

На правах рукописи

СТЕПАНОВА МАРИНА НИКОЛАЕВНА

**МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СТХ-М β -ЛАКТАМАЗ И
ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЦЕФТАЗИДИМУ У
КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI***

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена в лаборатории антибиотикорезистентности НИИ Антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ.

Научный руководитель: Кандидат биологических наук
Эйдельштейн Михаил Владимирович

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Чернов Владислав Моисеевич

Доктор медицинских наук, профессор
Сидоренко Сергей Владимирович

Ведущая организация: Самарский государственный медицинский
Университет

Защита диссертации состоится «28» апреля 2011 г. В 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

Факс: (843) 238-76-01; e-mail: attestat.otdel@ksu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского федерального университета

Автореферат разослан «___» марта 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

Актуальность проблемы. Продукция β -лактамаз является основной причиной резистентности к β -лактамным антибиотикам у грамотрицательных бактерий. Плазмидно-кодируемые β -лактамазы молекулярного класса A, обладающие активностью в отношении цефалоспоринов III-IV поколения и известные, как β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), представляют собой одну из наиболее значимых групп β -лактамаз. Эти ферменты являются основными детерминантами устойчивости к цефалоспорином и монобактамам у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. В настоящее время, в России и ряде других стран Европы, Азии и Южной Америки, СТХ-М β -лактамазы являются доминирующей группой БЛРС (Canton, 2006).

Частота встречаемости СТХ-М β -лактамаз особенно высока среди госпитальных возбудителей, что связано с повышенным потреблением современных β -лактамных антибиотиков в стационарах. В отдельных лечебных учреждениях России, частота распространенности этих ферментов достигает 80-100%. В 2006-07 гг. суммарная доля СТХ-М БЛРС среди нозокомиальных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* в различных стационарах России достигла 69,9% (Sukhorukova and et al., 2010). Стремительное распространение генов СТХ-М β -лактамаз связывают в основном с активностью мобильных генетических элементов (*ISEcp1*), которые обеспечивают их перенос на различные плазмиды энтеробактерий.

В отличие от БЛРС TEM- и SHV-типа, большинство СТХ-М проявляют значительно более высокую активность в отношении цефотаксима и цефтриаксона по сравнению с цефтазидимом. В связи с этим преимущественная устойчивость штаммов к цефотаксиму по сравнению с цефтазидимом часто рассматривается как основной диагностический признак продукции СТХ-М ферментов. Кроме того, штаммы, продуцирующие СТХ-М β -лактамазы, часто ошибочно оцениваются как чувствительные к цефтазидиму *in vitro*, что приводит к необоснованному назначению цефтазидима и клинической неэффективности терапии инфекций, вызванных продуцентами СТХ-М БЛРС.

Вместе с тем, в последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что продуценты СТХ-М β -лактамаз могут проявлять высокую устойчивость к цефтазидиму. Изменение резистентности к цефтазидиму может быть связано, как с гиперпродукцией или мутациями самих СТХ-М ферментов, так и с наличием дополнительных факторов резистентности, например, пониженной проницаемости наружной клеточной мембраны. Более того, для отдельных СТХ-М ферментов была показана преимущественная активность в отношении цефтазидима, связанная с мутационной изменчивостью генов, кодирующих СТХ-М β -лактамазы. В связи

с этим, изучение закономерностей эволюции СТХ-М β -лактамаз и роли отдельных аминокислотных позиций в изменении спектра активности этих ферментов имеет большое научное и клиническое значение.

Целью работы явилось установление механизмов формирования резистентности бактерий к цефтазидиму, связанных с мутационной изменчивостью СТХ-М β -лактамаз.

Основные **задачи** исследования:

1. Охарактеризовать новые мутантные варианты СТХ-М β -лактамаз расширенного спектра, определяющие высокий уровень устойчивости к цефтазидиму у клинических штаммов *Escherichia coli*.
2. Определить роль АК в области Ω -петли СТХ-М-3 в изменении спектра ферментативной активности и формировании резистентности к цефотаксиму и цефтазидиму у штаммов-продуцентов.
3. Выявить с использованием методов молекулярно-генетического типирования источники происхождения цефтазидим-гидролизующих СТХ-М β -лактамаз у клинических изолятов.
4. Определить локализацию генов цефтазидим-гидролизующих СТХ-М β -лактамаз, их связь с мобильными генетическими элементами и возможные механизмы распространения среди нозокомиальных штаммов энтеробактерий.
5. Исследовать мутационную изменчивость СТХ-М β -лактамаз в экспериментах по *in vitro* селекции резистентности к цефтазидиму у гипермутабельных штаммов *E. coli*.
6. Установить взаимосвязь между копийностью генов различных СТХ-М β -лактамаз и уровнями устойчивости штаммов-продуцентов к различным β -лактамам.

Научная новизна. Основной научный приоритет работы заключается в исследовании мутационной изменчивости СТХ-М β -лактамаз и роли отдельных аминокислотных позиций в изменении спектра активности данных ферментов. В ходе настоящей работы выявлена, охарактеризована и зарегистрирована в международной классификации новая β -лактамаза расширенного спектра, СТХ-М-42; установлена ключевая роль аминокислотных позиций 167 и 136 в области омега-петли в формировании субстратной специфичности СТХ-М ферментов в отношении цефотаксима и цефтазидима; доказана эволюция СТХ-М-3 и появление СТХ-М-42 у клинических штаммов *E. coli*, обладающих повышенной частотой мутирования *in vivo*; показана возможность селекции мутаций устойчивости к цефтазидиму в генах СТХ-М β -лактамаз у

гипермутабельных штаммов клинических и лабораторных штаммов *E. coli in vitro*; установлены механизмы распространения новой цефтазидим-гидролизующей СТХ-М β-лактамазы; впервые установлено наличие точной взаимосвязи между количеством копий гена СТХ-М β-лактамаз и уровнями резистентности штаммов продуцентов к различным оксимино-β-лактамам.

Практическая значимость результатов. Нуклеотидная последовательность гена *bla*_{СТХ-М-42} и прилежащего участка *ISEcp1* депонирована в GenBank под номером DQ061159 и может быть использована для сравнительного анализа генов. Результаты проведенных нами исследований по *in vitro* селекции цефтазидим-резистентности у гипермутабельных штаммов *E. coli* и по изучению взаимосвязи между количеством копий гена СТХ-М β-лактамаз и уровнями резистентности штаммов продуцентов к различным оксимино-β-лактамам свидетельствуют о наличии у штаммов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра СТХ-М-типа, широких возможностей формирования резистентности к различным оксимино-β-лактамам, связанных как с изменением субстратной специфичности, так и уровня продукции данных ферментов. Полученные данные свидетельствуют о том, что для выявления продукции БЛРС у клинических штаммов энтеробактерий в практике диагностических микробиологических лабораторий недостаточно оценки уровней МПК цефалоспоринов III-IV поколений, и, следовательно, о необходимости использования с этой целью специальных тестов (фенотипических или молекулярных).

Связь работы с научными программами. Работа выполнялась в соответствии с планом НИР ГОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ (№ гос. регистрации ВНИИЦ 01200608913).

Положения, выносимые на защиту:

1. Появление β-лактамазы СТХ-М-42, вызывающей преимущественную устойчивость к цефтазидиму, связано с мутационной изменчивостью СТХ-М-3 у клинических штаммов *E. coli*.
2. Аминокислотные замены в позиции 167 (Pro→Ser/Thr), выявленные у клинических штаммов и в экспериментах по *in vitro* мутагенезу, играют основную роль в формировании “цефтазидимазной” активности СТХ-М ферментов.

3. Высокий уровень устойчивости штаммов-продуцентов СТХ-М β -лактамаз к цефтазидиму может быть связан как с наличием специфических аминокислотных замен в структуре СТХ-М, так и изменением копийности *bla*_{СТХ-М} генов.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на 14-ом Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Прага, 2004 г.), 45-ой Междисциплинарной конференции по антимикробным препаратам и химиотерапии (Вашингтон, 2005 г.), 34-ой конференции молодых ученых (Смоленск, 2006 г.), 16-ом Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Ницца, 2006 г.), 17-ом Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Мюнхен, 2007 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 8 рисунков. Библиография содержит 211 наименований, в т.ч. 208 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические штаммы микроорганизмов. В исследование были включены СТХ-М-продуцирующие изоляты *E. coli* (n=21), выделенные у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии Областной детской клинической больницы города Иркутска в 2002-2003 гг.

