦР. Амплификацию проводили в общем объеме 25 мкл в тонкостенных пробирках, содержащих 60 мМ Tris HCl (рН 8,5 при 25°C), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ 2 меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X 100, 100 мкМ каждого дНТФ, 1 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера. Реакции проводили в ДНК-амплификаторе Терцик (“ДНК-технология”, Россия) по следующей схеме: начальная денатурация при 95°C (2 мин), затем 30 циклов: денатурация при 95°C (1 мин), отжиг при 53°C (1 мин), элонгация при 72°C (2 мин), завершающий этап элонгации при 72°C (10 мин).

При электрофорезе продуктов ПЦР использовали ТАЕ-буфер (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, рН 8,5) в 1%-м агарозном геле при напряженности электрического поля 2–3 В/см. В агарозный гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 1,6 мкг/мл, образец ДНК смешивали с 10-кратным буфером (0,1% бромфеноловый синий, 50% глицерин, 0,1 М ЭДТА, рН 8,0) в соотношении 9:1. Визуализацию проводили на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

Результаты и их обсуждение

Предварительный отбор штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у амбулаторных пациентов с гнойно-воспалительными инфекциями, был проведен с помощью классического скрининга методом высевания на чашки с питательной средой и антибиотиком. Для выявления штаммов, содержащих металло-бета-лактамазы, использовали метод радиальной диффузии при добавлении ЭДТА в один из дисков. Штаммы, содержащие металло-бета-лактамазы, были исследованы на чувствительность к карбопенемам (меропенем, имепенем). В результате были отобраны 49 штаммов, обладающих наиболее высокой (МПК 8) антибиотикоустойчивостью.

На основании анализа литературы [4], а также известных последовательностей металло-бета-лактамаз, имеющих в базе данных GeneBank, были синтезированы пять пар праймеров на наиболее распространенные гены металло-бета-лактамаз: VIM1, VIM2, IMP1, SPM1 и GIM (табл. 1), после чего все штаммы были проанализированы с помощью ПЦР со всеми пятью парами праймеров. Результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Показано, что в 33 из 49 штаммах содержится металло-бета-лактамаза VIM1 или VIM2, причем в 26 штаммах одновременно находятся оба гена. В 2 штаммах содержится ген металло-бета-лактамазы

Таблица 1

Последовательности олигодезоксинуклеотидов, использованных в качестве праймеров для детекции металло-бета-лактамаз с помощью полимеразной цепной реакции

Тип фермента	Последовательность
VIM1 f VIM1 r	5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3' 5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3'
VIM2 f VIM2 r	5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3' 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'
IMP1 f IMP1 r	5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3' 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'
SPM1 f SPM1 r	5'-GCG TTT TGT TTG TTG CTC-3' 5'-TTG GGG ATG TGA GAC TAC-3'
GIM1 f GIM1 r	5'-AGAACCCTTGACCGAACGCAG-3' 5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3'

*Штаммы отобраны в клиниках и госпиталях Москвы, С.Петербурга, Ярославля, Иркутска, Саратова, Омска, Казани, Иркутска, Магнитогрска и Екатеринбурга.

