

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

«___» _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование эффективности применения метода детекции
металло-бета-лактамаз для оценки чувствительности микроорганизмов к
антибактериальным препаратам

06.04.01 Биология

06.04.01.01 микробиология и биотехнология

Научный руководитель: _____ доцент, к.б.н. Н.И.Сарматова

Выпускник: _____ А.Н.Ступина

Рецензент: _____ д.б.н. О.А.Коленчукова

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Исследование эффективности применения метода детекции металло-бета-лактамаз для оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам» содержит 60 страниц текстового документа, 12 иллюстраций, 4 таблицы, 79 использованных источников.

Ключевые слова: АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, МЕТАЛЛО-БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ, КАРБАПЕНЕМАЗЫ, БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА, МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ, ДИСКО-ДИФфуЗИОННЫЙ МЕТОД, МЕТОД ИНАКТИВАЦИИ КАРБАПЕНЕМАЗ, МЕТОД ДВОЙНЫХ ДИСКОВ.

Объект исследования: микроорганизмы, выделенные из гнойно-септических ран.

Цель работы: исследование эффективности применения метода детекции металло-бета-лактамаз для оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

В результате проделанной работы было проведено 6701 анализ и выделено 3328 микроорганизмов. Среди выделенных изолятов бактерий *K. pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E.coli* и *Acinetobacter* обнаружены продуценты металло-бета-лактамаз, карбапенемаз, бета-лактамаз расширенного спектра. Исследования показали эффективность фенотипических методов детекции металло-бета-лактамаз в качестве фактора оценки чувствительности микроорганизмов к испытуемым антибиотикам. Отсутствие чувствительности к антибиотикам проявили бактерии *K. pneumoniae*, что подтверждено диско-диффузионным методом детекции. Бактерии *E.coli* обладают резистентностью к меропенемам, что подтверждает выработку карбапенемаз и доказано СИМ-тестом. Методом двойных дисков с применением ингибиторов показана продукция металло-бета-лактамаз и бета-лактамаз расширенного спектра у *P.aeruginosa* и *E.coli*, соответственно.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Характеристика β -лактамаз грамотрицательных бактерий	6
1.1.1 Классификация β -лактамаз.....	6
1.1.1.1 Свойства металло- β -лактамаз	9
1.1.1.2 Свойства карбопенемаз	15
1.1.1.3 Свойства β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС).....	17
1.1.2 Механизм защиты грамотрицательных бактерий с помощью β -лактамаз от воздействия антимикробных препаратов	21
1.2 Методы детекции металло- β -лактамаз, β -лактамаз расширенного спектра.....	25
1.3 Опасность распространения антибиотикорезистентности у бактерий продуцентов металло- β -лактамаз и β -лактамаз расширенного спектра ..	30
1.4 Выводы по разделу.....	34
2 Объекты и методы исследования	35
2.1 Объекты исследования	35
2.2 Методы исследования.....	35
2.2.1 Бактериологический посев.....	35
2.2.2 Диско-диффузионный метод (ДДМ).....	35
2.2.3 Метод инактивации карбапенемаз (СИМ-тест).....	36
2.2.4 Метод выявления металло-бета-лактамаз (МБЛ).....	36
2.2.5 Метод обнаружения бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС).....	36
3 Результаты исследования	37
3.1 Оценка результатов исследования	37
3.2 Выводы по разделу.....	44
Заключение	46
Список сокращений	49
Список использованной литературы.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Приобретение патогенными микроорганизмами антибиотикорезистентности является одной из глобальных угроз здоровью человечества [1]. Число заболеваний, не поддающихся лечению имеющимися лекарственными средствами, а также вероятность их распространения в результате глобализации международных сообщений, увеличивается [2]. Вместе с тем разработка и внедрение новых препаратов занимает десятки лет [3]. Масштабы данной проблемы демонстрирует статистика, согласно которой ежегодно в мире от инфекций, вызываемых устойчивыми бактериями, умирает свыше 700 тысяч человек [4]. Тенденция стремительного развития резистентности обусловлена нерациональным и избыточным применением антибиотиков [5]. Известно, например, что, при лечении коронавируса COVID-19 в терапии антибиотиками из-за сопутствующих бактериальных инфекций нуждаются до 15% больных, однако получают такую терапию свыше 75% [6].

В современной медицинской практике бета-лактамы антибиотики считаются самыми распространенными, их доля 60% [7, 8]. К ним относятся: пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы [9]. Многообразие объясняется разработкой и синтезом препаратов с совершенствуемой фармакинетикой [10]. При этом всё чаще встречается устойчивость микроорганизмов, вызывающих внутрибольничные инфекции, к препаратам данной группы [11]. Самыми распространенными причинами нозокомиальных инфекций считаются бактерии *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacteriaceae* и др. [9].

Нерациональное и частое использование антибиотиков стимулирует эволюцию и распространение новых способов резистентности особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии [12]. Продукция β -лактамаз признана самым распространенным механизмом защиты микроорганизмов [13]. Важнейшее клиническое и эпидемиологическое значение имеют металло- β -лактамазы (МБЛ), в состав активного центра которых входят ионы металла

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика β -лактамаз грамотрицательных бактерий

Проблема антибиотикорезистентности появилась сразу после начала использования антибиотиков в 1940-х гг. Первая β -лактамаза – пенициллиназа, - была обнаружена у *Staphylococcus aureus* [20]. В 1965 году был описан новый класс β -лактамаз, найденных в бактериях *Bacillus cereus* и отличающихся ингибированием хелатором ионов металлов этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), что ознаменовало открытие первой металло- β -лактамазы [21]. В течение следующих двух десятилетий МБЛ не считались клинической проблемой и работы по их изучению практически не проводились. Однако в конце 1980-х гг. с выявлением МБЛ у клинически важных видов микроорганизмов, ситуация изменилась [22]. В конце XX века уже проводились исследования с микроорганизмами, которые были устойчивы ко всем группам антибиотиков [23]. На сегодняшний день основная роль в этиологии нозокомиальных инфекций принадлежит грамотрицательным микроорганизмам, среди которых в большинстве лечебно-профилактических учреждений преобладают представители семейств *Pseudomonas*, *Acinetobacter* sp, *Enterobacteriaceae* и др. [9]. Все они являются продуцентами МБЛ [23].

1.1.1 Классификация β -лактамаз

Единство β -лактамаз обусловлено способностью гидролизовать β -лактамы антибиотики. Факторы, определяющие вариативность ферментов данной группы:

- Специфичный выбор мишени, или гидролиз определённого вида антибиотиков из групп пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов;
- Подавление гидролитической активности допущенными к использованию в терапии веществами (ингибиторы);

- Происхождение и расположение генов, которые кодируют антибиотикорезистентность (хромосома или плаزمид) [7]. За счет плазмидной локализации возможен перенос генов даже между разными родами микроорганизмов [24]. Хромосомная локализация позволяет распространяться резистентным клонам. Специфичные для каждого конкретного вида микроорганизмов β -лактамазы кодируются хромосомно;

- Вид транскрибирования (синтеза) генов. Индуцибельная экспрессия отличается увеличивающимся производством фермента в период взаимодействия пары «антибиотик-фермент». Конститутивная экспрессия характеризуется продукцией энзима с постоянной скоростью;

- Структура последовательностей аминокислот;

- Каталитические и биохимические особенности [7].

Перечисленные характеристики послужили основой создания различных систем классификации β -лактамаз. Основное разветвление основано на механизме действия ферментов и особенностям строения активной области, благодаря чему выделяют сериновые и металло-ферменты. В классификации сериновых лактамаз описано четыре молекулярных класса: А, С и D, в то время как среди металлосодержащих ферментов выделяется только один класс В, отличающийся содержанием в активной области не серина, как у сериновых бета-лактамаз, а одного или двух атомов цинка. В основе деления на классы лежат такие характеристика, как: степень аминокислотного родства, содержание постоянных участков, структура активного центра [23; 25]. Более расширенная классификация с разделением на группы, подгруппы, типы и взаимодействие с субстратом представлена в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Классификация β -лактамаз [19; 23; 26]

Функциональная группа	Подгруппа	Молекулярный класс	Основной субстрат	Особенности β -лактамаз
1	1	С	Все виды β -лактамных антибиотиков, кроме карбапенемов	AmpC

Окончание таблицы 1.1

Функциональная группа	Подгруппа	Молекулярный класс	Основной субстрат	Особенности β -лактамаз
2	2a	A	Пенициллины	Пенициллиназы грам+ бактерий
	2b	A	Пенициллины, цефалоспорины	Ферменты широкого спектра (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2be	A	Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы	БЛРС
	2br	A	Пенициллины	ATEM, SHV; ингибитор-устойчивые
	2c	A	Пенициллины, карбенициллин	Ферменты PSE типа
	2e	A	Цефалоспорины	Индуцибельные цефалоспорины из <i>Proteus spp.</i>
	2f	A	Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	Сериновые карбапенемазы
	2d	D	Пенициллины, карбапенемы, оксациллин	Ферменты ОХА типа (оксаллиназы), активные в отношении оксациллина
3	3a, 3b, 3c	B (B1, B2, B3)	Большинство β -лактамов, включая карбапены	МБЛ, ингибируются ЭДТА. IMP-1, IMP-2, IMP-4-IMP-11, IMP-13-IMP-16, IMP-18-IMP-22, IMP-25, IMP-26, IMP-29-IMP-31, IMP-33, IMP-35, IMP-37, IMP-40, IMP41, IMP-43- IMP-45, IMP-48, VIM-1-VIM-11, VIM-13-VIM-18, VIM-20, VIM-28, VIM-30, VIM-36-VIM-38, VIM-43, SPM-1, GIM-1, NDM-1, AIM-1, SIM-1, FIM-1
4	Не известно	-	Пенициллины	Ферменты, принадлежность которых не классифицирована

Большое внимание сегодня уделяется исследованию β -лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), которые являются мутантными формами имеющихся ферментов [25]. Перечень антибиотиков, которые могут быть дезактивированы энзимами, расширяется, так как замена даже небольшого числа аминокислот вызывает устойчивые изменения в геноме и приводит к изменению структуры фермента [27]. БЛРС создают глобальную проблему, особенно для госпитальных пациентов вследствие высокого риска неэффективности лечения [7].