Определение чувствительности клинических изолятов к антибиотикам проводили в соответствии с Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04, 2004) и рекомендациями Комитета по клиническим и лабораторным стандартам / Института по клиническим и лабораторным стандартам США (NCCLS/CLSI, 2004 г.).

Фенотипическое обнаружение БЛРС. Для определения продукции БЛРС использовали фенотипические тесты, основанные на эффекте подавления активности БЛРС в отношении оксимино- β -лактамов в присутствии

клавулановой кислоты: метод «двойных дисков», а также определение соотношения МПК цефалоспоринов и их комбинаций с клавулановой кислотой (МУК 4.2.1890-04, 2004).

Выделение бактериальной ДНК для последующей амплификации проводили с помощью набора реактивов InstaGene Matrix (Bio-Rad, США) согласно рекомендациям производителя.

ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование генов β -лактамаз. Для первичной детекции генов, кодирующих β -лактамазы СТХ-М-типа, использовали ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I и праймерами, комплементарными внутренним участкам *bla*_{СТХ-М} генов: СТХ-М-Fext, СТХ-М-R1c и СТХ-М(1-2)-Rnest (Таб. 1). Принадлежность СТХ-М β -лактамаз к одному из 4 известных генетических кластеров (СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8/-25, СТХ-М-9) определяли на основании анализа температуры плавления (T_m) ПЦР-продуктов.

Для амплификации полной нуклеотидной последовательности генов группы *bla*_{СТХ-М-1}, включая промоторную область и открытую рамку считывания, использовали праймеры ISEcp1, СТХ-М-R-stop (Таб. 1).

Гены *bla*_{СТХ-М}, полученные в результате прямой амплификации с праймерами ISEcp1 и СТХ-М-R-stop от клинических изолятов *E. coli* Irk2320 и Irk1224, клонировали в вектор pCC1 (Epicentre, США), в котором отсутствуют гены других β -лактамаз. Клонирование ПЦР продуктов по осуществляли с использованием коммерческих наборов CopyControl PCR Cloning Kit (Epicentre, США) в соответствии с инструкциями производителя. Компетентные клетки *E. coli* EPI 300 (Epicentre, США) получали с помощью метода, описанного в работе (H. Inoue and et al., 1990).

Определение полной нуклеотидной последовательности генов *bla*_{СТХ-М} и их промоторной области проводили модифицированным методом Сенгера с использованием прибора ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). В качестве матрицы для проведения реакций секвенирования использовали ПЦР-продукты, полученные с помощью праймеров ISEcp1 и СТХ-М-R-stop непосредственно от клинических изолятов *E. coli* Irk2320 и Irk1224 и рекомбинантные плазмиды, выделенные от трансформантов с помощью коммерческих наборов Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Реакции секвенирования проводили с использованием внутренних праймеров к генам *bla*_{СТХ-М} и праймеров M13F(-20), M13R(-27) (Таб. 1), а также наборов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), содержащих флуоресцентно-меченые ддНТФ терминаторы.

Таблица 1.

Олигонуклеотидные праймеры¹, использованные в работе.

| Название | Последовательность, 5'-3' | Мишень | Назначение |
|------------------|---------------------------|--|--|
| CTX-M-Fext | TTTGCGATGTGCAGCACCAGTAA | Внутренние участки | Выявление и дифференциация |
| CTX-M-R1c | CCGCTGCCGGTCTTATC | <i>bla</i> _{CTX-M} | <i>bla</i> _{CTX-M} генов различных генетических групп |
| CTX-M(1-2)-RNest | TGATCTCAACGCGCTGATTTA | | |
| CTX-M-R-stop | TGTCTGGTATAATAAGAATATCATC | 5' конец <i>bla</i> _{CTX-M} | ПЦР-амплификация |
| ISEcp1 | TGTCTGGTATAATAAGAATATCATC | 5' конец <i>ISEcp1</i> | <i>bla</i> _{CTX-M} и промотора |
| CTX-M-R1 | CACCGCTGCCGGTTTTATC | Внутренний участок <i>bla</i> _{CTX-M} | Определение ориентации и нуклеотидной последовательности <i>bla</i> _{CTX-M} в векторе |
| M13F(-20): | GTAAAACGACGGCCAGTG | вектор pCC1 | |
| M13R(-27): | GGAAACAGCTATGACCATG | вектор pCC1 | |
| ERIC1 | GTGAATCCCCAGGAGCTTACAT | - | ПЦР-типирование изолятов <i>E. coli</i> с произвольными праймерами |
| AP7 | GTGGATGCGA | - | |
| OPA4 | AATCGGGCTG | - | |
| M13 | GAGGGTGGCGGTTCT | - | |

¹ Синтез олигонуклеотидов осуществлен ЗАО «Синтол» (Россия).

Перенос детерминант резистентности с помощью конъюгации.

Перенос CTX-M-кодирующих природных плазмид от донорных штаммов *E. coli* Irk1224, Irk2320 и Irk2322 в реципиентный штамм *E. coli* AB1456 (F⁻, Rif^R) проводили с помощью конъюгации в жидкой среде (бульон Мюллера-Хинтон), используя начальное соотношение суточных культур донора и реципиента 1:2. Эффективность конъюгации рассчитывали как отношение количества колоний трансконъюгантов на чашках с рифампицином и цефотаксимом к количеству колоний реципиента на чашках с рифампицином. Параллельно проводили высев на селективные среды донорных культур для оценки частоты спонтанных мутаций устойчивости к рифампицину и в качестве отрицательного контроля конъюгации.

Изоэлектрическое фокусирование β-лактамаз. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) β-лактамаз проводили в готовых полиакриламидных гелях, содержащих амфолиты Phast Gel, pH 3-9 (Amersham Biosciences;

Piscataway, США), при помощи прибора Phastsystem (Amersham Biosciences; Piscataway, США) согласно рекомендациям производителя.

Типирование клинических штаммов с помощью ПЦР с произвольными праймерами (AP-PCR) проводили с использованием четырех праймеров ERIC1, AP7, OPA4 и M13 (Таб. 1). Кластерный анализ ПЦР-профилей был выполнен при помощи компьютерной программы GelCompar версия 4.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Бельгия) с использованием коэффициента корреляции Пирсона и UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) алгоритма.

Типирование клинических штаммов с помощью пульс-электрофореза (PFGE) макро рестрикционных фрагментов геномной ДНК проводили с использованием наборов для выделения геномной GenePath Group 6 Reagent Kit и прибора CHEF Mapper XA System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, США) согласно стандартному протоколу описанному в работе (Gautom, 1997). Геномную ДНК подвергали рестрикции при помощи эндонуклеазы *Xba*I (Promega, США).

Анализ природных плазмид, несущих гены *bla*_{CTX-M}. Выделение бактериальных плазмид у штаммов *E. coli* Irk1224, Irk2320, Irk2322 и их трансконъюгантов проводили с использованием коммерческой системы QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Германия) согласно рекомендациям производителя. Плазмиды, выделенные от трансконъюгантов, подвергали сравнительному рестрикционному анализу. Сто тридцать нанограмм плазмидной ДНК расщепляли эндонуклеазой *Pvu*II (16 ед.; Amersham Biosciences, США). Нативные плазмиды и их рестрикционные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. ПЦР-типирование репликонов у трансконъюгантов, полученных от клинических изолятов *E. coli* Irk1224, Irk2320 и Irk2322, осуществляли согласно протоколу описанному в работе (Carattoli and et al., 2005)

Определение частоты формирования спонтанных мутантов, устойчивых к рифампицину. Уровень спонтанных мутаций рассчитывали как соотношение количества колоний, выросших на чашках с рифампицином, к количеству колоний, выросших на чашках без антибиотика. Штаммы рассматривали как гипермутабельные (сильные мутаторы) при частоте мутантов $\geq 5 \times 10^{-7}$ и как слабые мутаторы при соответствующей частоте от 5×10^{-8} до 5×10^{-7} (Galan and et all., 2004).

