

Носова Е. С.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь

Титов Л. П.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь

SHV ТИПЫ β -ЛАКТАМАЗ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA SPP*

Одним из ведущих механизмов резистентности клинических штаммов к β -лактамам антибиотикам является продукция ферментов β -лактамаз. Клинически значимые β -лактамазы относятся к молекулярным классам А и С. Бета-лактамазы молекулярного класса А SHV типа широко распространены среди представителей семейства энтеробактерий (*Klebsiella* и *Escherichia*) [1–3]. Гены β -лактамаз SHV-типа являются «универсальными» для *K. pneumoniae* [4–6]. Более 90 % клинических штаммов *K. pneumoniae* содержат β -лактамазу SHV-1 [1, 4]. Точечные мутации в генах фермента SHV-1 привели формированию класса его производных, способных гидролизировать 3 и 4 поколения цефалоспоринов и азтреонов. В настоящее время известно более 90 таких ферментов, объединенных одним термином — β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС) [1]. БЛРС (SHV-2–SHV-88) отличаются от своего предшественника SHV-1 единичными заменами аминокислот в нескольких сайтах. Все ранние, в эволюционном отношении, представители семейства ферментов SHV типа (SHV-2–SHV-8) были впервые найдены и описаны у изолятов *K. pneumoniae* [1, 4]. В настоящее время наиболее распространенные замены у производных SHV встречаются в позициях 35, 179, 238 и 240 (нумерация позиций в соответствии со схемой Ambler) [7, 8].

Гены БЛРС локализуются в плазмидах и могут легко передаваться между представителями вида, рода и даже семейства. В связи с этим резистентность клинических штаммов к новым антибиотикам возникает уже через 2–3 года от внедрения в клиническую практику и быстро распространяется путем горизонтальной передачи генов резистентности плазмид или интегронов в популяции семейства энтеробактерий, в том числе разных видов клебсиелл. В клинической микробиологии большое внимание уделяется выявлению продукции β -лактамаз и характеристике их генов у штаммов *Klebsiella spp*. Данные анализа мутационной изменчивости генов SHV позволяет оценить возможные эпидемиологические ситуации от спорадических случаев до больших вспышек.

Материалы и методы. Были исследованы 43 клинических изолята бактерий рода *Klebsiella*. Культуры *K. pneumoniae* составили 19 штаммов, *K. oxytoca* — 28.

Определение чувствительности к антибиотикам. Определение чувствительности выделенных чистых культур *Klebsiella spp*. к восьми β -лактамам антибиотикам осуществляли стандартным методом серийных двухкратных разведений препаратов в питательной среде (Мюллер–Хинтон агар). Определяли МИК амоксициллина, амоксициллин/клавуланата, ампициллин/сульбактама, цефтазидима, цефотаксима, цефепима, азтреонама, имипенема.

Детекция генов, кодирующих β -лактамазы SHV типа с помощью ПЦР. Для амплификации 928 п.н. последовательности SHV генов в ПЦР использовали праймеры: прямой 5'-GGGTTATTCTTATTTGTTCGC-3' и обратный 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'. ПЦР осуществляли с использованием режима 96 °C — 10 мин (96 °C — 1 мин, 56 °C — 1 мин, 72 °C — 1 мин), 35 циклов [9].

ПЦР-ПДРФ анализ продуктов генов SHV, полученных в ПЦР. Для характеристики генов SHV использовали рестрикционные эндонуклеазы *NheI*, *DdeI* и *NruI*.

Секвенирование специфичных ПЦР продуктов генов SHV. Циклическую секвенс-реакцию фрагмента SHV гена проводили модифицированным методом Сенгера. В реакции секвенирования SHV гена использовали пару праймеров, что в реакции амплификации.

Результаты и обсуждение. Определение генов β -лактамаз SHV типа с помощью ПЦР. Культуры *Klebsiella spp.* с помощью ПЦР были исследованы на наличие генов β -лактамаз молекулярного класса A SHV типа. 89,4 % исследованных изолятов *K. pneumoniae* и 39,2 % *K. oxytoca* показывали положительную реакцию амплификации со специфичной парой праймеров.

