

На правах рукописи

Эйдельштейн Михаил Владимирович

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ β -ЛАКТАМАЗ ТЕМ- И SHV-ТИПА
У КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ**

14.00.31 - химиотерапия и антибиотики

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2000

Работа выполнена в Смоленской государственной медицинской академии

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор медицинских наук, профессор **Л. С. Страчунский**.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **С. В. Сидоренко**

доктор медицинских наук **С. С. Белокрысенко**

Ведущая организация: Российский государственный медицинский университет,
г. Москва

Защита диссертации состоится "16" ноября 2000 г. в 11 часов
на заседании диссертационного совета Д 084.68.01 в Государственном научном
центре по антибиотикам (ГНЦА) по адресу: 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 3-а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦА.

Автореферат разослан "13" октября 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

С. М. Кузнецова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема формирования и распространения устойчивости к β -лактамам антибиотикам у клинически значимых видов микроорганизмов имеет чрезвычайно важное значение, поскольку β -лактамы традиционно являются наиболее часто используемыми препаратами для лечения бактериальных инфекций. У грамотрицательных микроорганизмов и, особенно, представителей семейства *Enterobacteriaceae* основным фактором резистентности к β -лактамам антибиотикам является продукция β -лактамаз (C. Sanders, W. Sanders, 1992; D. Livermore, 1995).

Несмотря на разнообразие типов β -лактамаз, описанных у энтеробактерий, ферменты, относящиеся к генетическим группам TEM и SHV, являются доминирующими (S. Du Bois et al., 1995). Их широкое распространение среди различных видов данного семейства микроорганизмов связано с плазмидной локализацией соответствующих генов (*bla*_{TEM} и *bla*_{SHV}). Гены TEM ферментов, кроме того, входят в состав транспозонов Tn1, Tn2, Tn3 и родственных им мобильных генетических элементов, обеспечивающих возможность их перемещения между плазмидами с широким кругом хозяев (S.-T. Chen, R. Clowes, 1987). Основные представители TEM и SHV β -лактамаз: TEM-1, TEM-2 и SHV-1, в общей сложности составляющие более 90% всех плазмидных β -лактамаз, обнаруживаемых у энтеробактерий, являются наиболее частой причиной резистентности клинических штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* к полусинтетическим пенициллинам и ранним цефалоспоринам (C. Roy et al., 1985; S. Du Voi et al., 1995). Однако, наибольшую озабоченность во всем мире вызывает распространение различных TEM- и SHV-производных, которые вследствие отдельных мутаций, изменяющих их субстратную специфичность, способны вызывать устойчивость к оксимино- β -лактамам или ингибиторозащищенным пенициллинам (G. Jacoby, A. Medeiros, 1991; K. Bush, 1997; R. Vonono, L. Rice, 1999).

Частота встречаемости TEM и SHV β -лактамаз с расширенным спектром активности (ESBL) особенно высока среди госпитальных возбудителей, что связано с повышенным потреблением современных β -лактамных антибиотиков в стационарах, создающим условия селективного отбора штаммов, продуцирующих ESBL (E. Collatz et al., 1990; D. Payne, S. Amyes, 1991; L. Burman, 1992). Данные молекулярно-эпидемиологических исследований свидетельствуют о возможности

распространения ESBL как в результате циркуляции отдельных бактериальных клонов, так и конъюгативной передачи плазмид между различными штаммами и видами энтеробактерий (C. De Champs et al., 1991; G. Arlet et al., 1994; M. Yuan et al., 1998; M. Gniadkowski et al., 1998, P. Winokur et al., 2000).

Рутинная оценка чувствительности к антибиотикам, проводимая в бактериологических лабораториях, не является достаточно эффективной для обнаружения ESBL, вследствие вариабельности их фенотипического проявления (D. Livermore, 1995). Кроме того, специальные методы исследования β -лактамаз, основанные на определении их физико-химических свойств и субстратного спектра, на сегодняшний день не обладают достаточной разрешающей способностью для дифференциации многочисленных ферментов этой группы (C. Mabilat, S. Goussard, 1993; D. Payne, C. Thomson, 1998). В связи с этим, особенно перспективным представляется использование методов ДНК-диагностики, основанных на выявлении точечных мутаций в генах, кодирующих TEM и SHV ферменты. К числу таких методов относятся гибридизация с олигонуклеотидными зондами (олиготипирование) (C. Mabilat, P. Courvalin, 1990; C. Henquell et al., 1995), анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (G. Arlet et al., 1995; M. Nüesch-Inderbinen et al., 1996; A. Chanawong et al., 2000), а также одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP) (F.-H. M'Zali et al., 1996; V. Speldooren et al., 1998). Для каждого из перечисленных подходов характерны те или иные ограничения, в частности, узкий спектр детектируемых мутаций, невозможность анализа полной нуклеотидной последовательности генов, трудоемкость исследования или необходимость радиоизотопного мечения ДНК. Поэтому разработка эффективных молекулярно-генетических методов типирования β -лактамаз по-прежнему остается актуальной задачей.

Учитывая отсутствие отечественных данных о характере и распространенности ферментов, вызывающих устойчивость к современным β -лактамам антибиотикам, важным является также практическое использование методов молекулярной диагностики для исследования β -лактамаз у клинических штаммов энтеробактерий, выделенных в России.

Цель настоящей работы: разработка и оценка эффективности молекулярно-генетических методов исследования β -лактамаз TEM- и SHV-типа у клинических

штаммов энтеробактерий.

Задачи исследования:

1. Разработать на основе технологии одноцепочечного конформационного полиморфизма рестрикционных фрагментов ДНК (REF-SSCP) методы экспресс-анализа нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих β -лактамазы TEM- и SHV-типа.
2. Исследовать генетическую вариабельность TEM пенициллиназ у внебольничных уropатогенных штаммов *E. coli* и определить возможность использования REF-SSCP для выявления новых мутаций в генах *bla*_{TEM}.
3. Определить характер выявленных мутаций и изучить их влияние на спектр активности ферментов и профиль антибиотикорезистентности.
4. Применить разработанные методы REF-SSCP для типирования ESBL у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Смоленской областной клинической больнице (СОКБ).

Научная новизна

В настоящей работе впервые:

- Разработаны методы REF-SSCP анализа известных и неизвестных точечных мутаций в полной нуклеотидной последовательности генов, кодирующих β -лактамазы TEM- и SHV-типа, включая производные с расширенным спектром ферментативной активности (ESBL).
- Проведено исследование естественной генетической вариабельности TEM β -лактамаз широкого спектра у репрезентативной выборки внебольничных уropатогенных штаммов *E. coli*. Показано, что гены, кодирующие пенициллиназы TEM-типа у генетически неродственных штаммов, в целом характеризуются высокой эволюционной консервативностью, что позволяет использовать метод REF-SSCP для типирования различных производных TEM, включая ESBL и IRT.
- Обнаружен новый аллельный вариант гена, кодирующего β -лактамазу TEM-1 (*bla*_{TEM-1d}), а также, ген, кодирующий новый фермент, TEM-70, с характерной заменой Arg₂₀₄→Глн. Установлено наличие этих генов у нескольких штаммов, выделенных из географически удаленных регионов России. Изучены физико-химические и кинетические параметры TEM-70, а также, профиль антибиотикорезистентности, опосредованный этим ферментом.