In vitro селекция мутаций устойчивости к цефтазидиму у штаммов, продуцирующих CTX-M β -лактамазы. В экспериментах по in vitro селекции устойчивости к цефтазидиму использовали клинический изолят *E. coli* Irk1224

и лабораторный штамм-мутатор *E. coli* GM2995, экспрессирующие β -лактамазу СТХ-М-3. Ген *bla*_{СТХ-М-3} с естественным промотором был перенесен от штамма Irk1224 в GM2995 в составе вектора pCC1. Штаммы *E. coli* Irk1224 и GM2995 (pCC1-1224) субкультивировали в бульоне Мюллера-Хинтон в течение 14-16 часов при 37°C и затем высевали на селективный агар Мюллера-Хинтон, содержащий цефтазидим в концентрациях в два раза превышающих значения МПК данных штаммов (64 мг/л для Irk1224 и 2 мг/л для GM2995 (pCC1-1224)). Тридцать две мутантные колонии каждого штамма, выросшие на селективной среде, были отобраны случайным образом для дальнейшего определения чувствительности к β -лактамам антибиотикам (ампициллину, цефтазидиму и цефотаксиму) и для определения нуклеотидной последовательности *bla*_{СТХ-М} генов. Во избежание накопления мутаций и для определения влияния мутаций, как связанных, так и несвязанных с β -лактамазной активностью на резистентность мутантных штаммов к β -лактамам антибиотикам, *bla*_{СТХ-М} гены повторно амплифицировали от всех отобранных клонов и клонировали в составе pCC1 вектора в лабораторный штамм *E. coli* EPI300. Параллельно проводили секвенирование *bla*_{СТХ-М} генов и их промоторных регионов и определяли МПК ампициллина, цефтазидима и цефотаксима для штаммов мутаторов и штаммов *E. coli* EPI300, несущих *bla*_{СТХ-М} гены отобранных клонов.

Определение копийности плазмид, несущих гены *bla*_{СТХ-М}. Количество копий плазмид, несущих гены *bla*_{СТХ-М}, определяли при помощи количественной ПЦР в режиме реального времени с SYBR Green I и праймерами СТХ-М-Fext и СТХ-М-R1c (Таб. 1). Определение проводили в двух повторах для каждого анализируемого образца. Для количественной ПЦР использовали ДНК, выделенную из бактериальной культуры, выращенной в течение 18 часов в LB бульоне. Параллельно определяли количество бактериальных клеток путем приготовления последовательных 10-кратных разведений каждой культуры и посева их на чашки с добавлением хлорамфеникола (12,5 мг/л). Количество копий плазмиды, рассчитанное по данным количественной ПЦР в реальном времени, соотносили с числом бактериальных клеток для определения числа копий плазмиды на клетку.

Оценку копийности рекомбинантных плазмид на основе вектора pCC1 проводили после культивирования штаммов *E. coli* EPI 300 в хлорамфеникол-содержащем LB бульоне с добавлением и без добавления 0,02% L-арабинозы, которая является индуктором «множественной копийности» pCC1 в клетках EPI 300 за счет активации инициации репликации вектора в *oriV* (Wild and et al, 2002).

В качестве калибровочных стандартов для количественной ПЦР использовали 10-и кратные разведения культуры *E. coli* EPI 300 (pCC1-1224),

выращенной в LB бульоне с добавлением хлорамфеникола, но без добавления арабинозы. Данные условия культивирования обеспечивают однокопийное состояние вектора рСС1 в клетке за счет инициации репликации в *oriF* (190). Таким образом, число копий вектора в калибровочных стандартах было рассчитано по количеству бактериальных клеток.

Параллельно с оценкой числа копий плазмид рСС1, несущих гены различных СТХ-М β-лактамаз, проводили определение чувствительности рекомбинантных штаммов *E. coli* EPI 300 к ампициллину, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму и азтреонаму. МПК антибиотиков определяли методом микроразведений в бульоне. Процедура тестирования соответствовала рекомендациями CLSI (47), за исключением замены бульона Мюллера-Хинтон, содержащего сахара, препятствующие активации репликации рСС1 в *oriV*, на бульон LB с добавлением и без добавления 0,02% L-арабинозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация клинических изолятов, продуцирующих цефтазидим-гидролизующие β-лактамазы СТХ-М-типа. Анализ 614 клинических штаммов энтеробактерий, продуцирующих БЛРС СТХ-М-типа, выделенных в рамках многоцентрового микробиологического исследования в 2002-2004 гг. позволил выявить два изолята *E. coli*, обладающих необычным фенотипом резистентности к оксииминоцефалоспорином, а именно, более высокой устойчивостью к цефтазидиму (МПК128 мг/л), по сравнению с цефотаксимом (МПК 8 мг/л) (Таб. 2). Оба клинических изолята были выделены в отделении реанимации и интенсивной терапии с разницей 10 дней.

ПЦР в реальном времени с праймерами к внутренним участкам *bla*_{СТХ-М} выявила наличие у обоих изолятов генов, кодирующих β-лактамазы СТХ-М-1 группы.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) экстрактов периплазматических белков позволило обнаружить у штаммов *E. coli* Irk2320 и Irk2322 экспрессию β-лактамаз с изоэлектрическими точками (pI) 5,4 и 8,4, которые предположительно соответствовали ферментам TEM- и СТХ-М-типа. Фермент с изоэлектрической точкой 5,4 был идентифицирован, как пенициллиназа TEM-1 в соответствии с результатами амплификации и определения нуклеотидной последовательности гена *bla*_{TEM}. Продукция, TEM-1, таким образом, не влияла на профиль устойчивости исследуемых штаммов к оксииминоцефалоспорином.

В экспериментах по конъюгации была установлена возможность переноса детерминант устойчивости к цефтазидиму от донорных штаммов *E. coli* Irk2320 и Irk2322 к реципиенту *E. coli* AB1456 (F⁻, Rif^R) с высокой частотой (7×10^{-3}).

Трансконъюганты (AB1456-2320), полученные от штамма Irk2320, проявляли фенотип резистентности к β -лактамным антибиотикам аналогичный фенотипу резистентности исходного клинического штамма, подтверждая тем самым наличие у выявленной СТХ-М β -лактамазы необычного спектра гидролитической активности (Таб. 2).

Таблица 2.

Чувствительность к β -лактамным антибиотикам клинических штаммов *E. coli* Irk2320, Irk2322 и трансконъюгантов *E. coli* AB1456-2320

| Штамм | МПК, мг/л* | | | | | | | |
|----------------------------|------------|------|-----|---------|-----|-------|-----|-----|
| | AMP | AMC | CTX | CTX-C | CAZ | CAZ-C | CTR | FEP |
| <i>E. coli</i> Irk2320 | ≥256 | 16/8 | 8 | 0,125/4 | 128 | 2/4 | 8 | 1 |
| <i>E. coli</i> Irk2322 | ≥256 | 16/8 | 8 | 0,125/4 | 128 | 2/4 | 8 | 1 |
| <i>E. coli</i> AB1456-2320 | ≥256 | 16/8 | 8 | 0,125/4 | 128 | 2/4 | 8 | 1 |

*AMP-ампициллин, AMC-амоксициллин-клавулановая кислота, CTX-цефотаксим, CTX-C-цефотаксим-клавулановая кислота, CAZ-цефтазидим, CAZ-C-цефтазидим-клавулановая кислота, CTR-цефтриаксон, FEP-цефепим.

С помощью ПЦР и ИЭФ, у трансконъюгантов было выявлено наличие единственной β -лактамазы СТХ-М типа с изоэлектрической точкой 8,4, на основании чего был сделан вывод о том, что необычный профиль резистентности исследуемых клинических изолятов связан с продукцией СТХ-М фермента с повышенной гидролитической активностью в отношении цефтазидима.