1.1.1.1 Свойства металло- β -лактамаз

МБЛ являются представителями распространенного семейства металлгидролаз. Эти ферменты обнаруживаются преимущественно у прокариота и действуют на ряд субстратов от низкомолекулярных соединений (фосфонаты, тиоэфиры) до нуклеиновых кислот, а у высших эукариот участвуют в процессах репарации ДНК и процессинга РНК [26]. Также они могут выступать в качестве катализаторов химических реакций, например, окислительно-восстановительных при детоксикации сероводорода.

Трехмерная структура МБЛ представляет собой четырехслойный каркас по типу «сэндвич» $\alpha\beta/\beta\alpha$, внутри которого расположены ионы цинка Zn^{2+} , далее расположены аминокислотные слои « $\beta\beta$ », а по бокам - две аминокислотные α -спирали, как показано на рисунке 1.1.

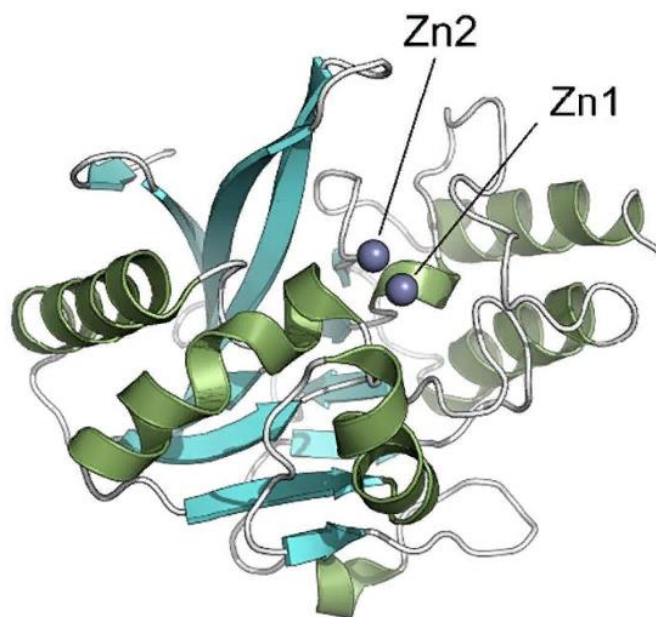


Рисунок 1.1 – Трехмерная структура металло- β -лактамаз на примере NDM-1 [26]

Активный центр металло- β -лактамаз содержит либо один, либо два иона Zn^{2+} , который координируется с аминокислотами, лигирующими ионы металла, и молекулами поляризованной воды, необходимыми для гидролиза β -лактамных антибиотиков [28]. МБЛ имеют длину 240-310 аминокислот, из которых от 17 до 30 могут выступать в роли сигнальных пептидов и удаляться из зрелой формы белка [29]. Идентичность такого широкого спектра последовательностей составляет до 25% между некоторыми ферментами [30].

Все МБЛ гидролизуют имипенем (антибиотик группы карбапеномов широкого спектра действия), но скорость гидролиза может коррелировать в зависимости от устойчивости бактерий к карбапенемам. На основе гидролиза имипенемов и других β -лактамов основана одна из классификаций МБЛ. Таким образом, ферменты типа 3a обладают широким спектром активности; 3b - преимущественно гидролизуют карбапенемы, а ферменты типа 3c плохо гидролизуют карбапенемы по сравнению с другими β -лактамными субстратами. Тем не менее, все ферменты молекулярного класса В обладают

характерным признаком: ингибируются ЭДТА, а также другими хелатирующими агентами двухвалентных катионов, не ингибируются инактиваторами сериновых β -лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам, авиабактам) [15; 31].

Микроорганизмы благодаря естественным возможностям и локализации нужных генов в своем генетическом аппарате способны вырабатывать ферменты β -лактамазного типа. В таком случае говорят о хромосомной локализации генов и природной способности к резистентности. Хромосомные ферменты в составе бактерий были всегда, в том числе и до появления антибиотикотерапии, но широкое применение антибиотиков привело к селекции и появлению большого количества устойчивых штаммов. Такие β -лактамазы являются видоспецифичными и участвуют в метаболизме микробной клетки и ее защите от действия ферментов, вырабатываемых в природных условиях грибами [32].

В случае вхождения кодирующих генов в структуру плазмид, способных передаваться от одной клетки к другой в процессе конъюгации, или в состав перемещающихся генетических элементов, таких как бактериофаг, транспозон, интегрон, локализация генетического материала считается плазмидной [33]. Распространение и передача генетической информации возможно даже среди бактерий, которые не имеют близких родственных связей, например, среди бактерий разных родов. В этом участвуют такие мобильные генетические элементы, как транспозоны. А интегроны располагаются на кассетных геномах и могут состоять из одного гена или одного рекомбинантного сайта [25]. При этом осуществляется транспортировка внехромосомной ДНК, передача генов, отвечающих за антибиотикорезистентность. В процессе слияния клеток происходит передача генетического материала, заключенного в плазмиду, и таким образом начинается осуществление процесса приобретенной резистентности к антибиотикам [33].

Однако клинически значимые МБЛ могут кодироваться и в бактериальной хромосоме и в мобильных генетических элементах. Это,

например, такие представители как: VIMs (Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase), IMP (Imipenemase) и NDMs (New Delhi Metallo- β -lactamase), которые активно распространяются среди *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacteriaceae*. Именно эти металло- β -лактамазы способны гидролизовать широкий спектр субстратов, включая не только карбапенемы, но и пенициллины и цефалоспорины последнего поколения. Тем не менее за счет коэкспрессии с серин- β -лактамазами возможно снижение чувствительности бактерий к азтреонаму [34; 35].

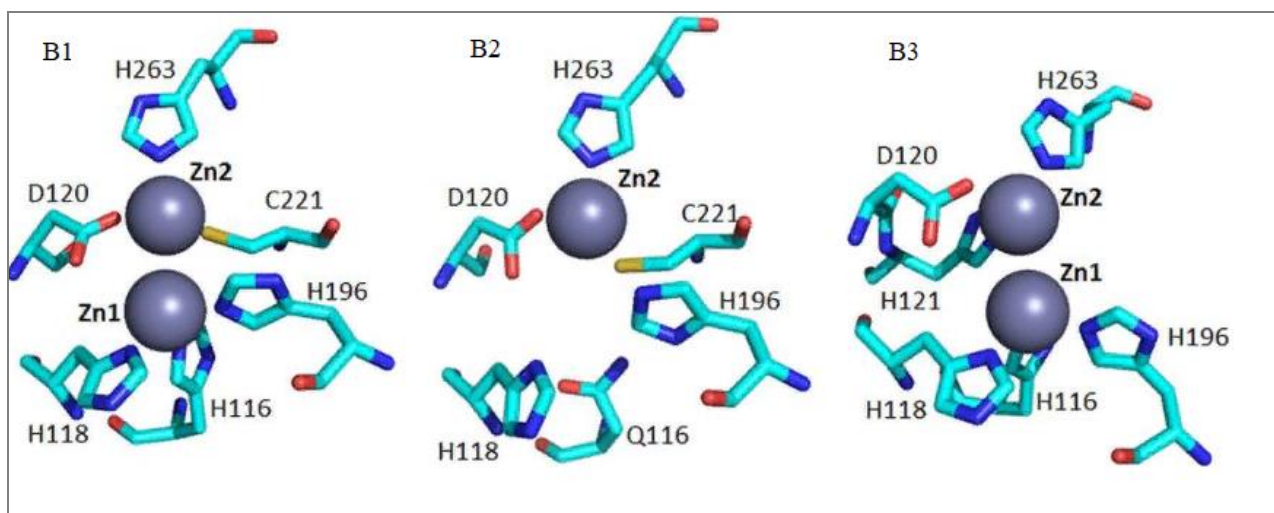
На основании сходства последовательностей и координации цинка в молекулярном классе В β -лактамаз выделяют три подкласса: В1, В2 и В3. Идентичность последовательностей между ферментами подклассов В1 и В2 варьирует от 14 до 24%, в то время как между В1-В3 и В2-В3 – от 2 до 14% [29].

Ферменты подкласса В1, наиболее клинически важные, имеют примерно 23% идентичности аминокислотных последовательностей. Они обладают двухъядерным цинковым центром, включающим три гистидина (His-His-His), – обозначают металлическим сайтом Zn1, и один цистеин (Cys-Hys-Asp) – Zn2. В1 включает в себя важнейших представителей: IMP, VIM, GIM, SPM и др.. Подкласс В2 включает те ферменты, которые содержат аспарагин вместо гистидина в первом положении основного направления связывания цинка, в результате чего образуется моонуклеарный фермент, в котором занят только сайт Zn2. К данному подклассу относятся ферменты: SphA, SFH-1, ImiS. В ферментах В3 (L1, AIM-1, POM-1 и др.) Zn2 координирующий цистеин заменяется дополнительным остатком цистеина, но оба иона металла при этом сохраняются. включает L1 является единственным представителем типа В3 (подкласс 3a), имеет структурную форму тетрамера [26; 36].

В двухъядерных энзимах (В1 и В3) ориентация цинка регулируется молекулами H₂O. Одна из молекул воды служит для мостиковых связей двух ионов цинка, вторая («апикальная» вода) связывается с Zn2. Геометрическая

структура Zn1 обычно представляет из себя тетраэдр, а Zn2 - тригональную бипирамиду или искаженную квадрат-пирамиду [26].

На рисунке 1.2 представлена схематическая иллюстрация активных центров металло- β -лактамаз B1, B2 и B3.



B1 – остатки хелатора цинка активного центра для фермента CcrA подкласса B1, B2 – остатки, связывающие цинк активного центра для фермента CphA подкласса B2, B3 – цинксвязывающие остатки активного сайта для фермента L1 подкласса B3

Рисунок 1.2 – Схематическая иллюстрация аминокислотных остатков, связывающих цинк в активных центрах металло- β -лактамаз B1, B2 и B3 [35]

Цинк необходим для фермента в качестве кофактора [37]. МБЛ функционируют *in vivo* только с цинком, но *in vitro* значительная активность наблюдается с другими ионами металлов, включая Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) и Mn (II) [29]. Сайт Zn1, обычно называемый 3Н, содержит три гистидина (His116, His118 и His196), в то время как лиганды для сайта Zn2 (DCH) включают Asp120, Cys221 и His263. Остатки лиганда цинка в обоих сайтах строго сохраняются среди ферментов B1. Однако эти мотивы связывания цинка вокруг активного центра могут различаться в других подклассах МБЛ B1 (цинковые лиганды в H116-H118-H196 и D120-C221-H263), B2 (N116-H118-

H196 и D120-C221-H263) или среди ферментов В3 (H/G116-H118-H196 и D120-H121-H262). Расхождение аминокислотных последовательностей подклассов влияет на различие в каталитических свойствах ферментов. Например, ферменты В1 и В3 наиболее активны с двумя ионами цинка (Zn1 и Zn2), связанными в активном центре, в то время как связывание второго цинка в ферментах В2 ингибирует катализ. Подклассы В1 и В3 имеют широкий спектр субстратного профиля, который включает пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, в то время как ферменты В2 демонстрируют узкий профиль, который включает карбапенемы [35]. В настоящее время процесс инактивации антибиотиков действием ферментов представляет огромный интерес для фундаментальных исследователей. Одна из причин заинтересованности и в то же время важности получаемых результатов является такая особенность МБЛ, как способность изменять металл активного центра на другие ионы (кобальт, кадмий), которые являются при этом спектроскопически более выраженными и позволяют сохранять способность гидролиза антибиотиков ферментом. В следствие чего существует разнообразие ферментов даже в пределах одного подкласса, что усложняет процесс идентификации наиболее характерных особенностей распада β -лактамов [38].