- На примере исследования госпитальных штаммов *K. pneumoniae* показана возможность применения методов REF-SSCP для быстрого и эффективного типирования ESBL у штаммов с одновременной продукцией β -лактамаз TEM- и SHV-типа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. SSCP анализ рестрикционных фрагментов является высокоэффективным, быстрым и экономичным методом выявления точечных мутаций и дифференциации генов, кодирующих β -лактамазы TEM- и SHV- типа.
2. Использование данного метода представляется особенно перспективным для молекулярно-эпидемиологического типирования и выявления новых производных TEM и SHV ферментов у клинических штаммов микроорганизмов.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на 20 и 21 Международных конгрессах по химиотерапии (Сидней, 1997 г.; Бирмингем, 1999 г.), V Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство", (Москва, 1998 г.), 38 Междисциплинарной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (Сан-Диего, 1998 г.), 10 Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням (Стокгольм, 2000 г.), а также межкафедральном заседании СГМА (Смоленск, 2000 г.).

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 7 - в зарубежной печати.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 122 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 22 рисунками. Список литературы включает 223 источника, из них 6 отечественных и 217 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. При разработке методов REF-SSCP были использованы штаммы *E. coli*, продуценты известных β -лактамаз: TEM-1a, TEM-1b, TEM-2, TEM-3, TEM-4, TEM-7, TEM-9, TEM-12, TEM-26, TEM-32 (IRT-3), TEM-37 (IRT-8), TEM-39 (IRT-10), SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-6. Выбор праймеров для ПЦР-амплификации генов *bla*_{TEM} (5'-ATAAAATTCTTGAAG-

ACGAAA-3' и 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3') и *bla_{SHV}* (5'-GCCCCGGGTTATT-CTTATTTGTTCGC-3' и 5'-TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA-3') проводили с учетом консервативности участков их отжига во всех описанных в настоящее время генах в пределах каждой группы: TEM и SHV, а также возможности амплификации полной нуклеотидной последовательности, включая промоторную область и структурную часть генов. Рестрикцию продуктов ПЦР осуществляли с помощью комбинаций эндонуклеаз *Taq I* - *Pst I* и *Taq I* - *Ava II* в случае *bla_{TEM}* и *BsaOI* - *Nhe I* в случае *bla_{SHV}*. Рестрикционные фрагменты подвергали температурной денатурации и анализу в форме одноцепочечной ДНК (оцДНК) с помощью нативного электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение и окрашивание гелей серебром проводили с помощью системы PhastSystem (Pharmacia LKB, Швеция).

Для исследования генетической variability TEM пенициллиназ были использованы внебольничные уропатогенные штаммы кишечной палочки, выделенные в Москве (2 центра), Новосибирске и Смоленске. Чувствительность штаммов кишечной палочки к ампициллину, гентамицину, триметоприму, котримоксазолу, нитрофурантоину, налидиксовой кислоте, пипемидиевой кислоте, ципрофлоксацину и нитроксолину определяли методом разведения в агаре. Определение МПК и интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями и критериями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS, 1998).

Госпитальные штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра, были выделены в Смоленской областной клинической больнице. Чувствительность штаммов к амоксициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте, тикарциллину, тикарциллину/клавулановой кислоте, пиперациллину, пиперациллину/тазобактаму, цефалотину, цефокситину, цефуроксиму, цефтазидиму, цефотаксиму, цефтриаксону, цефепиму, азтреонаму и имипенему определяли с помощью E-тестов (AB Biodisk, Швеция). Скрининг ESBL-продуцирующих штаммов проводили с использованием модифицированного метода "двойных дисков" (V. Jarlier et al., 1988) и E-тестов (M. Cormican, et al., 1996).

Для получения экстрактов β -лактамаз использовали метод ультразвуковой дезинтеграции клеток. Определение изоэлектрических точек выделенных ферментов проводили с помощью изофокусирования (ИЭФ) в гелях с заданными

градиентами pH (3-9; 4-6,5; 5-8) с последующим окрашиванием хромогенным субстратом - нитроцефином (M. Matthew, et al., 1975; S. Huovinen, 1988). В качестве референтных использовали ферменты с известными изоэлектрическими точками IRT-8 (pI 5,2), TEM-1 (pI 5,4), TEM-2 (pI 5,6), TEM-3 (pI 6,3), OXA-3 (pI 7,1), SHV-1 (pI 7,6) и SHV-5 (pI 8,2).

Кинетические параметры β -лактамаз определяли спектрофотометрически, используя метод анализа полных кривых гидролиза (A. Samuni, 1975; D. Payne, 1998). Расчет значений константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V_{max}) осуществляли с помощью графика Хейнса.

Для анализа генетического родства штаммов *E. coli* использовали метод ERIC-ПЦР типирования с праймером ERIC1. При оценке клональности госпитальных штаммов *K. pneumoniae* дополнительно использовали комбинацию праймеров ERIC1R и ERIC2 (F. de Bruijn, 1992; A. Ridley, 1998).

Определение нуклеотидной последовательности генов bla_{TEM-1d} и bla_{TEM-70} было проведено в Лаборатории молекулярной биологии Российского научного центра ГосНИИгенетика. Для прямого секвенирования ПЦР-продуктов методом дидезокситерминирования были использованы амплификационные праймеры bla_{TEM} , а также внутренние праймеры (5'-ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAG-3' и 5'-TТАCTGTCATGCCATCCGTAAG-3').

Результаты и обсуждение

Разработка методов REF-SSCP для определения мутаций в генах TEM и SHV β -лактамаз. ПЦР с использованием выбранных пар праймеров позволила амплифицировать ДНК-фрагменты с ожидаемой молекулярной массой (1080 пн и 1016 пн, соответственно для bla_{TEM} и bla_{SHV}) у всех штаммов, продуцентов контрольных β -лактамаз TEM- (n=12) и SHV-типа (n=6), а также клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, наличие соответствующих ферментов у которых было предварительно установлено с помощью ИЭФ (n=97). Соответствие ПЦР-продуктов искомым последовательностям ДНК было подтверждено данными рестрикционного анализа. Неспецифическая амплификация для штаммов с другими распространенными плазмидными β -лактамазами, включая ферменты группы OXA и PSE, не была выявлена. Таким образом, чувствительность и специфичность ПЦР для детектирования bla_{TEM} и bla_{SHV} генов составили 100%.

Использование SSCP для анализа протяженных последовательностей ДНК

(>450 пн) предусматривает необходимость их предварительного деления на фрагменты, размер которых допускает возможность детектирования точечных мутаций за счет изменения конформации оцДНК (Q. Liu et al., 1995). В связи с этим, для расщепления продуктов амплификации *bla*_{TEM} генов были предложены комбинации рестриктаз *Taq* I - *Pst* I и *Taq* I - *Ava* II (Рис. 1), сайты узнавания которых, расположенные в районе нуклеотидов 342, 632, 754 и 854 (нумерация J. Sutcliffe, 1978), являются инвариантными для различных производных *bla*_{TEM}.