Прямое секвенирование генов *bla*_{CTX-M} *E. coli* Irk2320 и Irk2322, амплифицированных с помощью ПЦР, показало наличие у обоих изолятов идентичной мутации, соответствующей аминокислотной замене Pro₁₆₇→Thr (нумерация аминокислотных остатков по R. Ambler (Ambler, 1993)), по сравнению с известной последовательностью β -лактамазы СТХ-М-3 (GenBank Acc. No. AF550415) (Рис. 1). ПЦР картирование с праймерами ISEcp1 и СТХ-М-R1 выявило характерную для *bla*_{CTX-M-3} и родственных генов ассоциацию с инсерционным элементом ISEcp1, расположенным на расстоянии 126 пн выше открытой рамки считывания (ORF) *bla*_{CTX-M}.

Ранее замена Pro₁₆₇→Thr была описана у СТХ-М-23 β -лактамазы, предшественником которой является СТХ-М-1 фермент (Sturenburg and et al., 2004).

Выявленной в ходе данного исследования СТХ-М β -лактамазе, отличающейся от широко распространенного варианта СТХ-М-3 наличием остатка Pro167 и повышенной активностью в отношении цефтазидима, присвоено международное номенклатурное название СТХ-М-42 (<http://www.lahey.org/studies/>). Нуклеотидная последовательность гена *bla*_{СТХ-М-42} и прилежащего участка *ISEcp1* депонирована в GenBank под номером DQ061159.

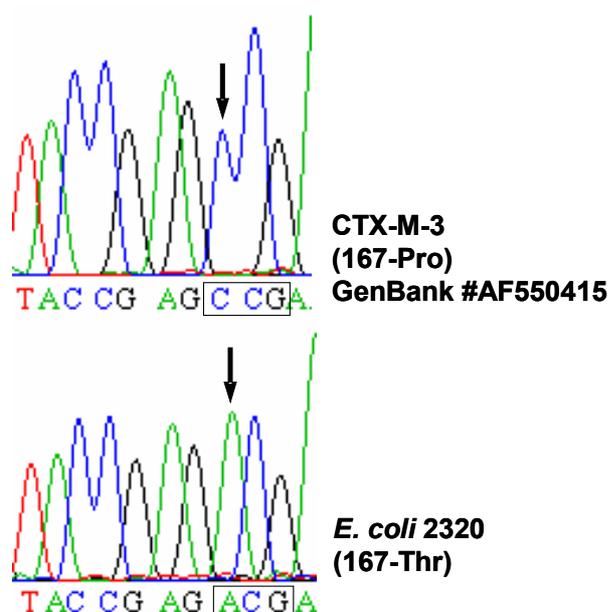


Рис. 1. Хроматограмма, показывающая нуклеотидную замену в 167 позиции (нумерация по Амберу) в *bla*_{СТХ-М} гене

Выявление источников происхождения цефтазидим-гидролизующих СТХ-М β -лактамаз. Учитывая широкое распространение СТХ-М-3 β -лактамаз у нозокомиальных штаммов энтеробактерий в России (Edelstein and et al., 2003) нами была предпринята попытка обнаружения возможного штамма предшественника изолятов *E. coli* Irk2320 и Irk2322, продуцирующего исходный вариант β -лактамазы СТХ-М-3, с низким уровнем устойчивости к цефтазидиму. С этой целью была исследована генетическая родственность между *E. coli* Irk2320, Irk2322 и 19 СТХ-М-продуцирующими изолятами *E. coli*, проявляющими классический фенотип преимущественной резистентности к цефотаксиму, выделенными в течение восьми месяцев ранее в том же отделении, что и штаммы, экспрессирующие СТХ-М-42.

Выбранные клинические изоляты были типированы методом ПЦР-амплификации произвольных последовательностей (AP-PCR) с 4 различными праймерами: ERIC1, AP7, OPA4 и M13. Кластерный анализ суммарных AP-PCR профилей позволил определить единственный изолят, Irk1224, как наиболее родственной Irk2320 и Irk2322 (Рис. 2). Профиль амплификационных

фрагментов *E. coli* Irk1224, полученный при использовании праймера ERIC1, отличался от аналогичных профилей *E. coli* Irk2320 и Irk2322 только двумя ПЦР-фрагментами. В то же время, AP-PCR профили, полученные с тремя другими праймерами (AP7, OPA4 и M13) были полностью идентичны у всех трех изолятов. Прочие исследованные штаммы отличались от Irk2320 и Irk2322 по результатам AP-PCR типирования со всеми праймерами. На рисунке 3А суммарные AP-PCR профили изолятов *E. coli* Irk2320, Irk2322, Irk1224 и Irk1737 (неродственный штамм) представлены для сравнения.

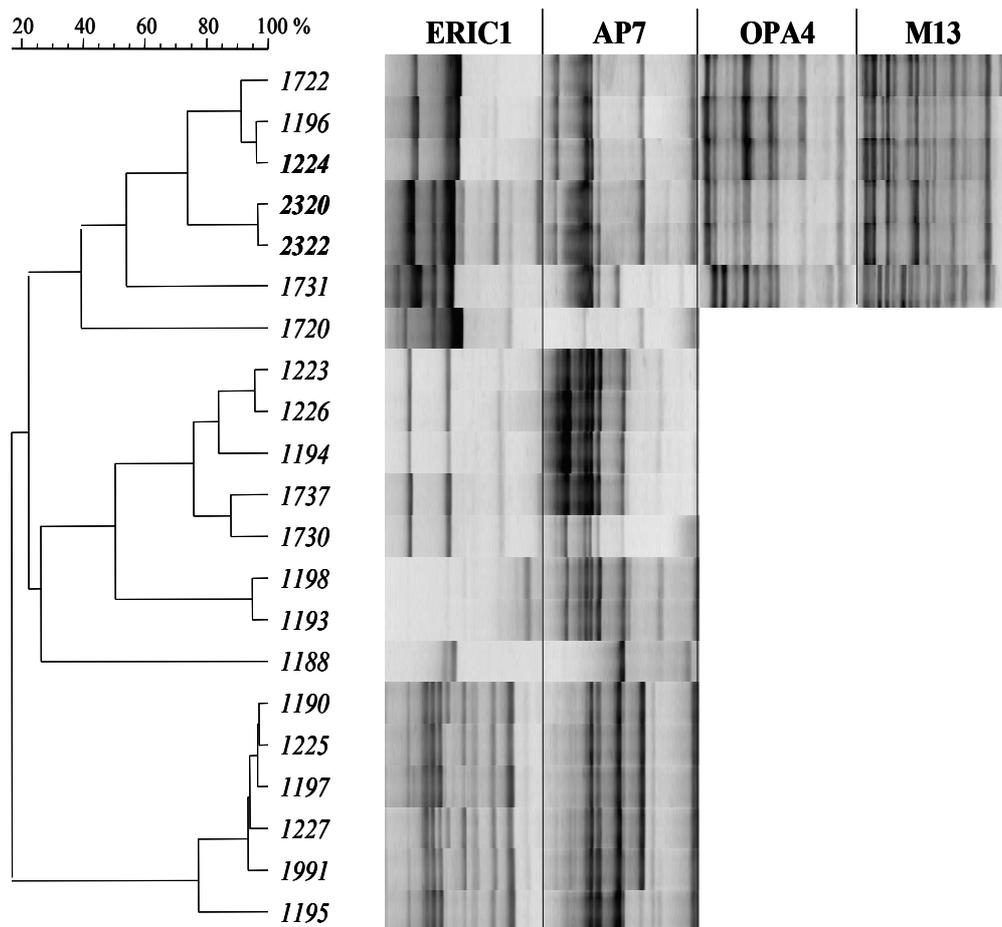


Рис. 2. Кластерный анализ (UPGMA) ПЦР профилей клинических штаммов *E. Coli*

Для дополнительного подтверждения генетической родственности клинических изолятов *E. coli* Irk1224, Irk2320 и Irk2322 был использован метод пульс-электрофореза (PFGE) *Xba*I макрорестрикционных фрагментов геномной ДНК. Результаты PFGE анализа представлены на рисунке 3В. Макрорестрикционные профили ДНК *E. coli* Irk2320 и Irk2322 были полностью идентичны. PFGE профиль Irk1224 отличался от них четырьмя фрагментами. Тем не менее, PFGE профили всех трех изолятов характеризовались наличием

16 общих фрагментов ДНК и, следовательно, проявляли выраженное сходство, свидетельствующее о родственности изолятов.