Хромосомное кодирование металло- β -лактамаз происходит главным образом в бактериях окружающей среды или условно-патогенных микроорганизмах (например, *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus anthracis*) [34]. Хромосомно-кодируемые МБЛ часто регулируются совместно с сериновыми β -лактамазами. К примеру, *Aeromonas veronii* и *Aeromonas hydrophila* продуцируют три β -лактамазы: пенициллиназу, цефалоспориноазу и МБЛ, при отборе дерепрессированных β -лактамрезистентных мутантов ферменты подвергаются сверхэкспрессии. Аналогичное явление наблюдается и у бактерий *S.maltophilia*, высокий уровень резистентности к β -лактамам у которых обусловлен сверхэкспрессией L1 МБЛ. Эта дерепрессия протекает с частотой от 10^5 - 10^7 , в том числе *in vivo* при терапии β -лактамами [36].

1.1.1.2 Свойства карбапенемаз

На сегодняшний день самыми действенными препаратами, борющимися с внутрибольничными инфекциями, протекающими в тяжелой форме, считаются карбапенемы (имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем). Они являются антибиотиками резерва, то есть применяются в случае неэффективности лечения цефалоспоридами младших поколений. Они отличаются рядом особенностей, в частности: действие на большой диапазон патогенов, высокий уровень безопасности, высокие фармакинетические параметры и также более выраженная устойчивость к гидролизующему действию бактериальных β -лактамаз по сравнению с остальными β -лактамами. Гибель бактерий в результате действия карбапенемов обусловлена сбоем в синтезе клеточной стенки микроорганизмов. Они высокоактивны в отношении большинства грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Штаммы *P.aeruginosa* первоначально чувствительны, но в процессе применения карбапенемов отмечено проявление нарастающей резистентности в отношении антибиотиков. Карбапенемы относительно слабо действуют на *V.cerecia*, *S.maltophilia*, а в отношении спорообразующих и неспорообразующих анаэробов, напротив, наблюдается высокая активность. Вторичная устойчивость микроорганизмов к карбапенемам развивается редко, за исключением *P.aeruginosa* [25].

Карбапенемазы – это ферменты бактерий, которые гидролизуют большинство антибиотиков, имеющих в своем составе бета-лактамное кольцо. Они принадлежат к классам А, В и С β -лактамаз [25]. В конце 80-х гг. XX века в Японии была открыта первая в мире карбапенемаза класса В. Она была обнаружена у бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и имела локализацию генетического материала на плазмиде [39]. Решающим фактором, указывающим на серьезность проблемы резистентности, можно считать широкое распространение карбапенемаз среди патогенов *Enterobacteriaceae* [40]. Продуцирующие карбапенемазу *Enterobacteriaceae* вызывают особую

озабоченность и эпидемиологическое значение, поскольку гены карбапенемазы часто располагаются на транспозонах, интегронах и бактериофагах, что приводит к активному переносу плазмид между бактериальными штаммами, видами и родами, и провоцирует возникновение вспышек больничных инфекций [41]. Сегодня важное значение принадлежит ферментам типов VIM, IMP, NDM, последние из которых показывают тенденцию к повсеместному распространению по всему миру [40]. В первый раз генетический материал у ферментов NDM-типа был описан у *K.pneumoniae* в 2008 г, а сегодня их гены обнаружены уже у патогенов *Enterobacteriaceae*, а также у *P.aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* Структура NDM карбапенемазы представлена на рисунке 1.1.

Полученные актуальные данные свидетельствуют, что по сравнению с другими детерминантами резистентности распространение наиболее успешных карбапенемаз происходит гораздо быстрее. Кроме того, уже сейчас появляются факты выхода карбапенемаз во внебольничную среду. Для продуцентов карбапенемаз кроме устойчивости практически ко всем β -лактамам характерна высокая частота устойчивости к антибиотикам других групп, например, к аминогликозидам и фторхинолонам [8].

Серьезность распространения карбапенемаз заключается еще и в том, что ингибиторы сериновых β -лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам, авиабактам) не активны в отношении МБЛ. При этом, не смотря на обширные исследования, ни один ингибитор МБЛ не приблизился к клиническому использованию совместно с антибиотиками. Разработка инактиваторов металло- β -лактамаз сосредоточена в основном на соединениях, которые связывают и/или хелатируют ионы цинка активного центра [42]. Природное соединение «aspergillomarasmine A» ингибирует МБЛ NDM-1 и VIM-2 путем хелатирования и удаления активных центров ионов цинка. Кроме того, был показан эффект данного соединения против NDM-1-экспрессирующего *K.pneumoniae* на мышах. Ингибиторы, которые сильно связываются с активным центром ионов цинка, включают соединения на основе

тиолов, такие как бистиазолидины - небольшие бициклические соединения, которые эффективны против МБЛ В1, В2 и В3. Фосфонатсодержащие соединения (6-фосфонометилпиридин-2-карбоксилаты) также могут *in vitro* ингибировать В1 и В3 МБЛ путем взаимодействия с металлическим центром ди-цинка с константами ингибирования в наномолярном диапазоне. На сегодняшний день наиболее перспективными ингибиторами МБЛ являются бициклические боронаты. Это соединения, которые ингибируют МБЛ, имитируя тетраэдрический оксианион, образующийся при гидролизе β -лактама. Их активность распространяется на NDM-1 и другие ферменты В1 [26]. При этом, судя по анализу научно-исследовательских и статистических данных самым часто используемым ингибитором *in vitro* является ЭДТА.

1.1.1.3 Свойства β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС)

Бета-лактамазы расширенного спектра – это группа ферментов, которые способны инактивировать большую часть антибиотиков групп пенициллинов и цефалоспоринов. Их гидролитическая активность в частности проявляется в отношении цефуроксима, цефалоспоринов третьего и четвертого поколения и азтреонама. Тем не менее есть и антимикробные препараты (цефамицины и карбапенемы), которые способны противостоять действию БЛРС [43; 44]. История исследований БЛРС начинается в 1980-х гг после первого обнаружения. На сегодняшний день изучено уже более 300 БЛРС. Выявлена продукция данных ферментов у грамотрицательных бактерий, таких как *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. БЛРС способны разрушать цефалоспорины расширенного спектра и моноциклические бета-лактамные антибиотики. Они подвержены ингибирующему действию со клавулановой кислоты, сульбактама, тазобактама. Стремительному распространению БЛРС способствует локализация генома ферментов на плазмидах, что в свою очередь приводит к затруднительной диагностике болезни, а также длительному и не всегда обоснованному выбору

методов противомикробной терапии. Итогом является ухудшающаяся из года в год статистика возрастания случаев подбора неэффективного лечения, при этом временные и экономические затраты на такое лечение также значительно растут. В связи с чем очевидна потребность осуществления в лабораторных условиях результативной диагностики продукции БЛРС грамотрицательными микроорганизмами [23].

Продукция БЛРС классов А, С и D подавляется такими ингибиторами, как клавулановая кислота и тазобактам, - признак, который может быть использован для фенотипического обнаружения продукции БЛРС среди бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [45].

Наиболее распространенными во всем мире являются ферменты типов SHV, TEM и CTX-M [46]. В БЛРС, происходящих от TEM и SHV, замещено несколько аминокислотных остатков, в большей степени в активных центрах ферментов.

Пенициллиназа TEM-1 известна как продукт гена *bla*, который скрепляется с плазмидами типа R [47]. TEM- ферменты распространены у бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и многих другим грамотрицательных бактерий [48]. SHV-1-ферменты первоначально возникли от пенициллиназы. Подтверждает этот факт схожесть последовательности аминокислот этих двух видов ферментов (около 90%) [47]. TEM и SHV-1 ферменты играют важную роль в медицинской практике по ряду своих особенностей:

- ферменты инактивируют действие цефалоспоринов I - III поколения;
- не способны инактивировать антибиотики групп карбапенемов и цефамицинов;
- могут быть инактивированы некоторыми ингибирующими веществами, например, тазобактам (при этом не чувствительны к клавулановой кислоте и сульбактаму);
- гены, кодирующие резистентность, располагаются на плазмидах [48].

В литературных источниках также отмечается, что эффективность гидролиза некоторых представителей их ферментов TEM и SHV-1 несколько

ниже, чем у ферментов, на основе которых они мутировали. Бактерии, продуцирующие такие энзимы, могут быть либо полностью резистенты к некоторым бета-лактамам, либо частично резистенты к цефалоспорином I и II поколений, либо вовсе быть подвержены гидролизу со стороны цефалоспоринов III и IV поколений [48].

БЛРС типа СТХ-М по данным первоначальных исследований обладают гидролитической активностью в отношении цефотаксима. Они также могут гидролизовать цефтиофур и цефхиноме, ветеринарные цефалоспорины широкого спектра действия, а также цефтазидим и цетриаксон. С 2000-х данные ферменты стали более распространенными в мире в сравнении БЛРС типов TEM и SHV [49]. На период 2017 года было описано более 190 вариантов БЛРС типа СТХ-М. После появления СТХ-М лактамаз согласно данным мониторинга бактерии *Kluyvera* семейства *Enterobacteraceae* имеют уникальные гены на своей хромосоме, которые кодируют СТХ-М подобные β -лактамазы (KLUA, KLUG, KLUC). Их схожесть достигает 99% [50]. Однако гены данных ферментов кодируются хромосомно, вследствие чего не обладают активностью в отношении цефотаксима, не смотря на наличие внутренних bla_{СТХ-М}-подобных генов [51]. При этом в случае транслокации хромосомных β -лактамазных генов на некоторые плазмиды посредством функции инсерционных последовательностей у бактерий появляется устойчивость к оксиминоцефалоспорином [52].