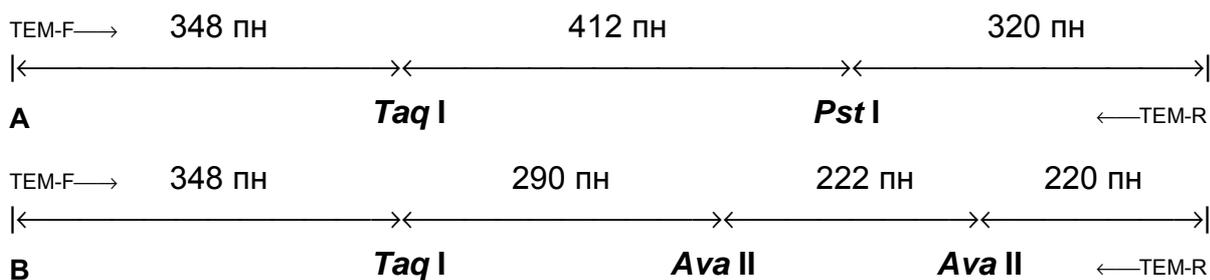


Рисунок 1. Схема расщепления ПЦР-продуктов *bla*_{TEM} генов с использованием альтернативных комбинаций рестриктаз *Taq* I - *Pst* I (А) и *Taq* I - *Ava* II (В).

SSCP анализ рестрикционных фрагментов, полученных с помощью первой комбинации рестриктаз, позволил дифференцировать гены всех контрольных TEM ферментов с широким и расширенным спектром активности (Рис. 2).

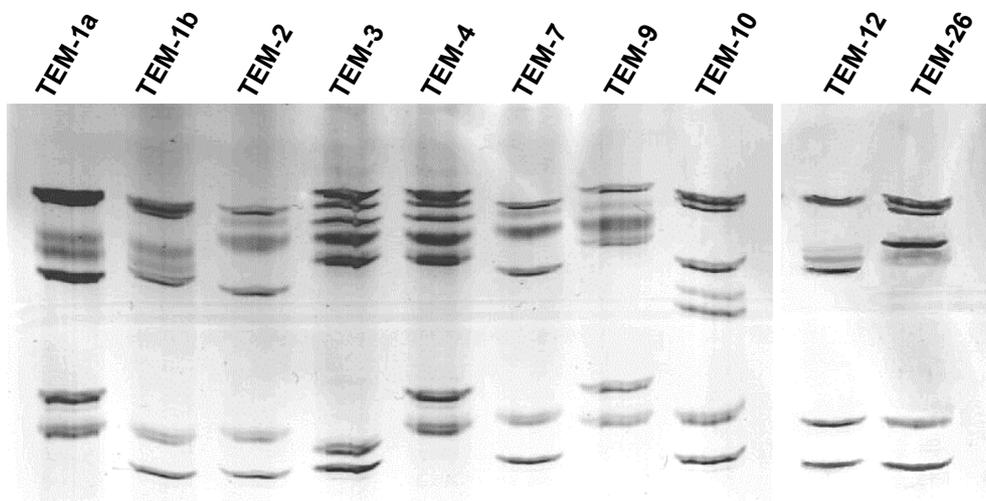


Рисунок 2. REF-SSCP анализ контрольных *bla*_{TEM} генов, кодирующих β-лактамазы широкого и расширенного спектра.

Минимальное количество фрагментов, образующихся в результате рестрикции *Taq* I - *Pst* I, облегчает интерпретацию SSCP профилей. Вместе с тем, использование комплекса *Taq* I - *Ava* II, обеспечивает более равномерное распределение известных мутаций внутри рестрикционных фрагментов меньшей протяженности, что способствует повышению чувствительности SSCP анализа (Таб. 1).

Таблица 1. Позиции нуклеотидных замен в генах контрольных TEM β-лактамаз и их распределение между рестрикционными фрагментами *Taq I-Pst I*, *Taq I-Ava II*.

<i>bla</i> _{TEM}	Мутации в нуклеотидной последовательности ^a и соответствующие им замены аминокислот ^b																								
	32	147	162	175	226	263	317	346	407	409	436	512	604	682	692	695	747	914	917	925	990	1022			
						L-P 21	Q-K 39	M-L 69	M-I 69		E-K 104			R-S 164	W-R 165	M-T 182	G-S 238	E-K 240	Y-M 265	N-D 276					
<i>bla</i> _{TEM-1a}	Ц	Т	Г	А	Ц	Ц	Ц	А	А	Г	Ц	Г	Г	Т	Ц	Т	Т	Г	Г	Г	Ц	А			
<i>bla</i> _{TEM-1b}				Г	Т						Т		Т												
<i>bla</i> _{TEM-2}	Т						А	Г			Т			Ц							А				
<i>bla</i> _{TEM-3}	Т	А					А	Г			Т	А		Ц				А			А				
<i>bla</i> _{TEM-4}	Т						Т	Г			Т	А		Ц				А			А	Т			
<i>bla</i> _{TEM-7}	Т						А	Г			Т			Ц	А						А				
<i>bla</i> _{TEM-9}	Т						Т	Г			Т	А		Ц	А						А	Т			
<i>bla</i> _{TEM-10}											Т		Т		А				А		А				
<i>bla</i> _{TEM-12}			Т					Г			Т			Ц	А						А				
<i>bla</i> _{TEM-26}						Т		Г				А	Т		А										
<i>bla</i> _{TEM-32} ^c										А							Ц								
<i>bla</i> _{TEM-37} ^c										А												Г			
<i>bla</i> _{TEM-39} ^c									Ц							Ц						Г			
<i>Taq I - Ava II</i>	348 пн							290 пн						222 пн				220 пн							
<i>Taq I - Pst I</i>	348 пн							412 пн															320 пн		

^a Нумерация нуклеотидов согласно Sutcliffe (1978). ^b Нумерация аминокислотных остатков по Ambler (1991). ^c Данные олиготипирования.

На рисунке 3 показано, что различия между генами IRT β-лактамаз и TEM-2, которые не могут быть выявлены в системе *Taq I - Pst I*, обнаруживаются при использовании комбинации рестриктаз *Taq I - Ava II*.