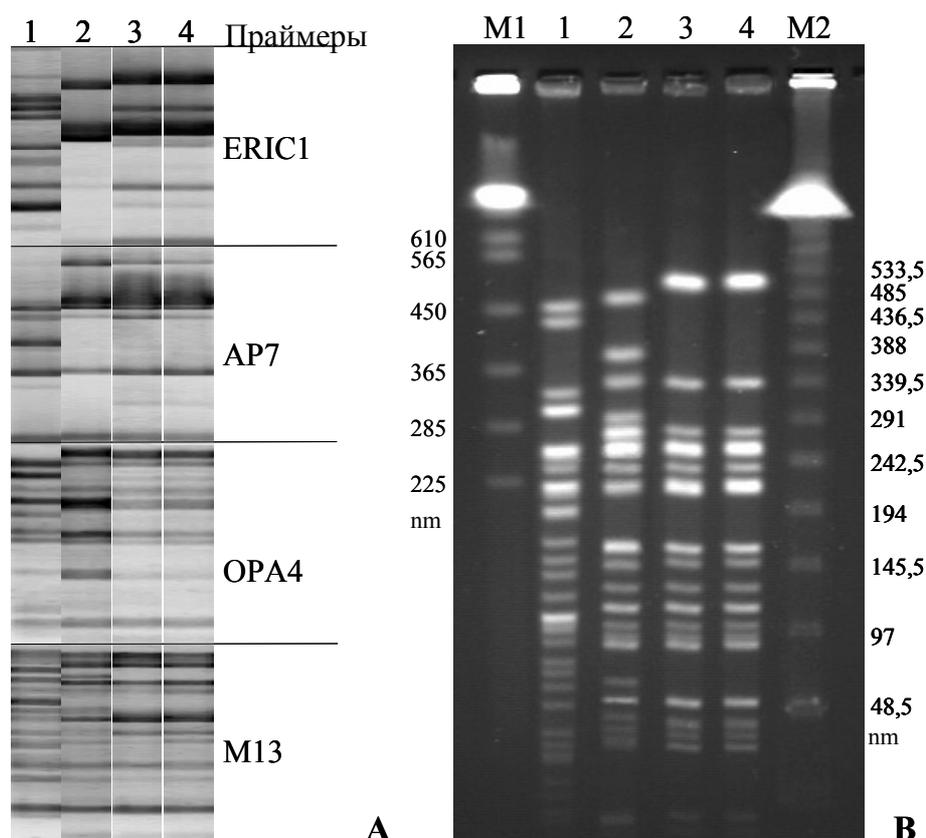


Рис. 3. AP-PCR (А) и PFGE (В) профили СТХ-М-продуцирующих изолятов *E. coli*.

1 – Irk1737 (контрольный неродственный изолят); 2 - Irk1224; 3 - Irk2320; 4 - Irk2322; M1 и M2 - маркеры молекулярной массы (M1 - *S. cerevisiae*, M2 - Lambda PFGE Standard).

Таким образом, результаты молекулярно-генетического типирования позволили установить клональность изолятов *E. coli* Irk2320, Irk2322 и охарактеризовать штамм Irk1224, как их наиболее вероятный предшественник.

Электрофоретический анализ плазмид, выделенных от *E. coli* Irk1224, Irk2320, Irk2322 и их трансконъюгантов, проявляющих устойчивость к оксимино цефалоспоринам, обнаружил присутствие у них общей СТХ-М-кодирующей плазмиды с молекулярной массой ~250 тпн. У штамма *E. coli* Irk1224 была вывлена дополнительная плазида с молекулярной массой ~150 тпн., которая отсутствовала у его трансконъюгантов (*E. coli* AB1456-Irk1224), устойчивых к оксимино цефалоспоринам. СТХ-М-кодирующие плазмиды, выделенные от трансконъюгантов *E. coli* AB1456-Irk1224, AB1456-Irk2320 и AB1456-Irk2322 были подвергнуты рестрикционному анализу с использованием эндонуклеазы *PvuII*, который выявил их идентичность (Рис. 4).

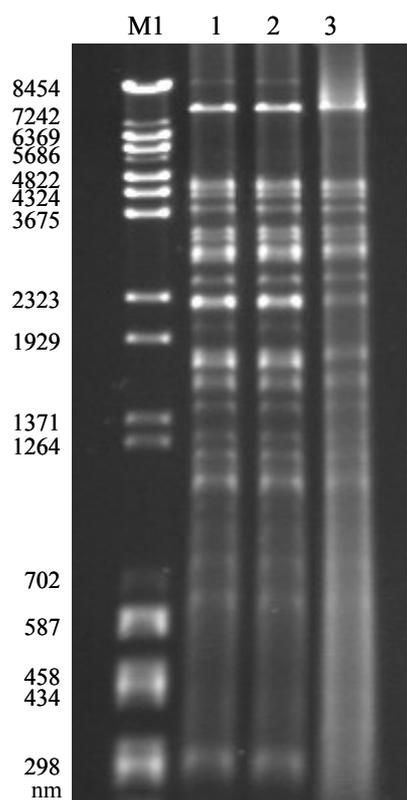


Рис. 4. *PvuII*-рестрикционные профили плазмид, несущих гены *bla*_{CTX-M}.

1 – *E. coli* AB1456-Irk1224; 2 - *E. coli* AB1456-Irk2320; 3 - *E. coli* AB1456-Irk2322; M1- маркер молекулярной массы (смесь рестрикционных фрагментов λ *BstEII* и pUC18 *HaeIII*)

ПЦР-типирование репликонов позволило отнести CTX-M-кодирующие плазмиды всех трех исследованных изолятов *E. coli* к группе IncL/M.

ПЦР с праймерами ISEcp1 и CTX-M-R-stop выявила одинаковый характер ассоциации генов *bla*_{CTX-M} с ISEcp1 в составе IncL/M плазмид у *E. coli* Irk1224, Irk2320 и Irk2322. ПЦР-фрагмент с ожидаемой молекулярной массой (1225 пн), был получен от всех трех изолятов. Ассоциация *bla*_{CTX-M} гена с ISEcp1 последовательностью говорит о возможной мобильности данного гена. ISEcp1 или ISEcp1-подобные инсерционные элементы неоднократно были обнаружены на расстоянии 42-266 пн и выше открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих CTX-M ферменты, принадлежащих к CTX-M-1, CTX-M-2 и CTX-M-9 кластерам (Bonnet, 2004).

Однако, в соответствии с фенотипами резистентности изолятов, прямое секвенирование данного ПЦР фрагмента показало наличие гена *bla*_{CTX-M-3} у штамма Irk1224, в отличие от Irk2320 и Irk2322, несущих мутантный вариант *bla*_{CTX-M-42} с описанной выше однонуклеотидной заменой в кодоне 167. Отличий в нуклеотидных последовательностях промоторной области *bla*_{CTX-M-3} и *bla*_{CTX-M-42} обнаружено не было.