Помимо трех основных типов БЛРС значительно распространены такие типы как GES-1, VEB-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, OXA-10. Эти ферменты также имеют остаток серина в активном центре. β -лактамазы GES-типа и OXA-типа у *Enterobacteriaceae* обладают карбапенемазной активностью, при этом, например, аминокислотная идентичность OXA-10 БЛРС и OXA-48 карбапенемазой составляет всего 44% [49].

Активность БЛРС эффективно блокируется клавулановой кислотой, которая связывается с остатком серина в активном центре фермента, образуя стабильный ковалентный ацил-промежуточный продукт. В связи с чем

восстановление активности некоторых β -лактамов, например, цефподоксим и цефотаксим в присутствии данного ингибитора является показателем продукции БЛРС. Однако ингибирующая активность сульбактама в отношении БЛРС типа СТХ-М несколько слабее, чем у клавулановой кислоты и тазобактама. Эта характеристика также важна для дискриминации продуцентов БЛРС типа СТХ-М от продуцентов БЛРС, полученных из TEM и SHV, при лабораторном тестировании [49; 53].

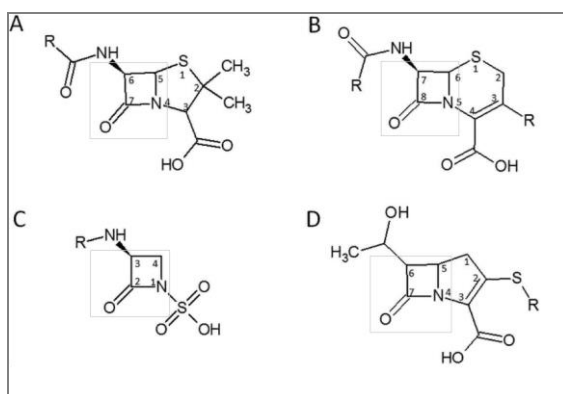
Антибиотикорезистентные бактерии, колонизирующие организм хозяина (человека), в целях сохранности и экономии своих энергетических ресурсов имеют тенденцию исчезать или уменьшаться в количестве в условиях, свободных от противомикробных препаратов. Также считается, что некоторые плазмиды, несущие гены устойчивости, требуют затрат на поддержание плазмид в бактериальных клетках хозяина. Таким образом, продуценты БЛРС имеют тенденцию исчезать в отсутствие антимикробного давления [54]. Однако такие бактерии как *E.coli* приобрели способность сохраняться в кишечнике или мочевыводящих путях человека, колонизировать их в течение длительного времени в условиях отсутствия антимикробного давления [55].

Потенциальным источником генов БЛРС и их продуцентов является окружающая среда, а в частности питьевая вода, особенно в тех регионах, где имеются проблемы в водопроводных и канализационных системах. В питьевую воду продуценты БЛРС попадают из сточных вод и результатов жизнедеятельности человека. Также бактерии колонизируют продукты питания, например, овощи, сырое мясо и молоко [49; 56]. Некоторые из штаммов *E.coli*, продуцирующие БЛРС, являются зоонозными патогенами, то есть передающимися к человеку от животных [49].

1.1.2 Механизм защиты грамотрицательных бактерий с помощью β -лактамаз от воздействия антимикробных препаратов

Пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы это основные и имеющие наибольшую практическую значимость антибиотики, - структурно объединенные по принадлежности к гидрофильной природе и присутствием β -лактамного кольца [23; 57]. Структура β -лактамов представлена на рисунке 1.3.

Пенициллины и цефалоспорины содержат β -лактамное кольцо, слитое с пяти- и шестичленными кольцами, соответственно, которые содержат карбоксильную группу в положениях С-3 и С-4. Монобактамы, напротив, не содержат слитой кольцевой группы и состоят из β -лактамного кольца, связанного с сульфокислотной группой в аналогичном положении карбоксилатной группы, как у пенициллинов и цефалоспоринов. Карбапенемы состоят из β -лактамного кольца, связанного с пенициллиноподобным пятичленным кольцом, которое имеет углерод, заменяющий серу на С-1, а также содержит двойную связь между С-2 и С-3 [35].



А – структура ядра пенициллина. В – структура ядра цефалоспорина. С – структура ядра монобактама. D – структура ядра карбапенема. Серым квадратом обозначено β -лактамное кольцо

Рисунок 1.3 – Структура β -лактамных антибиотиков [35]

Есть два пути взаимодействия антибиотиков, содержащих β -лактамноое кольцо, с микроорганизмами:

- молекулярные соединения антимикробного препарата после проникновения в клетку бактерии, а точнее после попадания в слой, состоящий из мембран и пептидогликана (клеточная стенка) инактивируют один из пенициллин-связывающих пептидов, так называемую транспептидазу, за счет аутолизина. В следствие чего разрушается слой пептидогликана, что вызывает отмирание микробной клетки;

- антимикробный препарат взаимодействует с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ), которые предназначены для защиты клетки от посторонних соединений путем их гидролиза. После начала взаимодействия происходит выгнетание ПСБ из состава клеточной стенки, то есть микроорганизмы теряют свой обычный защитный механизм. В результате происходит гибель микроорганизма. За счет родственных связей бета-лактамноого кольца и пенициллинсвязывающего белка активизируется сцепление молекулы антимикробного препарата с пептидом, которое представляет собой связку ацил-фермент, но при этом происходит разрыв связи углерод-азот в четверичном цикле кольца бета-лактамноого антибиотика. Таким образом, именно структура кольца бета-лактамноых антибиотиков служит обязательным условием для начала активации гидролитической активности антимикробных препаратов против бактерий [23; 58].

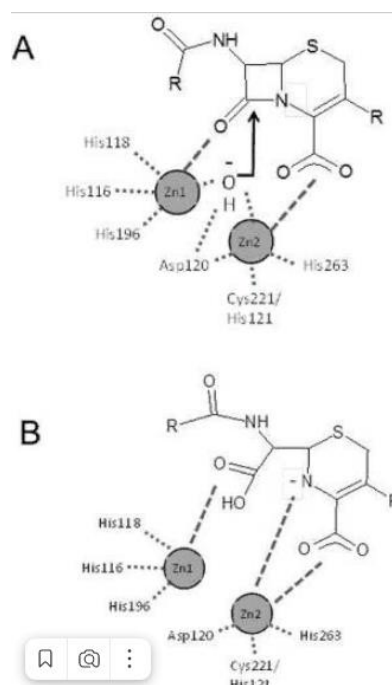
Резистентность бактерий к β -лактамноым антибиотикам возникает по следующим причинам:

- синтез ферментов β -лактамаз, разрушающих антибиотики;
- увеличение уязвимости наружного слоя клеточной стенки микроорганизмов из-за гибели или уменьшения экспрессии белков мембраны, которые служат для транспортировки молекул (порины);
- трансформация строения пенициллинсвязывающих белков;

- механизм эффлюкса, который вызывает активное удаление молекул антимикробного препарата из бактериальной клетки за счет транспортных систем микроорганизма.

Основным механизмом, обеспечивающим устойчивость клинически важных штаммов грамотрицательных бактерий к β -лактамам, является синтез β -лактамаз [35].

Дицинковые МБЛ (В1 и В3) осуществляют гидролиз путем расщепления амидной связи β -лактамного кольца путем атаки гидроксид-иона на карбонильный углерод антибиотика, как показано на рисунке 1.4 [35; 59].



А – Цефалоспориновый субстрат связан с активными центрами путем взаимодействия с Zn1 и Zn2 через карбонильные кислородные и карбоксильные группы, соответственно. Связанный гидроксид позиционируется так, чтобы атаковать карбонильный углерод субстрата. В – Анионный промежуточный продукт связывается в активном центре посредством стабилизирующих взаимодействий, обеспечиваемых Zn2. Взаимодействия показаны пунктирными линиями

Рисунок 1.4 – Схематическая иллюстрация связывания цефалоспорина с активным центром металло- β -лактамазы (подклассы В1 и В3) [35]

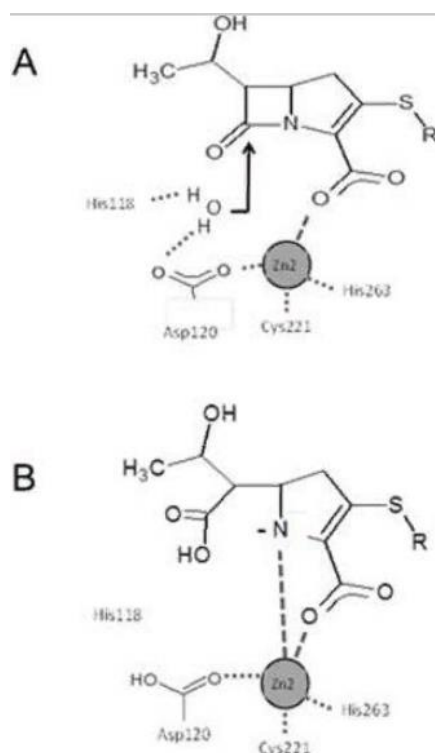
Двухъядерная форма фермента является наиболее каталитически активной и преобладает в физиологических условиях [60]. Ферментативный катализ инициируется связыванием β -лактама в металлическом центре с карбонильным кислородом, взаимодействующим с Zn1, и карбоксильной группой на 5- или 6-членном плавном кольце, связанном с Zn2. Гидроксидный ион стабилизируется Zn1 и Zn2 и находится между металлическими ионами в положении для атаки карбонильного углерода. Нуклеофильная атака гидроксида на карбонильный углерод приводит к образованию тетраэдрального интермедиата [35; 61]. Существуют две возможности для разрушения тетраэдрического промежуточного продукта и расщепления связи C-N: 1) разрыв связи может совпадать с протонированием азота или 2) расщепление может происходить без протонирования азота, приводя к накоплению анионного промежуточного продукта азота [59].

Кинетические исследования фермента подкласса B1 CcrA с хромогенным субстратом нитроцефином показали, что стадией ограничения скорости является протонирование отрицательно заряженного промежуточного продукта азота, поглощающего при 665 нм, который стабилизируется Zn2. Последующие исследования кинетики остановленного потока гидролиза нитроцефина предоставили доказательства наличия промежуточного звена в подклассах B1 NDM-1 и B3 L1, но не в ферментах BcII или Bla2. Таким образом, результаты показывают, что относительно небольшие различия в активных центрах дицинковых МБЛ могут влиять на катализ таким образом, что либо расщепление связи C-N, либо последующее протонирование анионного азота ограничивают скорость в зависимости от фермента и субстрата [35].