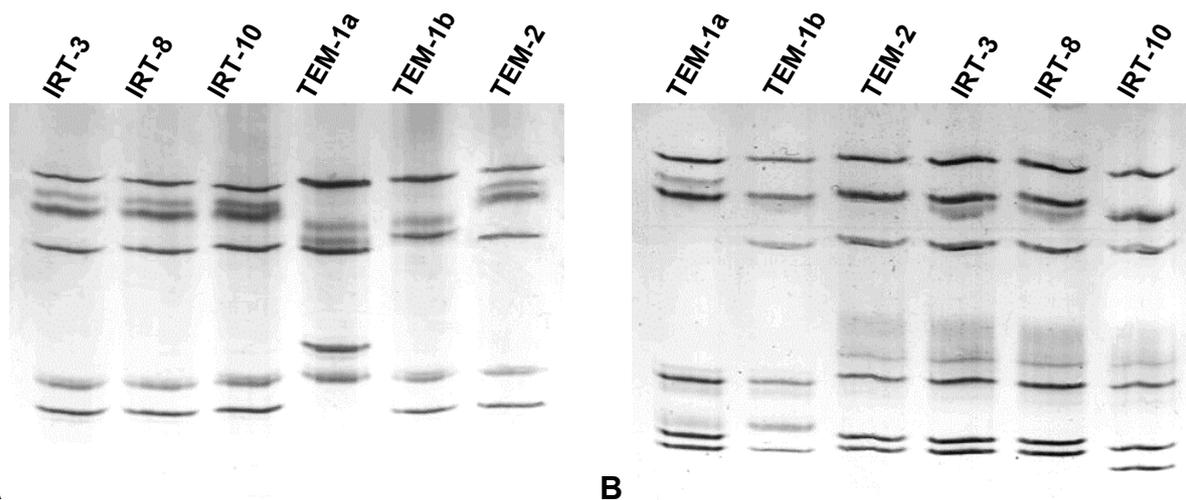


Рисунок 3. REF-SSCP анализ контрольных *bla*_{TEM} генов, кодирующих β-лактамазы широкого спектра и IRT, с использованием комбинаций рестриктаз: *Taq I - Pst I* (A) и *Taq I - Ava II* (B).

Электрофоретические профили IRT-3 и IRT-8 были идентичны при любых

условиях анализа, что говорит о невозможности выявления мутаций $T_{747} \rightarrow C$ и $A_{1022} \rightarrow G$ с помощью предложенного метода. Тем не менее, с учетом использования двух альтернативных комбинаций рестриктаз REF-SSCP анализ позволил дифференцировать 12 (92%) из 13 контрольных β -лактамаз TEM-типа.

Для выявления мутаций в генах SHV β -лактамаз была предложена комбинация эндонуклеаз *BsaO I* - *Nhe I*. Выбор *BsaO I* обусловлен оптимальным распределением мутаций, определяющих ключевые аминокислотные замены у β -лактамаз SHV-типа, внутри рестрикционных фрагментов. Три сайта рестрикции *BsaO I* присутствуют в последовательности всех известных *bla_{SHV}* генов и расположены в районе нуклеотидов 221, 415, 701 (нумерация относительно 5'-конца амплифицируемого фрагмента) (Рис. 4).

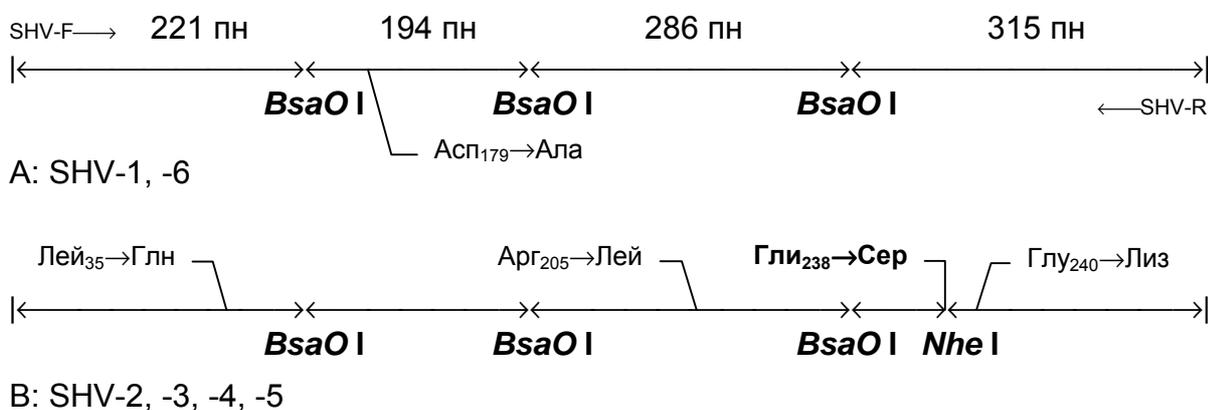


Рисунок 4. Расположение сайтов рестрикции *BsaO I* - *Nhe I* и позиции мутаций в генах SHV β -лактамаз.

Единственный сайт рестрикции *Nhe I* образуется в результате транзиции $G_{771} \rightarrow A$. Эта мутация приводит к замене аминокислотного остатка Гли₂₃₈ → Сер у большинства ESBL SHV-типа, за исключением SHV-6. Поэтому селективное расщепление *Nhe I* является дополнительным фактором, обеспечивающим дифференциацию генов SHV-1 и ESBL-производных.

В результате оптимизации условий анализа, специфические SSCP профили *BsaO I* - *Nhe I* рестрикционных фрагментов были получены для всех шести контрольных *bla_{SHV}* генов (Рис. 5). Следует отметить возможность дифференциации SHV-1 и SHV-6, поскольку альтернативные методы ДНК-типирования, включая ПЦР-ПДРФ (M. Nüesch-Inderbinnen et al., 1996; A. Chanawong et al., 2000) и ПЦР-SSCP (F.-H. M'Zali et al., 1996) не позволяют детектировать различия в генах этих ферментов.

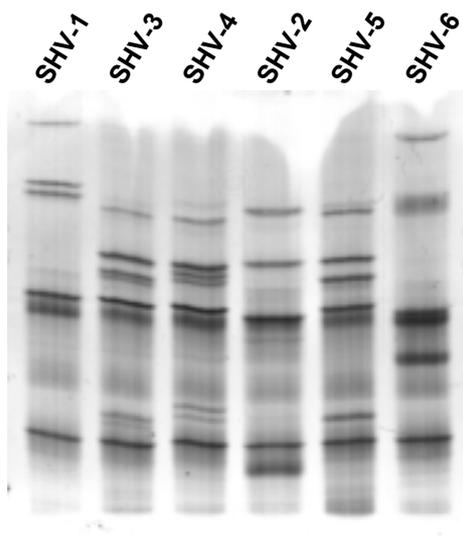


Рисунок 5. REF-SSCP анализ генов, кодирующих контрольные β -лактамазы SHV-типа.

Анализ генетической variability TEM β -лактамаз широкого спектра с помощью метода REF-SSCP. Несмотря на широкую распространенность TEM пенициллиназ систематические исследования первичной структуры генов, кодирующих эти ферменты, не проводились в течение долгого времени, что в значительной степени было связано с отсутствием методологических подходов для скрининга мутаций у клинических штаммов. С момента описания в 1987 г. различий в нуклеотидной последовательности генов *bla*_{TEM-1a} (Tn3), *bla*_{TEM-1b} (Tn2) и *bla*_{TEM-2} (Tn1) (S.-T. Chen, R. Clowes, 1987), метод секвенирования был использован в основном для анализа ESBL и IRT производных. Исключение составляет недавно описанный аллельный вариант гена, кодирующего TEM-1, - *bla*_{TEM-1c} (S. Goussard, P. Courvalin, 1999).

В настоящей работе была исследована распространенность мутаций в генах TEM пенициллиназ у внебольничных уропатогенных штаммов кишечной палочки. При первичном скрининге 270 штаммов, выделенных в 4 медицинских центрах, было выявлено 90 (33%) ампициллин резистентных культур с вероятной продукцией пенициллиназ, из них 44 штамма с различной антибиотикограммой отобраны для молекулярного типирования с помощью ERIC-ПЦП. Тридцать штаммов, обладающих различным генотипом, использованы для исследования β -лактамаз методом ИЭФ и с помощью REF-SSCP (Рис. 6).