Выявление фенотипа гипермутабельности у клинических штаммов *E. coli*, продуцирующих СТХ-М-3 и СТХ-М-42 показало, что изоляты *E. coli* Irk1224, Irk2320 и Irk2322 проявляют повышенную частоту формирования спонтанных мутантов, устойчивых к рифампицину, (1×10^{-5}) по сравнению со штаммами, обладающими нормальной частотой мутирования ($<5 \times 10^{-8}$) (Galan, 2004). Исследованные изоляты были охарактеризованы, таким образом, как сильные мутаторы. Полученные от штаммов *E. coli* Irk1224 и Irk2320 амплификационные фрагменты, содержащие гены *bla*_{СТХ-М-3} и *bla*_{СТХ-М-42} с естественным промотором, были клонированы в вектор pCC1. В результате трансформации лабораторного штамма *E. coli* EPI 300 соответствующими рекомбинантными плазмидами (pCC1-1224 и pCC1-2320) были получены полностью изогенные штаммы, экспрессирующие β-лактамазы СТХ-М-3 и СТХ-М-42, отличающиеся единственной аминокислотной заменой – Pro₁₆₇→Thr. Результаты сравнения фенотипов резистентности клинических и лабораторных штаммов, продуцирующих ферменты СТХ-М-3 и СТХ-М-42, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Чувствительность клинических и лабораторных штаммов *E. coli*, продуцирующих СТХ-М-3 и СТХ-М-42 к β-лактамам антибиотикам и их комбинациям с ингибиторами.

| Штамм | β-лактамаза | МПК, мг/л ¹ | | | | | | | |
|---|-------------|------------------------|-------|------|---------|------|--------|------|------|
| | | AMP | AMC | СТХ | СТХ-С | CAZ | CAZ-С | CTR | FEP |
| <i>E. coli</i> Irk1224 | СТХ-М-3 | ≥256 | 32/16 | ≥256 | 2/4 | 32 | 4/4 | ≥256 | 32 |
| <i>E. coli</i> Irk2320 | СТХ-М-42 | ≥256 | 16/8 | 8 | 0,125/4 | 128 | 2/4 | 8 | 1 |
| <i>E. coli</i> 2322 | СТХ-М-42 | ≥256 | 16/8 | 8 | 0,125/4 | 128 | 2/4 | 8 | 1 |
| <i>E. coli</i> EPI 300 pCC1-1224 | СТХ-М-3 | ≥256 | 8/4 | 4 | 0,06/4 | 0,5 | 0,25/4 | 4 | 0,5 |
| <i>E. coli</i> EPI 300 pCC1-2320 | СТХ-М-42 | ≥256 | 8/4 | 0,5 | 0,06/4 | 32 | 1/4 | 1 | 0,25 |
| <i>E. coli</i> EPI 300 pCC1 ² | нет | 2 | 2/1 | 0,06 | 0,06/4 | 0,25 | 0,25/4 | 0,06 | 0,06 |

¹ AMP-ампициллин, AMC-амоксициллин-клавулановая кислота, СТХ-цефотаксим, СТХ-С-цефотаксим-клавулановая кислота, CAZ-цефтазидим, CAZ-С-цефтазидим-клавулановая кислота, CTR-цефтриаксон, FEP-цефепим.

² Штамм *E. coli* EPI 300, несущий вектор pCC1 без вставки, использован в качестве контроля.

Лабораторные штаммы *E. coli* EPI300, несущие гены $bla_{\text{CTX-M-3}}$ и $bla_{\text{CTX-M-42}}$, проявляли фенотипы устойчивости, сходные с таковыми клинических изолятов *E. coli* Irk1224 и Irk2320 (Таб. 3). Экспрессия СТХ-М-42 (по сравнению с СТХ-М-3) у *E. coli* EPI300 приводила к повышению МПК цефтазидима в 64 раза и одновременному снижению МПК цефотаксима в 8 раз, цефтриаксона – в 4 раза и цефепима – в 2 раза, что однозначно доказывает роль замены Pro₁₆₇→Thr в переключении спектра активности СТХ-М ферментов.

In vitro селекция мутаций устойчивости к цефтазидиму у штаммов-продуцентов СТХ-М-3. Представленные выше данные позволили предположить наличие вероятной взаимосвязи между терапией цефтазидимом и *in vivo* селекцией мутации Pro₁₆₇→Thr в СТХ-М-3 у клинического гипермутабельного штамма *E. coli*. Для проверки данной гипотезы нами была предпринята попытка воспроизвести эволюцию СТХ-М-3 в эксперименте по *in vitro* селекции мутаций устойчивости к цефтазидиму у гипермутабельных штаммов *E. coli*.

В качестве исходных штаммов были использованы клинический изолят *E. coli* Irk1224 и лабораторный штамм-мутатор *E. coli* GM2995 (*mutD5*), трансформированный плазмидой pCC1-1224, несущей ген $bla_{\text{CTX-M-3}}$. При культивировании данных штаммов на среде с добавлением цефтазидима в концентрации, превышающей МПК каждого штамма в два раза, цефтазидим-резистентные мутанты были получены с частотой 2×10^{-8} и 2×10^{-6} , соответственно, от Irk1224 и GM2995 (pCC1-1224).

В результате эксперимента случайным образом было отобрано тридцать две мутантные колонии каждого штамма, выросшие на селективной среде.

Во избежание накопления дополнительных мутаций в процессе субкультивирования штаммов-мутаторов, гены СТХ-М β-лактамаз были повторно амплифицированы у выбранных цефтазидим-резистентных мутантов и клонированы в составе вектора pCC1 в лабораторный штамм *E. coli* EPI300. У всех трансформантов была определена нуклеотидная последовательность $bla_{\text{CTX-M}}$ генов и их промоторов, а также определены значения МПК ампициллина, цефтазидима и цефотаксима (Таб. 5).

Таблица 4.

Чувствительность исходных штаммов-мутаторов и полученных от них
цефтазидим-резистентных мутантов.

| Исходные штаммы и мутанты | β-лактамаза (мутация) | N ¹ | МПК, мг/л ² | | |
|---------------------------|-----------------------|----------------|------------------------|------|------|
| | | | AMP | CAZ | CTX |
| Irk1224 | CTX-M-3 (дикий тип) | | ≥256 | 32 | ≥256 |
| Мутанты Irk1224 1-го типа | CTX-M-3 (дикий тип) | 30 | ≥256 | ≥256 | ≥256 |
| Мутанты Irk1224 2-го типа | CTX-M-3 (Ser167) | 1 | ≥256 | ≥256 | 64 |
| Мутанты Irk1224 3-го типа | CTX-M-3 (Lys136) | 1 | ≥256 | ≥256 | 64 |
| GM2995 (pCC1-1224) | CTX-M-3 (дикий тип) | | ≥256 | 1 | 4 |
| Мутанты GM2995 1-го типа | CTX-M-3 (дикий тип) | 24 | ≥256 | 32 | ≥256 |
| Мутанты GM2995 2-го типа | CTX-M-3 (Ser167) | 8 | 128 | 32 | 1 |

¹ Количество отобранных мутантов каждого типа.

² AMP – ампициллин, CAZ – цефтазидим, CTX – цефотаксим.

Таблица 5.

Чувствительность рекомбинантных клонов *E. coli* EPI300, несущих
гены *bla*_{CTX-M} исходных штаммов-мутаторов и полученных от них цефтазидим-
резистентных мутантов.

| Источник гена <i>bla</i> _{CTX-M} | β-лактамаза (мутация) | N ¹ | МПК, мг/л | | |
|---|-----------------------|----------------|-----------|-----|-----|
| | | | AMP | CAZ | CTX |
| Irk1224 | CTX-M-3 (дикий тип) | | ≥256 | 1 | 8 |
| Мутанты Irk1224 1-го типа | CTX-M-3 (дикий тип) | 30 | ≥256 | 1 | 8 |
| Мутанты Irk1224 2-го типа | CTX-M-3 (Ser167) | 1 | 128 | 16 | 1 |
| Мутанты Irk1224 3-го типа | CTX-M-3 (Lys136) | 1 | 32 | 8 | 1 |
| GM2995 (pCC1-1224) | CTX-M-3 (WT) | | ≥256 | 1 | 8 |
| Мутанты GM2995 1-го типа | CTX-M-3 (WT) | 24 | ≥256 | 1 | 8 |
| Мутанты GM2995 2-го типа | CTX-M-3 (Ser167) | 8 | 128 | 16 | 1 |

¹ Количество отобранных мутантов каждого типа.

² AMP – ампициллин, CAZ – цефтазидим, CTX – цефотаксим.