Т а б л и ц а 2

Результаты детекции металло-бета-лактамаз с помощью полимеразной цепной реакции

Вид микроорганизма	Номер штамма	Тип праймеров					Город, учреждение	МПК, мкг/мл	
		VIM1	VIM2	IMP1	SPM1	GIM		IPM	MEM
кpn*	173	-	-	-	-	-	Омск-25	2	16
рае**	340	+	+	-	-	-	Москва-1	256	64
рma***	385	+	+	-	-	-	Москва-1	256	32
рае	16	-	-	-	-	-	Москва-2	16	8
рае	47	+	+	-	-	-	Москва-2	16	8
рае	52	+	+	-	-	-	Москва-2	128	64
рае	157	+	-	-	-	-	Москва-2	8	8
рае	166	+	+	-	-	-	Москва-2	64	32
рае	89	-	-	-	-	-	Москва-3	16	16
рае	208	+	+	-	-	-	Москва-3	64	32
рае	534	-	-	-	-	-	Москва-3	16	4
рае	118	-	-	-	-	-	Москва-5	8	16
рае	470	-	-	-	-	-	СПб.-8	2	32
рсе	259	+	-	+	-	-	Ярославль-11	128	8
рае	320	+	+	-	-	-	Иркутск-12	32	4
рma	286	-	-	-	-	-	Иркутск-14	256	128
рае	448	-	-	-	-	-	Саратов-15	16	16
рае	74	-	-	-	-	-	Томск-16	4	16
рае	85	+	-	+	-	-	Томск-16	16	16
рае	376	-	-	-	-	-	Казань-18	16	2
рае	379	-	-	-	-	-	Казань-18	8	4
рае	388	-	-	-	-	-	Казань-18	8	8
рае	389	-	-	-	-	-	Казань-18	16	8
рае	390	+	+	-	-	-	Казань-18	16	4
рае	391	-	-	-	-	-	Казань-18	32	4
рае	619	+	+	-	-	-	Омск-23	16	4
рае	637	+	+	-	-	-	Омск-24	16	8
рае	642	+	+	-	-	-	Омск-25	32	8
рае	648	+	+	-	-	-	Омск-25	256	64
рае	650	+	+	-	-	-	Омск-25	256	64
рае	653	+	+	-	-	-	Омск-25	256	32
рае	658	+	+	-	-	-	Омск-25	256	128
рае	659	+	+	-	-	-	Омск-25	256	32
рае	662	+	+	-	-	-	Омск-25	256	32
рае	680	+	+	-	-	-	Омск-25	16	8
рае	686	+	+	-	-	-	Омск-25	16	8
рае	687	+	+	-	-	-	Омск-25	256	128
рае	863	+	+	-	-	-	Омск-25	32	32
рае	876	+	+	-	-	-	Омск-25	32	32
рае	887	+	+	-	-	-	Омск-25	128	32
рае	888	+	+	-	-	-	Омск-25	32	32
рае	889	+	-	-	-	-	Омск-25	8	8
рае	687	+	+	-	-	-	Омск-25	256	128
рае	752	+	-	-	-	-	Магнитогорск-27	16	4
рае	590	-	-	-	-	-	Магнитогорск-28	16	8
рае	591	-	-	-	-	-	Магнитогорск-28	16	32
рае	602	+	-	-	-	-	Екатеринбург-29	16	8
рае	610	+	+	-	-	-	Екатеринбург-29	8	8
рае	776	+	-	-	-	-	Екатеринбург-29	16	8
unk	795	-	-	-	-	-	Москва-3	256	128

* кpn – *Klebsiella pneumoniae*; **рае – *Pseudomonas aeruginosa*; ***рma – *Stenotrophomonas maltophi*

IMP1, а также ген VIM1. Изученные штаммы можно разделить приблизительно на три группы. В первую, самую многочисленную, входят штаммы, имеющие одновременно гены VIM1 и VIM2. Вторую группу составляют штаммы, содержащие только ген VIM1. К третьей группе можно отнести 2 штамма, в которых помимо гена VIM1 содержится еще и ген IMP1 металло-бета-лактамазы.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что в европейской части Российской Федера-

ции, как и в остальных странах Западной и Восточной Европы, распространена металло-бета-лактамаза VIM. Наличие металло-бета-лактамазы IMP1 в штаммах, отобранных в Ярославле и Томске, свидетельствует об их восточноазиатском происхождении, поскольку штаммы с геном этого фермента характерны именно для этого региона [3]. Более точные характеристики найденных в исследуемых штаммах генов будут получены после секвенирования их последовательностей ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 05-05-49113(2005-2007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bush K., Yacoby G.A., Medeiros A.A. // Antimicrob. Agents Chemother. 1995. **39**. P. 1211.
2. Majiduddin F.K., Materon I.C., Palzki T.G. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. **292**. P. 127.
3. Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. // Clinical Microbiology Reviews. 2005. **18**. P. 306.
4. Shibata N., Doi Y., Yamane K., Yagi T., Kurokawa H., Kato K.S.H., Kai K., Arakawa Y. // Journal of Clinical Microbiology. 2003. **41**. P. 5407.
5. Garau G., Garcia-Sar I., Bebrone C., Anne C., Mercuri P., Galleni M., Fre're J., Dideberg O. // Antimicrob. Agents Chemother. 1994. **48**. P. 2347.
6. Antimicrobial Susceptibility Testings; Eleventh Informational Supplement. // The National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. P. 21.

Поступила в редакцию 01.12.05

AN INVESTIGATION OF METALLO- β -LACTAMASE OCCURRENCE IN RUSSIAN FEDERATION

Ye.A. Cherkashin, V.V. Fedorchuk, D.V. Ivanov, S.V. Sidorenko, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

Pseudomonas aeruginosa is one of the most significant pyoinflammatory pathogens which can cause severe suppurative complications and even lead to lethal outcome. The wide use of carbapenemes, that are «the last defence line» after penicillin and cephalosporin-based beta-lactame antibiotics, brought to the appearance of *Pseudomonas aeruginosa* stains with high resistance level to these antibiotics. The cause for carbapenem resistance formation is acquiring of metallo-beta lactamase gene by pathogene stain, which is capable for digestion of even synthetic beta-lactame antibiotics of last generation. 49 stains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Stenotrophomonas maltophi* genuses with high phenotype resistance (MIC>8) to meropenem or imepenem from hospitals and clinics of Moscow, St. Peterburg, Yaroslavl', Irkutsk, Saratov, Omsk, Kazan', Magnitogorsk, Ekaterinburg were analysed. It was shown that 33 of 49 strains contain metallo-beta lactamases type VIM1 and VIM2. Two strains also had metallo-beta lactamases type IMP1 as well as VIM1.