При исследовании фермента NDM-1 была выявлена расщепленная связь C-N и N-1 в координатной связи с Zn2 (см. рисунок 1.3). Кроме того, оксигены C-3 карбоксилатной группы были связаны Lys224 и Zn2, соответственно. Установлено, что карбоксилат C-7, образованный гидролизом связи C-N, взаимодействует с Zn1 и боковой цепью Asn233. Структура согласуется с ранее предложенными механизмами, когда гидроксид стабилизируется Zn1 и Zn2 для

атаки на карбонильный углерод с последующим C-N отщеплением и протонированием азота. Имеется предположение, что источником протона может быть молекула воды, связанная с Zn²⁺ в апоферменте, или объемная вода, поступающая в активный центр, а сам протон из карбоксилата служит для протонирования азота либо одновременно, либо после расщепления C-N-связи [62].

Металло- β -лактамазы подкласса B2 содержат один цинк в активном центре и демонстрируют узкий спектр субстратов, в основном ориентированный исключительно на гидролиз карбапенема. На рисунке 1.5 представлен механизм ферментативной реакции для биапенема.



А – карбапенем связывается с активным центром фермента. Вода активного центра связывается с Asp120 и His118 и активируется для атаки на карбонильный углерод карбапенема. В – анионный промежуточный продукт стабилизируется в активном центре путем взаимодействия с ионом Zn²⁺

Рисунок 1.5 – Механизм гидролиза карбапенема (биапенема) ферментом подкласса B2 [35]

Предложенные механизмы имеют некоторые отличия, но общими чертами являются взаимодействие Zn^{2+} и консервативного остатка Lys224 с карбоксильной группой C-3 карбапенема. Кроме того, молекула воды удерживается путем взаимодействия с остатками His 118 и Asp120, и один из них может действовать как общее основание для активации воды для атаки на карбонильный углерод C-7 субстрата. Расщепление связи C-N происходит с накоплением анионного азота, стабилизированного Zn^{2+} . При этом протонирование азота происходит через молекулу воды, связанную His118 и Asp120, или через воду, связанную с Zn^{2+} [35; 63].

Важную роль в ферментативном катализе играют конформационные изменения. Одним из типов изменений является замыкание гибкой петли на связанных с ферментом субстратах. В таком случае происходит изоляция субстрата от воды и снижение эффективной диэлектрической проницаемости активного центра, что может привести к увеличению стабилизации переходного состояния от усиленных электростатических взаимодействий с аминокислотами активного центра [64]. Подклассы B1 и B3 также содержат петлевую структуру вблизи активного центра (петля L3), которая претерпевает конформационные изменения и закрывается над связанным субстратом как с применением ингибитора, так и без него.

Детальное понимание механизма катализа металл- β -лактамазами, включая знание стадий ограничения скорости и химической природы промежуточных продуктов реакции для различных подклассов ферментов играет важную роль при проектировании ингибиторов в том числе необходимых и для лабораторной детекции МБЛ [35].

1.2 Методы детекции металло- β -лактамаз, β -лактамаз расширенного спектра

В связи с опасностью широкого распространения антибиотикорезистентности и в частности продуцентов β -лактамаз, в том числе

МБЛ и БЛРС, появилась потребность включения в деятельность микробиологических клинических лабораторий программ микробиологического наблюдения, сбора данных и анализа, целью которых является обнаружение и расшифровка фундаментальных основ устойчивости среди внутрибольничных грамотрицательных бактерий. Мониторинг состоит из обнаружения энзимов у устойчивых к бета-лактамам антибиотикам штаммов по присущим им внешним и внутренним свойствам, либо обладающим уменьшенным восприятием к ним. Такие исследования помогают получить ценную информацию в лаборатории микробиологии больничного учреждения еще до проведения молекулярно-генетических исследований, которые обычно осуществляются в референсных лабораториях [25; 65].

Способы детекции металло-бета-лактамаз строятся на выявлении взаимодействия в паре: антибиотик и металлохелат. Антимикробные препараты, такие как имипенем, меропенем, цефтазидим, являются сустратом для ферментов. Металлорганические соединения (ингибиторы) объединяют Zn^{2+} из активной области энзимов и угнетают способность последних инактивировать субстрат. Часто используемый ингибитор в лабораторном мониторинге – это этилендиаминтетрауксусная кислота. Кроме нее применяются: пиридин-2,6-дикарбоновая кислота, тиолактическая кислота и часть остальных меркаптанов [66].

Самыми применяемыми, простыми и эффективными методами фенотипической детекции МБЛ и БЛРС являются:

- диско-диффузионный метод;
- метод двойных дисков;
- метод серийных разведений в бульоне;
- метод комбинированных дисков;
- готовые тест-системы, в основе действия которых лежат биохимические взаимодействия [12; 66].

Указанные способы обнаружения ферментов помогают исследователю лишь детектировать β -лактамазы, однако, дать точное понимание конкретного

представителя из огромного кластера биологических соединений и узко классифицировать соединение, придающее устойчивость, не могут. В связи с вышеуказанным выявление и исследование МБЛ и БЛРС более актуально с применением современных методов:

- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- секвенирование (анализ генетической цепочки и дезоксирибонуклеиновой кислоты);
- масс-спектрометрия;
- минисеквенирование.

Эти молекулярные и генетические способы выявления ферментов в клинических изолятах в настоящее время набирают популярность. Однако их применение ограничено. Причина этому в основном кроется в нехватке оборудования и дороговизне используемых материалов.

Не менее информативно ценным этапом при проведении детекционных испытаний при анализе антибиотикорезистентности бактерий является определение их видовой принадлежности вплоть до описания конкретного штамма. Выявление схожести микроорганизмов и определение точного штамма в используемых на сегодняшний день микробиологических анализах имеет несколько минусов:

- длительная продолжительность от 2 до 3 суток;
- процедура стандартизации бактериальной суспензии не всегда повторяема на 100%;
- затраты человеческих ресурсов;
- сохранение видовых особенностей бактерий до начала испытаний;
- получаемые данные о микроорганизмах иногда имеют погрешности, не соответствующие действительности [12].

Как уже отмечалось выше, широкой и быстрой распространяемостью владеют имеют такие бактерии как *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и *Enterobacteriae*. Именно представители данных групп грамотрицательных микроорганизмов отличаются интенсивной продукцией карбапенемаз, что при

тестировании отмечается карбапенемной устойчивостью. Для наглядности проводимых этапов тестирования грамотрицательных бактерий на предмет синтеза ферментов ниже представлен рисунок 1.6. Рекомендательный характер носит информация, представленная Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) по включению дополнительных этапов, включающих в себя скрининг на карбапенемазы (касательно *Enterobacteriae*) с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) для меропенема, имипенема, эртапенема >2 мг/л. Дополнительный этап проводится в случае выявления резистентности хотя бы к одному из цефалоспоринов III поколения [65].

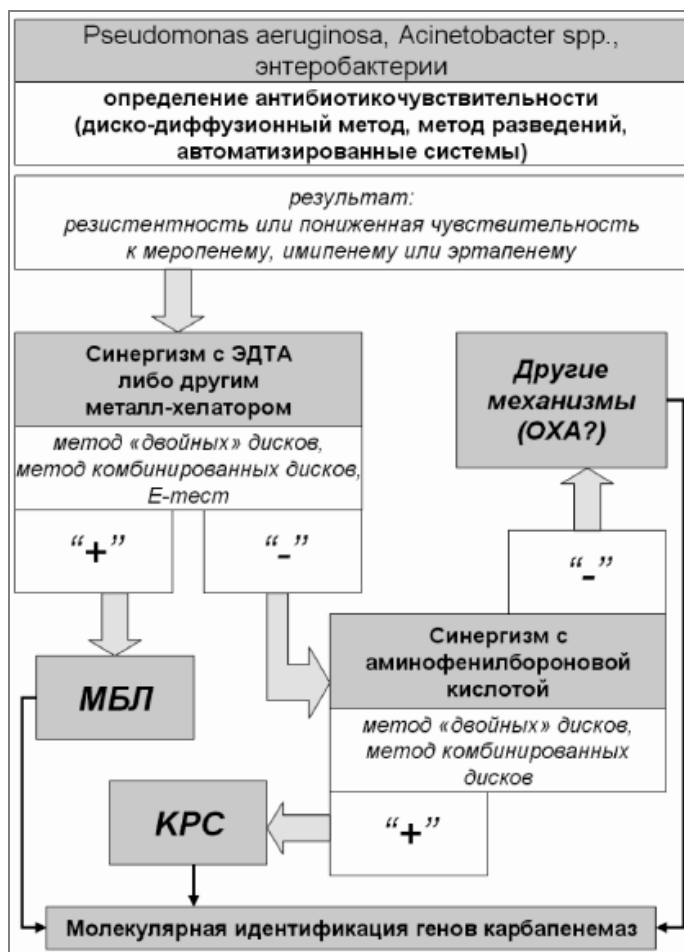


Рисунок 1.6 – Схема этапов тестирования при обнаружении карбапенемаз у грамотрицательных бактерий [65]

Клиническая практика имеет трудности в детекции БЛРС. В микробиологических испытаниях, направленных на идентификацию микроорганизмов-патогенов, используются разнообразные детектирующие методы с широким спектром антибиотиков, с различными вариациями ингибирующих веществ. При этом происходит выявление МИК антимикробного препарата, которая приводит к лизису бактериальных клеток в испытуемой культуре. Такие способы детекции считаются достаточно продолжительными и не всегда достоверными, в виду вариабельности интерпретации результатов. Фенотипические методы детекции к тому же не гарантируют абсолютно точное определение БЛРС. Еще одним ограничивающим фактором является «эффект инокулюта», в основе проявления которого лежит резкий скачок МИК антибиотика при превышении поесвной дозы патогена. То есть существует прямая зависимость эффективности метода детекции от количества клеток в тестируемой культуре микроорганизмов. На эффективность детекции также влияет то, что имеется ли у микроорганизма выраженная полирезистентность, которая может привести к тому, что, например, БЛРС будут осуществлять гидролиз антимикробного препарата, но при тестировании будут выявлены другие виды ферментов [25].