Анализ полученных мутантов позволил разделить их на несколько типов (Таб. 4, 5). Большинство мутантов, резистентных к цефтазидиму (мутанты 1-го типа), имели одинаково высокие значения МПК цефотаксима и цефтазидима (≥ 256 мг/л). Экспрессия $bla_{\text{CTX-M}}$ генов этих мутантов в лабораторном штамме *E. coli* EPI300 приводила к формированию фенотипа устойчивости, идентичного таковому для исходного гена $bla_{\text{CTX-M-3}}$. Секвенирование подтвердило отсутствие мутаций в структурной части и промоторе $bla_{\text{CTX-M}}$ генов, полученных от мутантов 1-го типа. Следовательно, повышенная устойчивость к цефтазидиму у мутантов данного типа была связана с изменениями хромосомных генов *Irk1224* и *GM2995* (*pCC1-1224*), наиболее вероятно, определяющими снижение проницаемости наружной мембраны или увеличение продукции видоспецифической цефалоспоринызы (*AmpC*). Известно, что такие мутации широко распространены у клинических штаммов энтеробактерий, продуцирующих БЛРС (Livermore D.M., 1987; Livermore D.M., 2005; Martinez-Martinez and et all, 1999; Martinez-Martinez and et all, 2000). Аналогичные мутации были выявлены также исследовательской группой D. Livermore и N. Woodford в экспериментах по *in vitro* селекции расширенного спектра активности у TEM и CTX-M ферментов с использованием MutS штаммов *E. coli* (Ellington and et all, 2006; Karisik and et all, 2006).

Мутанты другой группы (мутанты 2-го типа) характеризовались наличием более высоких значений МПК цефтазидима по сравнению с цефотаксимом (Таб. 4). У всех представителей этой группы в последовательности гена $bla_{\text{CTX-M}}$ была выявлена идентичная мутация, соответствующая аминокислотной замене $\text{Pro}_{167} \rightarrow \text{Ser}$. Как было сказано выше, данная мутация встречается у CTX-M-52, которая принадлежит к группе CTX-M-1-родственных β -лактамаз, а также у отдельных ферментов, относящихся к кластерам CTX-M-2 и CTX-M-9, например, CTX-M-35 и CTX-M-19 (Poirel and et all, 2001) Интересно отметить, что эксперименты K. Welsh и соавт. по *in vitro* мутагенезу CTX-M-2 (Welsh and et all, 2005) и E. Karisik и соавт. по селекции устойчивости к цефтазидиму в CTX-M-3 (Karisik and et all, 2006), проведенные одновременно с нашим исследованием, также привели к идентификации единственной значимой аминокислотной замены $\text{Pro}_{167} \rightarrow \text{Ser}$. В то же время, у «природных» CTX-M цефтазидиназ, были обнаружены и другие аминокислотные замены в позиции 167, например, Thr у CTX-M-23 и CTX-M-42 (описанной в данной работе) и Gln у CTX-M-54. Причина невыявления мутаций Pro_{167} и Gln_{167} у CTX-M-производных, полученных *in vitro*, остается неясной. Возможно, что транзиция $\text{C} \rightarrow \text{A}$, приводящая к замене $\text{Pro}_{167} \rightarrow \text{Ser}$ является более вероятной мутацией (по сравнению с другими заменами нуклеотидов в кодоне 167) у лабораторных штаммов-мутаторов, включая

MutD5 штамм, использованный в нашей работе и *MutS* штаммы, задействованные в других исследованиях (Karisik and et all, 2006; Philippon, Arlet, and Jacoby, 2002.). В промоторе *bla*_{СТХ-М} генов, полученных от мутантов 2-го типа, мутаций обнаружено не было. Лабораторные штаммы *E. coli* EPI300, продуцирующие мутантный вариант β-лактамазы СТХ-М-3 (Ser167), также проявляли фенотип преимущественной резистентности к цефтазидиму и пониженной (относительно СТХ-М-3) устойчивости к ампициллину и цефотаксиму, что однозначно подтверждает ключевую роль мутаций в позиции 167 в изменении спектра активности СТХ-М ферментов.

У единственного мутанта (мутант 3-го типа), полученного от штамма *E. coli* Irk1224, в последовательности *bla*_{СТХ-М} была обнаружена ранее неизвестная мутация T₄₁₇→G, соответствующая аминокислотной замене Asn₁₃₆→Lys в области A4 α спирали. Других изменений в промоторной области и структурной части гена *bla*_{СТХ-М} у данного мутанта выявлено не было. Продукция мутантной β-лактамазы СТХ-М-3 (Lys136), по сравнению с исходным ферментом, приводила к повышению МПК цефтазидима и одновременному снижению уровня резистентности к цефотаксиму и, особенно, к ампициллину (Таб. 5). Остаток Asn136, находящийся в A4 α спирали, непосредственно взаимодействует с остатком Thr165 Ω петли и является консервативным у всех СТХ-М β-лактамаз (Chen and et all., 2005). Замена Asn₁₃₆→Lys, по всей вероятности, нарушает данное взаимодействие, что, в свою очередь, приводит к увеличению подвижности Ω петли и расширению активного центра. Известно, что увеличение активного центра повышает эффективность связывания и расщепления цефтазидима СТХ-М ферментами. С другой стороны, подобное изменение структуры должно приводить к снижению общей стабильности и активности фермента, что подтверждается результатами оценки чувствительности к ампициллину изогенных штаммов *E. coli* EPI300, продуцирующих исходный фермент (СТХ-М-3) и его мутантный вариант Lys136. Возможно также, что низкая активность СТХ-М-3 (Asn₁₃₆→Lys) в отношении ампициллина объясняет тот факт, что до настоящего времени данная мутация не была обнаружена у клинических штаммов.

Следует также отметить, что в экспериментах по *in vitro* селекции устойчивости к цефтазидиму нами не были обнаружены мутанты СТХ-М-3 с заменой Asp₂₄₀→Gly, которая характерна для наиболее широко распространенной у клинических штаммов β-лактамазы СТХ-М-15 и некоторых других «природных» СТХ-М β-лактамаз. Возможно это связано с тем, что замена Asp₂₄₀→Gly обеспечивает менее выраженное повышение

активности в отношении цефтазидима по сравнению с мутациями в позиции 167.

Влияние копияности плазмид, несущих гены СТХ-М β -лактамаз, на уровни резистентности к β -лактамным антибиотикам. Система CopyControl (Epicentre Biotechnologies), состоящая из вектора pCC1, имеющего две области инициации репликации: *ori* F-фактора (*oriF*) и *oriV*, и лабораторного штамма *E coli* EPI300, несущего рекомбинантный ген активатора *oriV* (*trfA*) под контролем строгого арабинозного промотора, позволяет изменять копияность вектора в зависимости от условий культивирования (Welsh and et al., 2005). В стандартных условиях инициация репликации pCC1 происходит в *oriF*, что позволяет поддерживать вектор в однокопийном состоянии. При культивировании *E coli* EPI300 на среде с добавлением L-арабинозы происходит переключение инициации репликации в *oriV*, приводящее к резкому увеличению копияности вектора.

Использование системы CopyControl в данной работе позволило исследовать влияние копияности генов *bla*_{СТХ-М-3} и *bla*_{СТХ-М-42}, экспрессируемых в изогенных штаммах *E coli* EPI300, на уровни их устойчивости к β -лактамным антибиотикам.

По данным количественной ПЦР в режиме реального времени, индукция арабинозой приводила к увеличению копияности плазмид pCC1, несущих гены *bla*_{СТХ-М}, и контрольного вектора pCC1 (без вставки *bla*_{СТХ-М}) примерно в 10 раз (от 1 до 10 \pm 1.1 копий на клетку).

В отсутствие арабинозы экспрессия одной копии гена *bla*_{СТХ-М-3} в клетках *E coli* EPI300 обеспечивала резистентность высокого уровня к ампициллину (МПК 512 мг/л) и цефотаксиму (МПК 16 мг/л) и несколько пониженную чувствительность к цефтазидиму (МПК 1 мг/л) по сравнению с контрольным штаммом, не продуцирующим β -лактамазу (МПК 0,5 мг/л). Аналогичным образом, экспрессия гена *bla*_{СТХ-М-42}, находящегося в однокопийном состоянии, создавала высокий уровень устойчивости к ампициллину (МПК 256 мг/л) и цефтазидиму (МПК 32 мг.л), но низкие уровни резистентности к цефотаксиму (МПК 1 мг/л) и цефепиму (МПК 0,5 мг/л) (Таб. 6).

Таблица 6.