Определение мутаций в гене SHV с помощью метода ПЦР-ПДРФ. Метод ПЦР-ПДРФ применяли для определения мутаций в гене SHV в позициях 35, 238 и 240 и отбора штаммов с продукцией ферментов производных SHV-1. Для обнаружения точечной мутации и замены нуклеотидов в положении 238, которая отличает большинство производных SHV от своего предшественника ранней β -лактамазы SHV-1, проводили ПЦР/*NheI* тест, предложенный Nuesch — Inderbinen et al. [10]. У 5 штаммов был обнаружен сайт рестрикции *NheI*, свидетельствующий о присутствии мутации. Точечная мутация в позиции 238 в триплете GGC→AGC формирует новый сайт для узнавания ферментом *NheI*. При помощи эндонуклеазы рестрикции *DdeI* были идентифицированы мутации в гене SHV в позиции 35 у 7 (35 %) культур. Размеры фрагментов у культур без мутации составлял 492, 278, 91 п.о., фрагменты с мутацией составляли 583 и 278 п.о. У 4 культур также был определен сайт для фермента *NruI*.

При сравнении участков генов SHV в методе ПЦР-ПДРФ было отмечено, у 40 % ($n = 8$) не было обнаружено сайтов для исследованных эндонуклеаз. Это говорит о присутствии β -лактамазы SHV-1. Можно предположить, что одной из причин повышения профиля резистентности данных штаммов является гиперпродукция данного фермента.

С помощью метода ПЦР-ПДРФ при использовании рестрикционных эндонуклеаз *NheI*, *DdeI* и *NruI* у 12 штаммов *K. pneumoniae* в гене SHV были обнаружены нуклеотидные точечные замены, соответствующие аминокислотным, в позициях 35, 238 и 240, отличающие производные SHV от своего предшественника ранней β -лактамазы SHV-1.

Секвенирование гена SHV у культур *K. pneumoniae*.

Полученные в реакции ПЦР специфические фрагменты SHV гена размером 930 п.о. исследуемых штаммов *K. pneumoniae* были секвенированы. При анализе аминокислотных последовательностей SHV генов, нами установлено присутствие у

штаммов *K. pneumoniae* 5 различных типов SHV ферментов. Секвенирование 20 фрагментов генов SHV выявило наличие ферментов SHV-1 ($n = 8$), SHV-2 ($n = 2$), SHV-5 ($n = 3$), SHV-11 ($n = 3$), SHV-31 ($n = 4$). Из них 45 % штаммов *K. pneumoniae* содержали ферменты БЛРС (SHV-2, SHV-5 и SHV-31), а 55 % — ферменты SHV не БЛРС (SHV-1 и SHV-11).

Аминокислотные замены преимущественно были выявлены в 3 положениях — Лей35Глн, Гли238Сер и Глу240Лиз. Полученные результаты суммированы в табл. 1.

Таблица 1

Замены аминокислот в генах β -лактамаз у производных SHV

SHV тип β -лактамаз	Аминокислоты/кодоны в позициях ¹		
	35	238	240
SHV-1 ²	Лей/СТА	Гли/GGC	Глу/GAA
SHV-1	Лей/СТА	Гли/GGC	Глу/GAA
SHV-2	Лей/СТА	Сер/AGC	Глу/GAA
SHV-5	Лей/СТА	Сер/AGC	Лиз/AAG (AAA)
SHV-11	Глн/CAA	Гли/GGC	Глу/GAA (GAG)
SHV-31	Глн/CAA	Гли/GGC	Лиз/AAG

Примечание: ¹ — Нумерация позиций в соответствии с номенклатурой Ambler [8]; ² — SHV-1, последовательность GenBank X98098.

Ассоциация мутаций в генах β -лактамаз SHV-2, SHV-5, SHV-11, SHV-31 с профилем резистентности штаммов *K. pneumoniae*.

Одни и те же ферменты, присутствуя в геноме различных штаммов клебсиелл, формировали различные уровни резистентности (табл. 2).

Таблица 2

Результаты определения МИК β -лактамных препаратов в соответствии с результатами секвенирования у штаммов *Klebsiella spp.*

SHV	МИК мг/л							
	AMX	AMC	SAM	CTX	CAZ	CFM	AZT	IMP
SHV-1	8–64	4–32	0,25–2	0,25–1	0,5–4	0,125–0,5	0,25–0,5	0,125–0,25
SHV-2	>64	0,25–4	1	2–16*	1–32*	0,5	0,25–2	0,25
SHV-5	>64	4–8	1	4–8	16–64 [^]	0,5–2	8	1–2
SHV-11	>64	0,5–1	1–4	0,125–0,25	0,5–2	0,125	0,125–0,25	0,25–0,5
SHV-31	32–64	1–4	2	8–16	2–16	0,5–2	4	0,5

Примечание: * — достоверно при сравнении с SHV-1, $p < 0,01$; [^] — достоверно при сравнении с SHV-2, $p < 0,01$.