1.3 Опасность распространения антибиотикорезистентности у бактерий-продуцентов металло- β -лактамаз и β -лактамаз расширенного спектра

Антибиотикорезистентность распространилась особенно быстро во всем мире и в частности в нашей стране в течение последних лет. Её повсеместное распространение коснулось и возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций. Количество последних только увеличивается в том числе из-за применяемых в медицине технологий и методик лечения, что приводит к эволюции способов резистентности у бактерий [67]. Прежде всего, это касается отделений реанимации и интенсивной терапии. Исследователям и врачам важно правильно реагировать на сложившуюся ситуацию, а именно

участвовать в актуализации практических и теоретических знаний по распространению устойчивости среди бактерий. Своевременное обнаружение проблем позволит вносить правки в инструкции по антибиотикотерапии, внедрять и актуализировать методы детекции, а также разрабатывать новые антимикробные препараты с повышенной эффективностью [57].

Анализирование информации по распространению устойчивости среди изолятов имеет ряд факторов, ограничивающих эффективность анализа:

- проблема опасности масштабирования антибиотикоустойчивости является новой для современных исследователей;

- невозможность использования в рутинной практике медицинской микробиологической лаборатории комплексного подхода к тестированию в виду недоступности методов;

- в нашей стране не разработана и, соответственно, не используется нормативная документация, которая могла бы регламентировать как детектирование антибиотикорезистентности, так и осуществление профилактических и противоэпидемических мер;

- полигенность и разнообразие систем, отвечающих за резистентность. Это предполагает поиск новых методов и вариацию имеющихся способов детекции [68].

Основной фактор, из-за которого формируется полирезистентность к МБЛ у представителей грамотрицательных бактерий (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.*, *P. aeruginosa*), заключается в связывании генов, отвечающих за экспрессию МБЛ, с разнообразными детерминантами устойчивости, дальнейшее их распространение и возможная конъюгация за счет плазмидного перемещения. Разработка новых антимикробных препаратов, которые будут обладать способностью оставаться эффективными даже при формирующейся устойчивости, на сегодняшний день продвигается медленными темпами и находится на начальных стадиях, в том числе и в фазе доклинических исследований. Одна фаза, даже стадия подбора молекулы, в обычной фармацевтической практике занимает десятки лет [69]. На основании

вышесказанного можно с большой вероятностью предположить, что в ближайшем будущем МБЛ-продуценты будут иметь глобальный характер в виду опасности и трудноразрешимости связанных с ними проблем.

На сегодняшний день медицинская практика назначения лечения инфекционного заболевания представляет из себя срочное включение в терапию одного или нескольких антибиотиков, которые подавляют рост широкого круга вероятных возбудителей болезней, при чем без идентификации конкретных патогенов. Такая нерациональная терапия является стартовым толчком к прогрессу показателей (в 1,5 – 3 раза) смертности от тяжелых инфекций. При столкновении с неэффективностью антибиотиков отмечают либо факт неверно выбранной терапии, либо резистентность возбудителя, против которого изначально был подобран и применен препарат. В последнем варианте прогноз на благоприятный исход лечения заболевания также не всегда обнадеживающий для носителя инфекции. Это прежде всего связано с удлинением сроков лечения, потребностью в дополнительном подборе и назначении антибиотикотерапии, а также с ростом стоимости лечения [70].

Одной из опасностей, связанной с резистентностью микроорганизмов к антибиотикам, является множественная устойчивость у большого круга грамотрицательных бактерий, продуцирующих БЛРС. Проблемы лечения инфекций, вызванных такими микроорганизмами, имеют причины:

- устойчивость бактерий к пенициллинам и цефалоспорином, что сужает круг возможных для применения антимикробных препаратов;
- сопутствующая множественная устойчивость к другим группам антибиотиков, которые применяются в комплексе при тяжелых инфекциях;
- стремительно увеличивающиеся масштабы зон распространения продуцентов БЛРС, в том числе среди грамотрицательных бактерий;
- сложность детектирования продуцентов БЛРС традиционными микробиологическими методами;

- высокая статистика безрезультативности лечения, вследствие чего осложняется течение инфекции и увеличивается число летальных исходов по сравнению с другими ферментами (не БЛРС);

- высокие экономические издержки, вызванные затратами на дополнительное лечение и более точную диагностику, а также на ведение пациента в больничных условиях.

Еще несколько лет назад против возбудителей, продуцирующих БЛРС и тем самым обладающих высоким уровнем резистентности, были эффективны карбапенемы. Однако сейчас устойчивость микроорганизмов к карбапенемам увеличилась, в том числе за счет металло- β -лактамаз. Тревогу вызывает еще и тот факт, что большая часть МБЛ и карбапенемаз являются приобретенными, то есть их гены кодируются на мобильных генетических элементах и распространяются даже среди неродственных бактерий, вызывая у последних антибиотикорезистентность. Вместе с тем, круг возможных путей лечения инфекций, вызванных карбапенем-устойчивыми штаммами, постоянно сужается. Таким образом, проблемы, связанные с распространением приобретенных карбапенемаз, заключаются в следующем:

- большую угрозу штаммы-носители карбапенемаз, которые в любой момент могут потерять чувствительность к антибиотикам, и как следствие привести к безрезультатной терапии;

- подбор адекватной схемы лечения, что возможно в первую очередь благодаря своевременной диагностике и подбору правильной схемы лечения. Данные мероприятия должны быть осуществлены в очень органичные временные рамки;

- разнообразие ферментов и их распространенность грамотрицательных патогенов, при этом методы их детекции крайне ограничены;

- необходимость мониторинга за β -лактамазами [71].

1.4 Выводы по разделу

Обобщены литературные сведения о видах, свойствах, структуре металло- β -лактамаз, карбапенемаз, β -лактамаз расширенного спектра действия. Описаны механизмы взаимодействия ферментов с антибиотиками, а также методы детекции ферментов. Проанализирована информация по опасности распространения антибиотикорезистентности у бактерий-продуцентов МБЛ и БЛРС.

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись микроорганизмы, выделенные из гнойно-септических ран. Всего было проведено 6701 анализ и из них выделено 3328 микроорганизмов.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Бактериологический посев

Бактериологический посев исследуемого материала на диагностические питательные среды [72].

Видовую идентификацию проводили по биохимическим тестам, изложенным в определителе Берджи и идентификации энтеробактерий [73,74]. Каждому выделенному микроорганизму определяли чувствительность к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом, согласно разработанным стандартам подбора антибактериальных препаратов в зависимости от видовой принадлежности микроорганизмов [75].

2.2.2 Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Исследование антибиотикочувствительности методом ДДМ проводили на чашках Петри с агаризованной средой Мюллера-Хинтона (МХ). Чашки инокулировали суспензией бактерий *E. coli* (0,5 по стандарту МакФарланда) и накладывали на поверхность стандартные диски с антибиотиками: цефтазидим 10; ципрофлоксацин 5; ампициллин 2; цефотаксим 5. После аппликации дисков, чашки Петри помещались в термостат кверху дном и инкубировались при температуре 35°C в течение 24 часов [76].

2.2.3 Метод инактивации карбапенемаз (СИМ-тест)

СИМ-тест заключается в определении ферментативного гидролиза меропенема при инкубации стандартного диска с данным препаратом (нагрузка диска – 10 мкг меропенема) в водной суспензии тестируемого микроорганизма. При последующем помещении этого диска на поверхность МХ-агара, инокулированного стандартным штаммом *Escherichia coli* ATCC 25922, чувствительным к карбапенемам, и инкубации в стандартных условиях, в случае продукции карбапенемаз тестируемым штаммом, зона задержки роста стандартного штамма вокруг диска будет отсутствовать, так как меропенем был полностью разрушен. В противном случае (карбапенемазы отсутствуют), оставшийся в диске меропенем вызовет подавление роста стандартного штамма [77].

2.2.4 Метод выявления металло-бета-лактамаз (МБЛ)

Выявление продукции МБЛ производили методом двойных дисков. Через 5-10 минут после инокуляции суспензией бактерий: *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.*, на поверхность агара накладывали диски с антибактериальным препаратом (АБП): имипинем 10; меропенем 10; цефтазидим и пустой диск в середине – это ЭДТА. Использование двух дисков каждого АБП, расположенных на разном расстоянии от диска с клавулановой кислотой, позволяет повысить эффективность обнаружения МБЛ [78].

2.2.5 Метод определения бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС)

Стандартные фенотипические методы детекции БЛРС основаны на эффекте подавления активности ферментов β -лактамаз в присутствии клавулановой кислоты. Метод «двойных дисков» используют в лабораторной

практике чаще других, поскольку он прост в выполнении и имеет высокую чувствительность и специфичность. Данный метод является вариантом классического диско-диффузионного метода определения чувствительности и позволяет обнаружить продукцию БЛРС по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином напротив диска с клавулановой кислотой. Для повышения чувствительности этого метода следует использовать несколько дисков с разными цефалоспоринами (например, цефтриаксон и цефтазидим), так как разные типы БЛРС могут проявлять различную субстратную специфичность. При выполнении метода «двойных дисков» расстояние между центрами дисков должно быть 20-25 мм, но оно может быть уменьшено до 15 мм или увеличено до 35 мм для изолятов с высоким или низким уровнем резистентности соответственно [79].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изъято с 38 по 45 страницу в связи с авторскими правами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начиная с первых дней XXI века Всемирная организация здравоохранения призывает человечество обратить внимание на такую глобальную угрозу жизни и здоровью населения, как антибиотикорезистентность. Согласно прогнозам ученых, через 30 лет жертвами этой прогрессирующей проблемы будут свыше десятка миллионов человек в год, что по численности, например, сопоставимо с актуальными данными населенности Швеции, или в 15 раз превышает современную статистику. Устойчивость к антибиотикам у инфекционных возбудителей является естественным механизмом защиты, возникшим еще до открытия и использования антимикробных препаратов. Однако с включением последних в рутинную медицинскую практику, а также с тенденцией их бесконтрольного и нерационального применения, бактерии стали наращивать свои внутренние потенциалы борьбы с угрожающими для них факторами. Интенсивное давление на микрофлору, связанное с чрезмерным использованием антибиотиков, приводит к селективному отбору штаммов с лекарственной устойчивостью, иными словами, чем больше практикуется терапия антибиотиками, тем сильнее развивается бактериальная устойчивость к ним.