По данным ИЭФ у 28 штаммов обнаружен фермент с изоэлектрической точкой 5,4, соответствующей TEM-1. Результаты REF-SSCP анализа подтвердили наличие TEM-1 и позволили установить идентичность соответствующих *bla*_{TEM}

генов у 25 (83,3%) штаммов, что свидетельствует о достаточно высокой эволюционной консервативности генов TEM пенициллиназ.

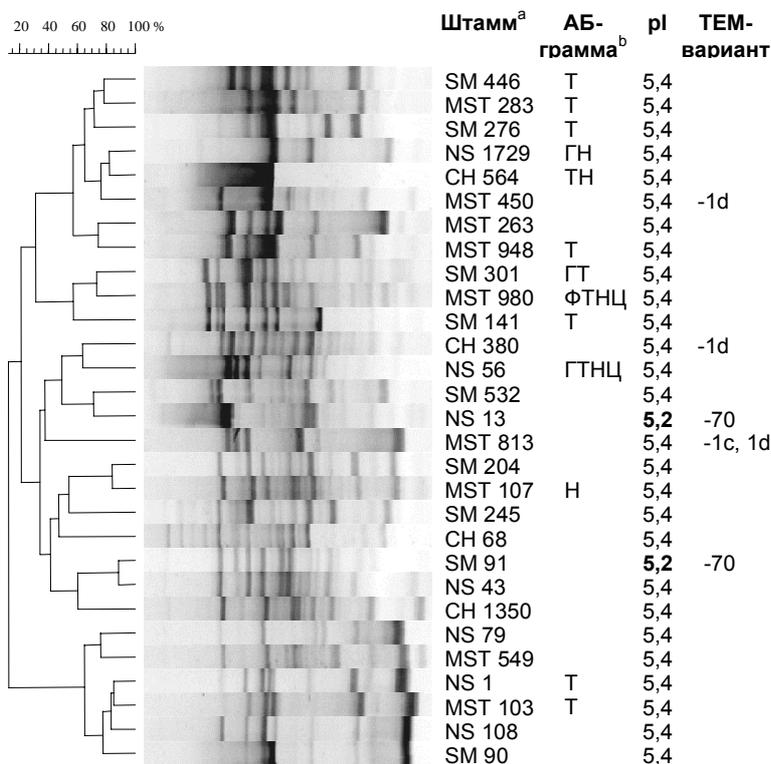


Рисунок 6. Кластерный анализ (UPGMA) электрофоретических профилей ERIC-ПЦР и характеристика штаммов *E. coli*, выбранных для исследования пенициллиназ TEM-типа.

^а CH - ЦКБ при УД президента РФ (г. Москва),
MST - ГКБ №23 (г. Москва),
NS - НОКБ (г. Новосибирск),
SM - ГКБ №1 (г. Смоленск).

^б Антибиотограмма:
Г - гентамицин,
Н - налидиксовая кислота,
Т - триметоприм/сульфаметоксазол,
Ф - нитрофурантоин,
Ц - ципрофлоксацин.

pI - изоэлектрическая точка выявленной β-лактамазы.

В то же время, у 3 штаммов выявлены уникальные SSCP профили *bla*_{TEM} генов. У 2 штаммов (MST450 и CH380) электрофоретические профили мутантных генов в большей степени соответствовали *bla*_{TEM-2}, несмотря на наличие у фермента изоэлектрической точки 5,4, характерной для TEM-1. Распределение SSCP фрагментов у штамма MST813 указывало на возможность наличия двух различных аллельных вариантов *bla*_{TEM} (Рис. 7). Кроме того, для 2 штаммов (NS13 и SM91) установлено изменение изоэлектрической точки β-лактамазы (pI 5,2).

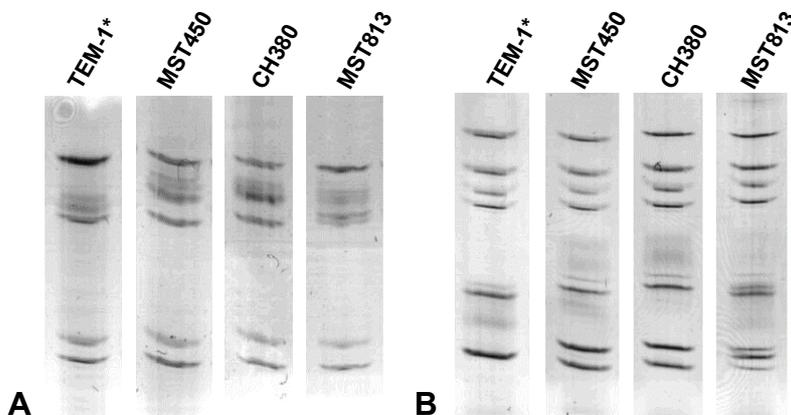


Рисунок 7. SSCP профили рестриционных фрагментов *TaqI-PstI* (A) и *TaqI-AvaII* (B) различных *bla*_{TEM} генов, выявленных у клинических штаммов *E. coli*.

* TEM-1 - стандартный профиль *bla*_{TEM-1}, обнаруженный у 25 штаммов

Характер мутаций, выявленных у клинических штаммов с помощью методов REF-SSCP и ИЭФ, был установлен путем секвенирования соответствующих *bla*_{TEM} генов. В подтверждение данных SSCP анализа, в генах TEM β-лактамаз у штаммов MST450 и CH380 обнаружены молчащие замены в позициях 346, 436, 682 и 925, характерные для *bla*_{TEM-2} (Tn1). Вместе с тем, структура 5'-концевых участков мутантных генов полностью соответствовала последовательности *bla*_{TEM-1a} (Tn3), о чем свидетельствует наличие РЗ промотора, а также совпадение нуклеотидов 175, 226 и 317, последний из которых определяет наличие глутамина в 39 позиции аминокислотной цепи TEM-1, вместо лизина у TEM-2. Таким образом, гены выявленные у штаммов MST450 и CH380, кодируют фермент, идентичный по аминокислотной последовательности TEM-1. Поскольку ранее в литературе были описаны отличающиеся по спектру молчащих мутаций гены *bla*_{TEM-1a}, *bla*_{TEM-1b} и *bla*_{TEM-1c}, обнаруженный нами аллельный вариант получил название *bla*_{TEM-1d} (Таб. 2). Интересно отметить, что по данным SSCP анализа и секвенирования два аллеля (*bla*_{TEM-1c} и *bla*_{TEM-1d}) одновременно присутствовали у штамма MST813.

Таблица 2. Различия в нуклеотидной последовательности генов ранее известных пенициллиназ TEM-типа и новых производных *bla*_{TEM-1d} и *bla*_{TEM-70}.