Чувствительность рекомбинантных штаммов *E. coli* EPI300 к β -лактамам при различной копииности плазмид рСС1, несущих гены *bla*_{СТХ-М}.

| Плазмида | β -лактамаза | Кол-во. копий плазмиды на клетку | МПК, мл/л ¹ | | | | |
|---------------|--------------------|--|------------------------|------|-----|--------|------|
| | | | AMP | CTX | CAZ | FEP | AZT |
| рСС1-1224 | СТХ-М-3 | 1 | 512 | 16 | 1 | 1 | 2 |
| | | 10 | ≥2048 | 256 | 4 | 4 | 16 |
| рСС1-2320 | СТХ-М-42 | 1 | 256 | 1 | 32 | 0.5 | 1 |
| | | 10 | ≥2048 | 4 | 128 | 1 | 4 |
| рСС1 | - | 1 | 2 | 0,25 | 0,5 | ≤0,125 | 0,25 |
| (без вставки) | | >10 | 2 | 0,25 | 0,5 | ≤0,125 | 0,25 |

¹AMP – ампициллин, CTX – цефотаксим, CAZ – цефтазидим, FEP – цефепим, AZT – азтреонам.

Дясятикратное увеличение копииности плазмид, кодирующих СТХ-М-3 и СТХ-М-42, (в результате индукции арабинозой) сопровождалось параллельным повышением МПК всех оксимино- β -лактамов в 2-16 раз. Наиболее значительное повышение МПК было отмечено для антибиотиков, которые являются предпочтительными субстратами соответствующих β -лактамаз. Например, увеличение копииности гена, кодирующего СТХ-М-3, приводило к повышению МПК цефотаксима в 16 раз. Вместе с тем, МПК цефалоспоринов, которые являются «слабыми субстратами» для СТХ-М-3 (цефтазидим) и для СТХ-М-42 (цефотаксим), также возрастали существенно (в 4 раза), достигая пограничного или клинически-значимого уровня резистентности (в соответствии с категориями оценки чувствительности CLSI и EUCAST).

Наличие арабинозы и увеличение числа копий вектора рСС1 без вставки *bla*_{СТХ-М} не влияло на устойчивость контрольного штамма *E. coli* EPI300 к β -лактамам (Таб. 6).

Таким образом, представленные выше данные демонстрируют наличие четкой корреляции между числом копий генов СТХ-М БЛРС в бактериальных клетках и уровнями их устойчивости к оксимино- β -лактамам.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен, охарактеризован и представлен в международной классификации новый мутантный вариант CTX-M β-лактамазы расширенного спектра, CTX-M-42, определяющий высокий уровень устойчивости к цефтазидиму у клинических штаммов *E. coli*.
2. Аминокислотные замены в позициях 167 (Pro→Ser/Thr) и 136 (Asp→Lys) играют ключевую роль в изменении спектра ферментативной активности CTX-M-3 и формировании резистентности к цефтазидиму у штаммов-продуцентов.
3. Приобретение мутации Pro167→Thr в CTX-M-3 и появление CTX-M-42 *in vivo* подтверждается обнаружением клонально и эпидемиологически родственных штаммов, продуцирующих CTX-M-3 и CTX-M-42 ферменты и обладающих фенотипом гипермутабельности. Возникновение данной мутации в гипермутабельных штаммах *E. coli* связано с селекцией при использовании цефтазида.
4. Установлено, что ген CTX-M-42 ассоциирован с инсерционным элементом *ISEcp1*, находится в составе IncL/M плазмиды и может передаваться с высокой эффективностью при конъюгации.
5. Данные *in vitro* селекции цефтазидим-резистентности у клинических и лабораторных гипермутабельных штаммов *E. coli* подтверждают роль аминокислотных замен в позиции 167 в формировании резистентности к цефтазидиму.
6. В модельных экспериментах с изогенными лабораторными штаммами установлена положительная корреляция между числом копий генов CTX-M β-лактамаз и уровнями устойчивости штаммов к оксиимино-β-лактамам.

**Публикации по теме диссертации в изданиях,
рекомендованных ВАК:**

1. Шевченко, О.В. Металло-β-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / О.В.Шевченко, Эйдельштейн М.В., **М.Н. Степанова** / Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2007. - Т. 9. - №3. - С. 211-218.
2. Stepanova, M.N. Convergent *in vivo* and *in vitro* selection of ceftazidime resistance mutations at position 167 of CTX-M-3 β-lactamase in hypermutable *Escherichia coli* strains. / M.N. Stepanova, M. Pimkin, A.A. Nikulin, V.K. Kozyreva, E.D. Agarova, M.V. Edelstein / Antimicrob Agents Chemother. - 2008. – V. 52. - №4. – P. 1297-1301.

Другие публикации по теме диссертации:

1. Степанова, М.Н. Мутационная изменчивость CTX-M β -лактамаз и формирование устойчивости к цефтазидиму у клинических и лабораторных штаммов *Escherichia coli*. / М.Н. Степанова / 34-ая конференция молодых ученых и 54-ая научная студенческая конференция. - Смоленск, 2007. - С. 50-51.
2. Pimkin, M. High frequency of association between CTX-M- β -lactamase-coding genes and the ISEcp1 insertion element. / M. Pimkin, I. Palagin, **M. Stepanova**, M. Edelstein / 14th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – Prague, 2004. –P. 1471.
3. Stepanova, M. Rapid Country-Wide Dissemination of Nosocomial CTX-M-14-Beta-Lactamase-Producing Strains in Russia. / M. Stepanova, E. Ryabkova, M. Edelstein, L. Strachounski /45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - Washington, 2005.
4. Stepanova, M. In Vivo Evolution and Emergence of a New CTX-M Beta-Lactamase with "Ceftazidimase" Activity in a Hypermutable Clinical Strain. / M. Stepanova, O. Shevchenko, M. Edelstein / 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - Washington, 2005.
5. Narezkina, A. Continuous Spread of ESBL-Producing Salmonellae in Russian Hospitals. / A. Narezkina, **M. Stepanova**, M. Edelstein / 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - Washington, 2005.
6. Stepanova, M. Modelling the effect of copy number of plasmids carrying ESBL genes on resistance levels to β -lactam antibiotics. / M. Stepanova, M. Edelstein / 16th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - Nice, 2006.
7. Stepanova, M. Convergent selection of ceftazidime resistance mutations at position 167 of CTX-M-3 β -lactamase in hypermutable *Escherichia coli* strains. / M. Stepanova, M. Edelstein / 16th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. - Nice, 2006.
8. Stepanova, M. Epidemiological surveillance and characterization of TEM-, SHV- and CTX-M-type ESBLs in Russian nosocomial strains of *Enterobacteriaceae* using real-time PCR and melting-curve analysis techniques. / M. Stepanova, A. Nikulin, M. Sukhorukova, M. Edelstein / 17th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases / 25th International Congress of Chemotherapy. - Munich, 2007.

Список использованных сокращений

| | |
|--------|--|
| А.к | аминокислота |
| БЛРС | β -лактамаза расширенного спектра |
| ИЭФ | изоэлектрическое фокусирование |
| МПК | минимальная подавляющая концентрация |
| ОРИТ | отделения реанимации и интенсивной терапии |
| ОРС | открытая рамка считывания |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| AP-PCR | Arbitrary primed PCR (ПЦР с произвольными праймерами) |
| ATCC | American Type Culture collection |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CTX-M | cefotaxime modifying enzyme |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| PFGE | pulse field gel electrophoresis |

Аминокислоты

| | |
|-----|-----------|
| Asn | аспарагин |
| Lys | лизин |
| Pro | пролин |
| Ser | серин |
| Thr | треонин |

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18, Казанский университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне.

Благодарности.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.б.н. М.В. Эйдельштейну за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и плодотворное обсуждение полученных результатов, к.б.н. М.В. Сухоруковой за постоянное внимание, помощь в работе и консультации.

Отдельная благодарность выражается Е.Д. Агаповой (Иркутская Обласная детская клиническая больница) за предоставление для работы клинических штаммов.

Автор искренне благодарен директору и сотрудникам НИИ антимикробной химиотерапии за всестороннюю помощь и доброжелательную рабочую атмосферу.

Автор также сердечно благодарит семью, родных и близких за всестороннюю поддержку и любовь.