Особую проблему представляют грамотрицательные бактерии, в том числе *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacteriaceae*, считающиеся нозокомиальными и оппортунистическими патогенами. Эти возбудители являются основной причиной заболеваемости и смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом и находящихся в отделениях интенсивной терапии. Микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacteriaceae* вездесущи и могут быть извлечены из различных больничных поверхностей, инструментов и с участков тела медицинских работников. Инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, трудно поддаются лечению, поскольку большинство изолятов проявляют различную степень устойчивости к самым применяемым на сегодняшний день антибиотикам - бета-лактамам.

Поэтому растет обеспокоенность мирового здравоохранения в связи с появлением у бактерий механизмов, придающих устойчивость к карбапенемам, - антибиотикам резерва, используемым для лечения наиболее тяжелых инфекций.

Бактериальная устойчивость к бета-лактамам антибиотикам формируется разными способами, но главную роль играет продукция β -лактамаз. Лидирующие позиции по гидролизу разных групп антимикробных препаратов занимают металло- β -лактамазы и β -лактамазы расширенного спектра. Всемирное распространение в настоящее время металло- β -лактамаз вызывает большие опасения не только из-за их способности обеспечивать высокий уровень устойчивости, но и потому, что кодирующие их гены расположены на высокомобильных элементах, что облегчает распространение ферментов среди различных видов и родов бактерий. Более того МБЛ не чувствительны к известным терапевтическим ингибиторам β -лактамаз, что при дальнейшем распространении ферментов, вероятно, может привести к клинической катастрофе.

Важно отметить, что среди грамотрицательных бактерий часто развивается множественная лекарственная устойчивость. Следовательно, варианты лечения инфекций, вызванных патогенами из этой группы, сужаются до нескольких антибиотиков, исключая возможность использования терапевтических альтернатив и тем более оптимального варианта лечения. При этом пребывание пациента в больничных условиях становится дорогостоящим и затягивается во времени, но является жизненно необходимым.

В связи с вышеперечисленным становится очевидна необходимость инфекционного контроля за штаммами, которые продуцируют МБЛ. Следует проводить мониторинг бактериальной этиологии и моделей инфекций, чтобы предпринять необходимые шаги для лечения заболеваний, предотвращения развития резистентности, снижения госпитальных приобретенных перекрестных инфекций и получения информации для разработки новых лекарственных средств.

Методы обнаружения МБЛ и БЛРС постоянно совершенствуются, но в то же время традиционно в микробиологических лабораториях медицинских учреждений применяется фенотипическая детекция. Знание вида фермента важно при выборе эмпирической терапии и повышения вероятности удовлетворительного исхода для пациента.

Полученные результаты показали, что среди выделяемых изолятов *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E.coli* и *Acinetobacter* обнаруживается продукция МБЛ, БЛРС и карбапенемазы:

1) ДДМ показал, что бактерии *Klebsiella pneumoniae* проявили резистентность ко всем исследуемым антибиотикам;

2) СИМ-тест показал наличие роста культуры бактерии *E. coli* вокруг диска с меропенемом, что свидетельствует об инаktivации диска меропенема;

3) метод двойных дисков показал положительную реакцию на наличие МБЛ, поскольку образовалась зона подавления роста бактерии *P.aeruginosa* между диском с ЭДТА и дисками с меропенеменом, имипинемом и цефтазидимом, что свидетельствует о присутствии фермента МБЛ.

4) метод двойных дисков показал положительную реакцию на наличие БЛРС, поскольку образовалась зона подавления роста *E.coli* между дисками с клавулановой кислотой и цефотаксимом.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП	Антибактериальный препарат
БЛРС	Бета-лактамазы расширенного спектра
ДДМ	Диско-диффузионный метод
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
МБЛ	Металло-бета-лактамазы
МИК	Минимальная ингибирующая концентрация
МХ	Среда Мюллера-Хинтона
ПСБ	Пенициллинсвязывающие белки
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СИМ	Метод инактивации карбапенемазы (carbapenemase inactivated method)
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Устойчивость к противомикробным препаратам: Информационный бюллетень // Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ): официальный сайт. – 2020. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (дата обращения: 26.04.2022).
2. Онищенко, Г. Г. Борьба с инфекционными болезнями – приоритетная тема председательства Российской Федерации в «группе восьми» в 2006 г. / Г. Г. Онищенко // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2006. – №8. – С. 3–4.
3. Доклад ВОЗ: новые антибиотики не решают проблему резистентности: Новости ООН. Глобальный взгляд. Человеческие судьбы // Организация Объединенных Наций: официальный сайт. – 2021. – URL: <https://news.un.org/ru/story/2021/04/1400972> (дата обращения: 26.04.2022).
4. Злоупотребление антибиотиками приводит к росту смертности от инфекций// Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ): официальный сайт. – 2019. – URL: <https://news.un.org/ru/story/2019/11/1367331> (дата обращения: 26.04.2022).
5. Страчунский, Л. С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей / Л. С. Страчунский. – Москва: МИА, 2009. М.: МИА, 2009. – 448 с.
6. Не дать пандемии COVID-19 привести к катастрофе с УПП // Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Европейское бюро: официальный сайт. – 2020. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/337514/WHO-EURO-2020-1629-41380-56385-rus.pdf> (дата обращения: 26.04.2022).
7. Bush, K. Updated functional classification of beta-lactamases / K. Bush, G. A. Jacoby // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54. – Iss. 3. – P. 969–976.

8. Агеев, В. А. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения / В. А. Агеев, И. В. Лазарева, С. В. Сидоренко // Фарматека для практикующих врачей. – 2015. – № 14. – С. 9–6.
9. Бабяк, А. С. Резистентность микроорганизмов к противомикробным препаратам / А. С. Бабяк, А. В. Полина // Международный студенческий научный вестник. – 2017. – № 6. – С. 11.
10. Сидоренко, С. В. Бета-лактамы антибиотики / С. В. Сидоренко, С. В. Яковлев // РМЖ. – 1997. – № 21. – С. 2.
11. Cornaglia, G. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria / G. Cornaglia, G.M. Rossolini // Clin Microbiol Infect. – 2010. – Vol. 16, Iss. 2 – P. 99–101.
12. Мудрак, Д. Е. Молекулярно-генетические особенности устойчивости к бета-лактамам антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов - возбудителей нозокомиальных инфекций: специальность 03.02.03 «Микробиология», 03.01.03 «Молекулярная биология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мудрак Дарья Евгеньевна; ФГУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора. – Москва, 2010. – 21 с.
13. Bradford, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat / P. A. Bradford // Clin Microbiol Rev. –2001. – Vol. 14. – Iss. 4. – P. 933–951.
14. Walsh, T.R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria / T.R. Walsh // Clin Microbiol Infect. – 2005. – Vol. 11, Iss. 6. – P. 2–9.
15. Biondi, S. Current trends in beta-lactam based beta-lactamases inhibitors / S. Biondi, M. Panunzio, W.L. Qin // Curr Med Chem. – 2011. – Vol. 18, Iss. 27. P. – 4223–4236.

16. Walsh, T. R. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? / T. R. Walsh, M. A. Toleman, L. Poirel, P. Nordmann // *Clinical microbiology reviews*. – 2005. – Vol. 2, Iss. 18. – P. 306–325.
17. Drawz, S. Three decades of beta-lactamase inhibitors / S. Drawz, R. Bonomo // *Clinical microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 23, Iss. 1. – P. 160–201.
18. Paul, M. Combination therapy for carbapenem-resistant gram-negative bacteria / M. Paul, Y. Carmeli, E. Durante-Mangoni, J. W. Mouton, E. Tacconelli, U. Theuretzbacher, C. Mussini, I. Leibovich // *Antimicrob. Chemother.* – 2014. – Vol. 69, Iss. 9. – P. 2305–2309.
19. Бочарова, Ю. А. Молекулярно-генетические механизмы устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам группы карбапенемов: специальность 03.02.03 «Микробиология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Бочарова Юлия Александровна; ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2018. – 178 с.
20. Chambers, H. F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era / H. F. Chambers, F. R. Deleo // *Nat. Rev Microbiol.* – 2009. – Vol. 7. – Iss. 9. – P.629–641.
21. Sabath, L. D. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569 / L. D. Sabath, E. P. Abraham // *Biochemical Journal*. – 1966. – Vol. 98, Iss. 1. – P. 11.
22. Mojica, M. F. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? / M. F. Mojica, R. A. Bonomo, W. Fast // *Current drug targets*. – 2016. – Vol. 17, Iss. 9. – P.1029–1050.
23. Мультипараметрическое определение генов и точечных мутаций в них для идентификации бета-лактамаз / М. Ю. Рубцова, М. М. Уляшова, Т. Т. Бахман, Р. Д. Шмид, А. М. Егоров // *Успехи биологической химии*. – 2010. – Т. 50. – С. 303–348.

24. Миронов, А. Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии: учебное пособие / А. Ю. Миронов, Г. Г. Харсеева, Т. В. Клюкина // ГОУ ВПО РостГМУ. – 2011. – 247 с.
25. Бондаренко, Е. В. Карбапенемазы. Методы обнаружения карбобактериологической лаборатории: информационно-методическое письмо для врачей-бактериологов / Е. В. Бондаренко, В. В. Стребкова ; Департамент здравоохранения Воронежской области, БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1», ГБОУ Воронежский Государственный Медицинский Университет им. Н. Н. Бурденко. – Воронеж, 2017. – 11 с.
26. Tooke, C. L. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century / C. L. Tooke, P. Hinchliffe, E. C. Bragginton, C. K. Colenso, V. Hirvonen, Y. Takebayashi, J. Spencer // *Journal of molecular biology*. – 2019. – Vol. 18, Iss. 431. – P.3472–3500.
27. Богун, Л.В. Резистентность микроорганизмов, обусловленная бета-лактамазами, и способы ее преодоления / Л. В. Богун // *Новости медицины и фармации*. – 2007. – Т. 19. – №227.
28. Salahuddin, P. Structure, Function of Serine and Metallo- β -lactamases and their Inhibitors / P. Salahuddin, A. Kumar, A. U. Khan // *Bentham Science Publishers*. – 2018. – Vol. 19, Iss. 2. – P. 130–144.
29. Karsisiotis, A. I. A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases / A. I. Karsisiotis, C. F. Damblon, G. C. Roberts // *Metallomics*. – 2014. – Vol. 6, Iss. 7. – P. 1181–1197.
30. Garau, G. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases / G. Garau, I. Garcia-Saez, C. Bebrone, C. Anne, P. Mercuri, M. Galleni, J. M. Frere, O. Dideberg // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2004. – Vol. 48. – Iss. 7. – P. 2347–2349.
31. Rasmussen, B. A. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases / B. A. Rasmussen, K. Bush // *Antimicrob. Agents Chemother*. – 1997. – Vol. 41. – Iss. 2. – P. 223-232.

32. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2010. – Vol. 74, Iss. 3. – P. 417–433.
33. Villa, L. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron / L. Villa, C. Pezzella, F. Tosini, P. Visca, A. Petrucca, A. Carattoli // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – Iss. 10. – P. 2911-2914.
34. Llarrull, L. I. Evolution of Metallo- β -lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution María-Rocío Meini / L. I. Llarrull, A. J. Vila // *Antibiotics.* – 2014. – Iss. 3. –P. 285-316.
35. Palzkill, T. Metallo- β -lactamase structure and function / T. Palzkill // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2013. – Vol. 1277. – Iss. 1. – P. 91–104.
36. Riccio, M. L. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny / M. L. Riccio, N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante, G. M. Rossolini // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. – Iss. 5. – P. 1229–1235.
37. Davies, R. B. Metal cofactor requirements of beta-lactamase II / R. B. Davies, E. P. Abraham Metal cofactor requirements of beta-lactamase II // *Biochem. J.* – 1974. – Vol. 143. – Iss. 1. – P. 129–135.
38. Meini, M.R. Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo-beta-lactamases / M. R. Meini, L. I. Llarrull, A. J. Vila // *FEBS Lett.* – 2015. – Vol. 589. – Iss. 22. – P. 3419–3432.
39. Watanabe, M. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Watanabe, S. Iyobe. M. Inoue, S. Mitsuhashi // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35. – Iss. 1. – P. 147–151.
40. Johnson, A.P. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance / A. P.

Johnson, N. J. Woodford // Med. Microbiol. – 2013. – Vol. 62. – Iss. 4. – P. 499–513.

41. Ansari, M. Phenotypic identification, frequency distribution and antibiogram of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in clinical isolates / M. Ansari, T. Munir, N. Saad // J. Coll Physicians Surg Pak. – 2018. – Vol. 28. – Iss. 4. – P. 274–78.

42. Rotondo, C. M. Inhibitors of metallo- β -lactamases / C. Rotondo, G. D. Wright // Curr Opin Microbiol. – 2017. – Vol. 39. – P. 96–105.

43. Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение: версия 2.0 / К. Г. Гиске [и др.]. – 2017.

44. Silago, V. Existence of Multiple ESBL Genes among Phenotypically Confirmed ESBL Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Concurrently Isolated from Clinical, Colonization and Contamination Samples from Neonatal Units at Bugando Medical Center, Mwanza, Tanzania / V. Silago, D. Kovacs, H. Samson [et al] // Antibiotics (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 10. – Iss. 5. – P. 476.

45. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Clinical and Laboratory Standards Institute / CLSI. –2018.

46. Paterson, D. L. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update / D. L. Paterson, R. A. Bonomo // Clinical microbiology reviews. – 2005. – Vol. 18. – Iss. 4. – P. 657–686.

47. Kawamura, K. ESBL-producing *Escherichia coli* and Its Rapid Rise among Healthy People Nagano / K. Kawamura, M. Suzuki, J. Wachino, K. Kimura, Y. Arakawa // Food safety (Tokyo, Japan). – 2017. – Vol. 5. – Iss. 4. – P. 122–155.

48. Характеристика и клиническое значение бета-лактамаз расширенного спектра / А. Г. Березин, О. М. Ромашов, С. В. Яковлев, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. – № 7.

49. Rupp, M. E. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment / M. E. Rupp, P. D. Fey // *Drugs*. – 2003. – Vol. 63. – Iss. 4. – P. 353-365.
50. Poirel, L. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases / L. Poirel, P. Kämpfer, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – Iss. 12. – P. 4038–4040.
51. Decousser, JW. Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens* / J. W. Decousser, L. Poirel, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45. – Iss. 12. – P. 3595–3598.
52. Saladin, M. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals / M. Saladin, V. T. Cao, T. Lambert [et al.] // *FEMS Microbiol Lett*. – 2002. – Vol. 209. – Iss. 2. – P. 161–168.
53. Chen, C.H. Inhibition of β -lactamase by clavulanate / C. H. Chen, O. Herzberg // *Journal of Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 224. – Iss. 4. – P. 1103–1113.
54. Andersson, D. I. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? / D. I. Andersson, D. Hughes // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8. Iss. 4. – P. 260–271.
55. Martinez-Medina, M. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E.coli* strains / M. Martinez-Medina, A. Mora, M. Blanco [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2009. – Vol. 47. – Iss. 12. – P. 3968–3979.
56. De Boeck, H. ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water / H. De Boeck, B. Miwanda, O. Lunguya-Metila [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 18. – Iss. 6. – P. 1019–1020.
57. Шкурат, М. А. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам / М. А. Шкурат, И. О. Покудина, Д. В. Батталов // *Научное*

электронное периодическое издание «Живые и биокосные системы». – 2014. – № 10.

58. Bush, K. New beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors / K. Bush, M. J. Macielag // *Expert Opin Ther Pat.* – 2010. – Vol. 20. – Iss. 10. – P. 1277–1293.

59. Wang, Z. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism / Z. Wang, W. Fast, A. M. Valentine, S. J. Benkovic // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1999. – Vol. 3. – Iss. 5. – P. 614–622.

60. Gonzalez, J.M. Metallo-beta-lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions / J. M. Gonzalez, M. R. Meini, P. E. Tomatis, F. J. M. Martin, J. A. Cricco, A. J. Vila // *Nat. Chem. Biol.* – 2012. – Vol. 8. – Iss. 8. – P. 698-700.

61. Crowder, M. W. Metallo- β -lactamases: Novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria / M. W. Crowder, J. Spencer, A. J. Vila // *Acc. Chem. Res.* – 2006. – Vol. 39. – Iss. 10. P. 721–728.

62. Zhang, H. M. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism / H. M. Zhang, Q. Hao // *Faseb J.* – 2011. – Vol. 25. – Iss. 8. – P. 2574–2582.

63. Garau, G. A metallo- β -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem / G. Garau, C. Bebrone, C. Anne, M. Galleni, J. M. Frere, O. Dideberg // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 345. – Iss. 4. – P. 785–795.

64. Malabanan, M. M. A role for flexible loops in enzyme catalysis / M. M. Malabanan, T. L. Amyes, J. P. Richard // *Curr. Opin. Struc. Biol.* – 2010. – Vol. 20. – Iss. 6. P. 702–710.

65. Тапальский, Д. В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции: клинический обзор / Д. В. Тапальский, В. А. Осипов, С. В. Жаворонок // УО «Гомельский государственный медицинский университет», УО «Белорусский государственный медицинский университет». – 2012. – С. 10–15.

66. Yong, D. Imipenem EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* / D. Yong, K. Lee, J. H. Yum [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – Iss. 10. – P. 3798 – 3801.

67. Изучение распространенности и молекулярных механизмов антибактериальной резистентности у грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в стационарах Москвы и Перми / Д. Е. Мудрак, Л. Н. Икрянникова, С. В. Сидоренко, Е. Н. Ильина // Антибиотики и химиотерапия. – 2007. – Т. 52. – № 7-8. – С. 10–16.

68. Агеевец, А. А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в Санкт-Петербурге : специальность 03.02.03 «Микробиология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Агеевец Владимир Андреевич ; ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций федерального Медико-биологического агентства». – Санкт-Петербург, 2016. – 137 с.

69. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане / М. В. Эйдельштейн, Е. Ю. Склеенова, О. В. Шевченко, Д. В. Тапальский [и др.] // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 2. – С. 132-152.

70. Козлов, Р. С. Современные тенденции антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: что нас ждет дальше? / Р. С. Козлов, О.У. Стецюк, И.В. Андреева // Интенсивная терапия. – 2007. – N4.

71. Калашников Д. С. Хромогенные среды в детекции антибиотикорезистентности: опыт практического применения / Д. С. Калашников // drgtech.ru [сайт]. – 2015. – URL: <https://drgtech.ru/wp-content/uploads/2015/09/Hromogenny-e-sredy-v-deteksii-antibiotiko-ezistentnosti.-Opy-t-prakticheskogo-primeneniya.-2015.pdf> (дата обращения: 12.05.2022).

72. МУ 4.2.2039-05.4.2. Методы контроля, биологические и микробиологические факторы. Техника транспортирования биоматериала в микробиологические лаборатории. Методические указания (утверждены Роспотребнадзором 23.12.2005).

73. Определитель бактерий Берджи. В 2 томах. Т. 1 / под ред. Д. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. / пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. – 9-е изд. – Москва : Мир, 1997. – 800 с.

74. Сиволодский, Е. П. Систематика и идентификация энтеробактерий / Е. П. Сиволодский – 3-е изд., перераб. и доп. – Санкт-Петербург : СПбНИИЭМ им. Пастера, 2011. – 21 с.

75. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: дата введения 2004-03-04. – Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

76. Сухорукова М. В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом / М. В. Сухорукова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15. – №3. – С. 219-229.

77. Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами: методические рекомендации / В. Б. Белобородов, В. Г. Гусаров, А. В. Дехнич [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 53–83.

78. Черкашин Е. А. Исследование распространенности металло-бета-лактамаз в Российской Федерации / Е. А. Черкашин, В. В. Федорчук, Д. В. Иванов, С. В. Сидоренко, В. И. Титков // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2006. – Т. 47. – № 2. – С. 83-86.

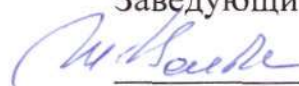
79. Ильина В.Н. Характеристика штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих БЛРС СТХ-М типа, выделенных в кардиохирургическом стационаре / В. Н. Ильина, А. И. Суботовская, А. И. Козырева, Д. С. Сергеевич,

А. Н. Шилова // Клиническая Микробиология и Антимикробная терапия. – 2013. – Т. 15. – №4. – С. 309-314.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«24» июня 2022 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование эффективности применения метода детекции
металло-бета-лактамаз для оценки чувствительности микроорганизмов к
антибактериальным препаратам

06.04.01 Биология

06.04.01.01 микробиология и биотехнология

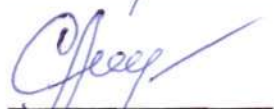
Научный руководитель:



доцент, к.б.н.

Н.И.Сарматова

Выпускник:



А.Н.Ступина

Рецензент:



д.б.н.

О.А.Коленчукова

Красноярск 2022