<i>bla</i> _{TEM}	pI	Мутации в нуклеотидной последовательности ^a и соответствующие им замены аминокислот ^b									
		32	175	226	317	346	436	604	682	813	925
					Q39→K					R204→Q	
<i>bla</i> _{TEM-1a}	5,4	Ц	А	Ц	Ц	А	Ц	Г	Т	Г	Г
<i>bla</i> _{TEM-1b}	5,4		Г	Т			Т	Т			
<i>bla</i> _{TEM-1c}	5,4						Т				
<i>bla</i> _{TEM-2}	5,6	Т			А	Г	Т		Ц		А
<i>bla</i> _{TEM-1d} ^c	5,4					Г	Т		Ц		А
<i>bla</i> _{TEM-70} ^d	5,2		Г	Т			Т	Т		А	

^a Нумерация нуклеотидов согласно Sutcliffe (1978). ^b Нумерация аминокислотных остатков по Ambler (1991). ^c GenBank No. AF188200. ^d GenBank No. AF188199.

Исходя из представленных данных, происхождение *bla*_{TEM-1d} может быть объяснено явлением рекомбинации между генами *bla*_{TEM-1a} и *bla*_{TEM-2}. Альтернативная гипотеза позволяет рассматривать найденный ген в качестве их возможного эволюционного предшественника. Вероятной представляется также взаимосвязь между *bla*_{TEM-1d} и генами многих IRT и ESBL производных, обладающих сходным спектром мутаций, например, *bla*_{TEM-30} (IRT-2), который отличается единственной заменой Ц₉₂₉→А (Арг₂₄₄→Сер) (A. Belaouaj, 1994).

Новая мутация была обнаружена у штаммов NS13 и SM91, продуцирующих пенициллиназы с изоэлектрической точкой 5,2. Гены TEM β -лактамаз у обоих штаммов были полностью идентичны и отличались от bla_{TEM-1b} транзицией $\Gamma_{813} \rightarrow A$ (Таб. 2). Эта мутация, приводящая к замене $Arg_{204} \rightarrow Gln$, ранее не была описана у β -лактамаз семейства TEM. В соответствии с требованиями международной номенклатуры, ферменту, выявленному у штаммов NS13 и SM91 присвоено последовательное название TEM-70.

Учитывая уникальный характер замены в 204 позиции TEM-70 было проведено исследование кинетических свойств этого фермента и изучено влияние мутации на уровень чувствительности штаммов кишечной палочки к различным β -лактамам антибиотикам. Сравнение значений МПК, полученных при тестировании изогенных культур *E. coli* AB1456 (F^- , *thi*, *his*, *ilv*, *metB*, *argH*, Rif^R), продуцирующих β -лактамазы TEM-1 и TEM-70, показало отсутствие значимых различий в уровнях резистентности, вызываемой этими ферментами. Значения МПК цефотаксима, цефтазидима, азтреонама, амоксициллина/клавулановой кислоты и пиперациллина/тазобактама были сходными для штаммов-продуцентов обоих ферментов. Однако в случае TEM-70 наблюдалось незначительное (ниже уровня резистентности) повышение МПК цефоперазона (2 мкг/мл) по сравнению с TEM-1 (0,5 мкг/мл).

При исследовании кинетических параметров ферментов установлено, что TEM-1 и TEM-70 незначительно отличаются по способности связывания и скорости расщепления пенициллинов и цефалотина, которые являются предпочтительными субстратами для пенициллиназ TEM-типа (Таб. 3).

Таблица 3. Кинетические параметры^a β -лактамаз TEM-1 и TEM-70.

Субстрат	TEM-1			TEM-70		
	K_m	V_{max}^b	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}^b	V_{max}/K_m
Пенициллин G	25,3±0,8	100±9,7	4,0±0,3	23,4±0,01	100±2,1	4,3±0,1
Ампициллин	41,4±0,3	126±12,6	3,1±0,3	31,1±0,2	111±6,7	3,6±0,2
Тикарциллин	8,7±0,04	7,7±0,2	0,88±0,02	7,8±0,5	9,1±0,6	1,17±0,01
Цефалотин	284±13,1	9,3±0,1	0,033±0,002	291±14,5	11,8±0,7	0,041±0,004
Цефоперазон	205±11,4	20,1±0,2	0,1±0,01	143±9,8	23,1±1,9	0,161±0,01

^a Значения указаны как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

^b Относительные значения. V_{max} рассчитана в процентах от скорости гидролиза пенициллина G.

Следует однако отметить, что каталитическая активность (V_{max}/K_m) TEM-70 в отношении цефоперазона более чем в полтора раза превышает

соответствующий показатель TEM-1, главным образом за счет снижения K_m . Большая аффинность цефоперазона к TEM-70 вероятно объясняет повышение МПК этого препарата у штамма AB1456 (TEM-70) по сравнению с AB1456 (TEM-1).

Анализ третичной структуры TEM-1 показывает, что остаток Arg_{204} находится на внешней поверхности белка, в непосредственной близости от N-концевого фрагмента α -спирали H9, и на значительном удалении ($\approx 2,2$ нм) от

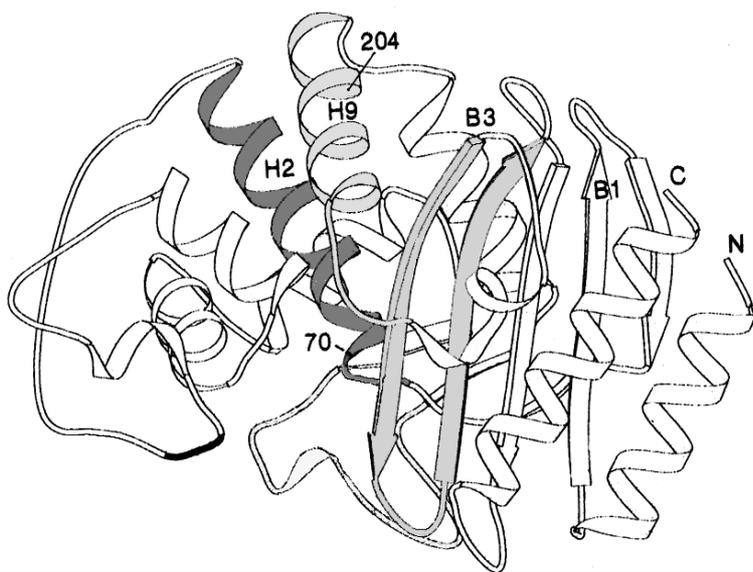


Рисунок 8. Третичная структура TEM ферментов с указанием позиций Arg_{204} и Ser_{70} .

активного центра фермента (Рис. 8).

Среди структурно родственных β -лактамаз SHV-типа замена положительно заряженного аргинина на лейцин наблюдается в соседней, 205-й, позиции SHV-3 и SHV-4. Эта мутация, так же как и в случае TEM-70 ($\text{Arg}_{204} \rightarrow \text{Глн}$), приводит к снижению изоэлектрических точек ферментов.

Удаленность этих мутаций от активного центра не позволяет им оказывать значительного воздействия на активность в отношении большинства β -лактамов. Однако, согласно предположению J. Кнох (1995), замещение положительного остатка аргинина в основании H9- α -спирали может приводить к смещению ее C-терминального участка, содержащего аминокислотные остатки -216-218- (-Вал-Ала-Гли-), которые формируют верхний край центра связывания, что, в свою очередь, может облегчать взаимодействие с цефалоспоринами, содержащими объемные радикалы в положении C-3. Полученные нами данные о большей аффинности цефоперазона по отношению к TEM-70, по сравнению с TEM-1, подтверждают это предположение.

Результаты исследования чувствительности и анализа ферментативной кинетики позволяют заключить, что мутация, выявленная в аминокислотной последовательности TEM-70, проявляется главным образом в изменении аффинности отдельных β -лактамов и в остальном носит нейтральный характер. В соответствии с функциональной классификацией β -лактамаз, предложенной

K. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros (1995), TEM-70 может быть отнесена к группе 2b - пенициллиназ широкого спектра.

Типирование ESBL у госпитальных штаммов *K. pneumoniae* с помощью REF-SSCP. Высокая частота резистентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae* к цефалоспорином III-IV поколения, обусловленная продукцией β -лактамаз расширенного спектра, является характерной для многих стационаров в России (Р. С. Козлов, 1998; С. В. Сидоренко, 2000). В Смоленской областной клинической больнице (СОКБ), по данным регулярно проводимых исследований, частота выявления ESBL у клебсиелл составила в 1994 г. - 17%, в 1995-96 гг. - 63%, в 1997-98 гг. - 47% и в 1999 г. - 70% (Г. К. Решедько и др., 1999).

В настоящей работе исследовано 12 ESBL-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* выделенных у пациентов с различным инфекционными осложнениями, находившихся на стационарном лечении в реанимационном, ожоговом, хирургическом и урологическом отделениях СОКБ, в период с 1994 по 1997 гг. Одиннадцать из этих штаммов обладали сходным спектром резистентности к антибиотикам, включающим пенициллины, цефалоспорины I-II поколения, ингибиторозащищенные β -лактамы, гентамицин, тобрамицин и тетрациклин. Один штамм был чувствителен к аминогликозидам. Все клебсиеллы проявляли также повышенную устойчивость к цефалоспорином III-IV поколения и азтреонаму, однако значения МПК этих антибиотиков варьировали в широком диапазоне (1-128 мкг/мл).

Несмотря на наблюдаемые различия в уровнях устойчивости к оксимино- β -лактамам, молекулярно-генетическое типирование с использованием ERIC-ПЦР позволило установить наличие клонального родства между всеми исследованными штаммами (Рис. 9).

С помощью изоэлектрического фокусирования у всех клебсиелл был выявлен сходный профиль β -лактамаз (pI 5,4; 7,6). Согласно литературным данным, такой профиль ИЭФ является характерным для многих госпитальных штаммов *K. pneumoniae* и чаще всего соответствует продукции пенициллиназы TEM-1 (pI 5,4) и β -лактамазы расширенного спектра SHV-2 (pI 7,6), однако окончательная идентификация ферментов на основании выявленных изоэлектрических точек представляется затруднительной, поскольку pI 5,4 может также принадлежать одному из ESBL-производных TEM, например, TEM-7, -19,

-20, -29; a pl 7,6 - SHV-1, -6, -7, -8 (P. Winokur et al., 2000).

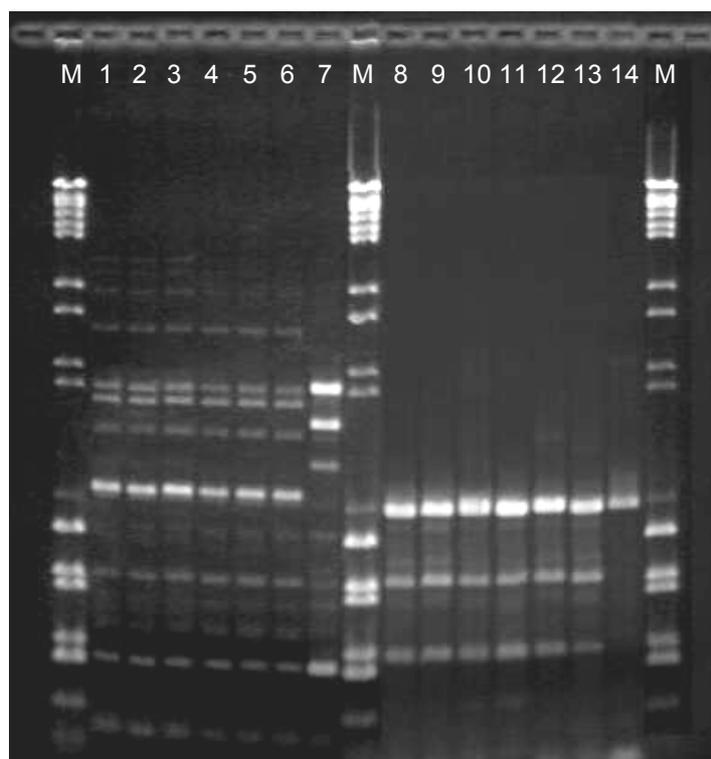


Рисунок 9. Типирование ESBL-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в СОКБ с помощью ERIC-ПЦР.

M - маркер молекулярной массы (pUC18-*Hae* III + λ -*Bst* EI);

1-7 - амплификация с праймером ERIC1; 8-14 - амплификация с праймерами ERIC1R и ERIC2

- 1, 8 - *K. pneumoniae* 39/95;
- 2, 9 - *K. pneumoniae* 41/95;
- 3, 10 - *K. pneumoniae* 85/95;
- 4, 11 - *K. pneumoniae* 97/95;
- 5, 12 - *K. pneumoniae* 98/96;
- 6, 13 - *K. pneumoniae* 101/96;
- 7, 14 - контрольный эпидемиологически не связанный штамм *K. pneumoniae* KS97.

В качестве альтернативы методу изофокусирования для идентификации β -лактамаз у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в СОКБ, был использован SSCP анализ рестрикционных фрагментов *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV} генов.

Электрофоретические профили генов *bla*_{TEM}, кодирующих фермент с изоэлектрической точкой 5,4, были полностью идентичны у всех клебсиелл и соответствовали референтному профилю *bla*_{TEM-1} (Рис. 10А).

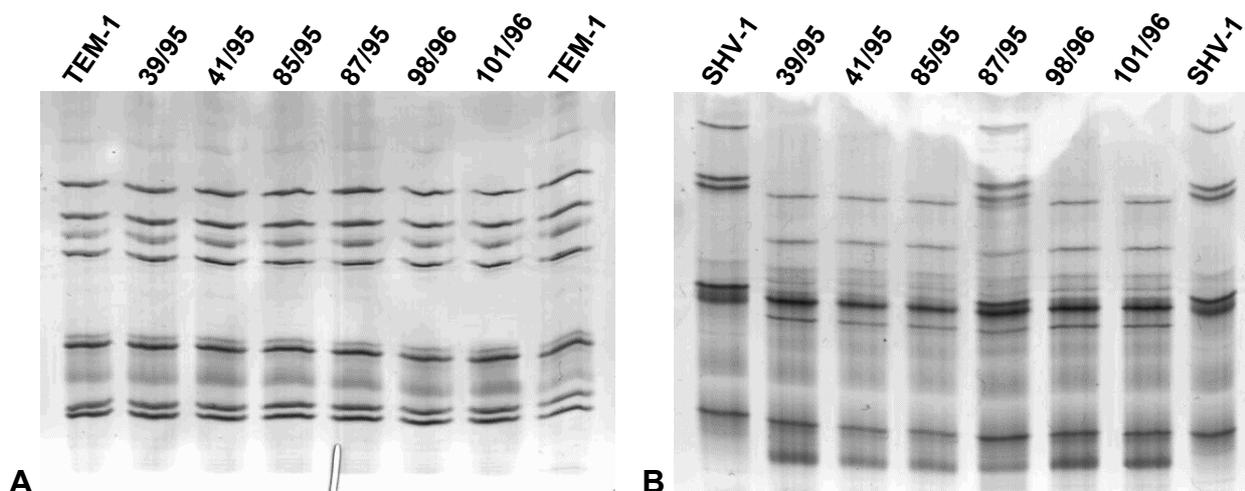


Рисунок 10. REF-SSCP анализ *bla*_{TEM} (А) и *bla*_{SHV} генов (В) у штаммов *K. pneumoniae* из СОКБ.

TEM-1 и SHV-1 - стандартные профили контрольных генов *bla*_{TEM-1} и *bla*_{SHV-1}

Анализ генов SHV β -лактамаз позволил выявить у 11 штаммов SSCP профиль, соответствующий продукции SHV-2, одной из наиболее распространенных ESBL. Электрофоретический профиль штамма 87/95 свидетельствовал о наличии двух ферментов с одинаковой изоэлектрической точкой (pI 7,6) и различным спектром активности: SHV-1 и SHV-2 (Рис. 10В). Возможность одновременного выявления и дифференциации этих ферментов с помощью метода REF-SSCP является особенно важной, поскольку для многих штаммов *K. pneumoniae* характерно наличие хромосомно-кодируемой β -лактамазы SHV-1, которая затрудняет идентификацию ESBL SHV-типа.

Таким образом, дифференцирующая способность REF-SSCP применительно к исследованию госпитальных штаммов с широко распространенным профилем β -лактамаз была выше по сравнению с традиционно используемым методом изофокусирования.

ВЫВОДЫ

1. На основе технологии одноцепочечного конформационного полиморфизма рестрикционных фрагментов ДНК (REF-SSCP) разработаны методы экспресс-анализа и дифференциации генов, кодирующих плазмидные β -лактамазы TEM- и SHV-типа, включая ферменты с широким (BSBL) и расширенным спектром ферментативной активности (ESBL), а также ингибиторорезистентные производные TEM (IRT).
2. Разработанные методы использованы для анализа генетической variability TEM пенициллиназ у внебольничных уropатогенных штаммов *E. coli*, а также для типирования ESBL у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*.
3. Гены TEM β -лактамаз широкого спектра в целом отличаются достаточно высокой эволюционной консервативностью у различных штаммов кишечной палочки. Вместе с тем, идентификация новых генов *bla*_{TEM-1d} и *bla*_{TEM-70} свидетельствует о большем, чем ранее предполагалось, разнообразии нуклеотидных последовательностей, кодирующих пенициллиназы TEM-типа.
4. *bla*_{TEM-1d} представляет собой новый аллельный вариант гена, кодирующего пенициллиназу TEM-1, в котором промотор (P3) и 5'-концевой участок структурной последовательности гена *bla*_{TEM-1a} (Tn3) объединены с протяженным 3'-концевым фрагментом гена *bla*_{TEM-2} (Tn1).

5. Новый фермент, TEM-70, выявленный у двух штаммов *E. coli* из Смоленска и Новосибирска, отличается уникальной для β -лактамаз семейства TEM аминокислотной заменой Arg₂₀₄→Глн, которая обуславливает снижение его изоэлектрической точки (pI 5,2) и незначительное повышение аффинности цефоперазона (K_m 143) по сравнению с TEM-1 (pI 5,4; K_m 205).
6. Исследование ESBL-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Смоленской областной клинической больнице, доказывает эффективность использования разработанных методов REF-SSCP для молекулярно-эпидемиологического типирования β -лактамаз TEM- и SHV-типа.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая низкую эффективность выявления резистентности, вызванной продукцией ESBL, с помощью рутинных методов определения чувствительности, а также широкое распространение штаммов энтеробактерий, обладающих данным механизмом устойчивости, необходимо внедрение в практику работы клинических бактериологических лабораторий специальных фенотипических методов выявления ESBL, в частности, метода двойных дисков.
2. Использование таких методов представляется целесообразным для всех госпитальных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, как наиболее частых продуцентов ESBL, а также для других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, которые по данным предварительного тестирования проявляют пониженную чувствительность (МПК ≥ 1 мкг/мл) к одному из цефалоспоринов III поколения.
3. Предложенные в настоящей работе методы REF-SSCP анализа генов TEM и SHV β -лактамаз могут быть рекомендованы для использования в референтных лабораториях, проводящих исследования механизмов устойчивости энтеробактерий к β -лактамным антибиотикам.
4. REF-SSCP анализ может быть использован как самостоятельный подход для изучения эпидемиологии плазмидных β -лактамаз и выявления новых ферментов, а в комбинации с другими методами (ИЭФ, олиготипирование) - для точной идентификации TEM- и SHV- производных.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Stratchounski L. S., Edelstein M. V., Kozlov R. S. Interpretation of results of ESBL detection using E-tests needs in consensus // 20th International Congress of Chemotherapy. - Sydney, - 1997. - P. 130.
2. Edelstein M. V., Stratchounski L. S. Development of single-strand conformational polymorphism (SSCP) PCR Method for discriminatory detection of genes coding for TEM-family β -lactamases // 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - San Diego, - 1998. - P. 197.
3. Stratchounski L. S., Edelstein M. V., Stetsiouk O. U., Rechedko G. K. Evaluation of *in vitro* activities of cefepime and other β -lactams against nosocomial *Enterobacteriaceae* with respect to their β -lactamase patterns in 8 Russian hospitals // 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - San Diego, - 1998. - P. 196.
4. Stratchounski L., Edelstein M., Edelstein I., Suvorov M. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant uropathogenic *E.coli* strains // 21st International Congress of Chemotherapy. - Birmingham, - 1999. - P. 202.
5. Winokur P. L., Edelstein M. V., Stetsiouk O., Stratchounski L., Blahova J., Reshedko G. K., Croco M. A. T., Hollis R. J., Pfaller M. A., Jones R. N. Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -lactamases // Clin. Microbiol. Infect. - 2000. - V. 6. - P 103-108.
6. Edelstein M., Edelstein I., Suvorov M., Kozlov R. Identification of the naturally occurring variant genes *bla*_{TEM-1d} and *bla*_{TEM-70} encoding broad-spectrum TEM-type β -lactamases // 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - Stockholm, -2000. - P. 211-212.
7. Edelstein M., Edelstein I., Suvorov M., Kozlov R. Differentiation of SHV-type β -lactamases by REF-SSCP analysis of entire *bla*_{SHV} gene sequence // 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - Stockholm, - 2000. - P. 171.
8. Лопухов Л. В, Эйдельштейн М. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. - 2000. - № 1. - Т. 3. В печати.