В ходе нашего исследования выявлено, что более частые замены аминокислот в SHV генах регистрировались в одном сайте, в позиции 238 или двух — в позициях 238 и 240. 35 % исследованных штаммов характеризовались наличием мутаций в отмеченных позициях. Как известно, мутации в позициях 238 и 240 приводят к изменению конфигурации и свойств активного центра фермента [11–14]. Было отмечено увеличение резистентности к цефотаксиму и цефтазидиму у штаммов с продукцией фермента SHV-2 по сравнению с культурами с присутствием SHV-1, $p < 0,01$. Поэтому эффект воздействия мутаций в позициях 238 и

240 на фенотип резистентности наблюдался значительный. Штаммы с присутствием SHV-2 и SHV-5, у которых выявлена мутация в кодоне 238, проявили большую резистентность к цефалоспорином по сравнению с SHV-1 и SHV-11 (табл. 2). Совместно две мутации (238 и 240) способствуют лучшему взаимодействию фермента с карбоксильными группами цефтазидима и азтреонама [11, 12, 14]. Мутация только в позиции 238 Гли → Сер, характерная для фермента SHV-2 приводила к незначительному или умеренному повышению уровню резистентности азтреонама и цефтазидима (МИК 0,25 — 2 мг/л, МИК — 0,5 мг/л соответственно). Мутации в двух позициях 238 и 240, которая наблюдалась у фермента SHV-5, резко увеличивали резистентность штаммов (табл. 2). Фермент SHV-5 содержащий 2 мутации, показал резистентность достоверно выше, чем SHV-2, $p < 0,01$. У штаммов с ферментом SHV-5 МИК цефотаксима составил 4–8 мг/л, МИК цефтазидима — 16–64 мг/л, МИК азтреонама — 8 мг/л.

Эффект мутаций, проходящих вне активного центра фермента, намного меньший. Фермент SHV-11 не имел типичной замены 238 Гли → Сер и отличался от предшественника SHV-1 одной заменой в позиции 35 Лей → Глу, поэтому не является БЛРС. Мутация в позиции 35 у фермента SHV-11 не оказала значимого влияния на субстратный профиль.

У 40 % изученных штаммов *K. pneumoniae* в положениях 35, 238 и 240 мутаций не было выявлено. Из данных ПЦР-ПДРФ и результатов секвенирования следует, что штаммы продуцируют хромосомную β -лактамазу SHV-1. Фермент SHV-1, а также SHV-11 не являются β -лактамазами расширенного спектра действия и в связи с этим не проявляют выраженной повышенной гидролитической активности в отношении β -лактамных препаратов. У большинства штаммов *K. pneumoniae* уровень его продукции невысокий. Штаммы с нормальной продукцией конститутивного фермента SHV-1 показали природный уровень резистентности к пенициллинам и ранним цефалоспорином (МИК > 64 мг/л), не проявили гидролизующей активности к цефотаксиму (МИК 0,25–1 мг/л) и показали слабую к цефтазидиму (МИК 0,5–2 мг/л). 4 штамма с ферментом SHV-1 были резистентны цефтазидиму (МИК 2–4 мг/л) и слабо активны против цефотаксима (МИК 0,25–1 мг/л), что говорит о гиперпродукции этого фермента. Штаммы с продукцией SHV-1 и SHV-11 показали сходный фенотип (табл. 2). Один штамм SHV-11 экспрессировал фенотип сходный со штаммами гиперпродуцентами SHV-1.

Таким образом, увеличение уровня МИК к цефтазидиму и другим β -лактамным препаратам у изучаемых штаммов клебсиелл было обусловлено присутствием генов β -лактамаз широкого спектра действия и чаще связано с мутациями в позициях Гли238Сер и Глу240Лиз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hall, B. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future / B. Hall, M. Barlow // Drug resist. updat. 2004. Vol. 7. P. 111–123.
2. Clinical and microbiologic analysis of a hospital's extended spectrum β -lactamase-producing isolates over a 2-year period / D. Burgess [et al.] // Pharma-cotherapy. 2004. Vol. 23, № 10. P. 1232–1237.

3. *Emergence* in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem / L. Poirel [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003. Vol. 47, № 2. P. 755–758.
4. *Emergence* of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community / J. Pitout [et al.] // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005. Vol. 56. P. 52–59.
5. *Extended-spectrum* beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology, and detection / A. A. Shah [et al.] // *Crit. rev. microbiol.* 2004. Vol. 30. P. 25–32.
6. *Babini, G.* Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? / G. Babini, D. Livermore // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44. P. 2230.
7. *Selection* of SHV extended-spectrum-beta-lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-borne blaSHV gene / D. S. Hammond [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52, № 2. P. 441–445.
8. *A standard* numbering scheme for the class A β -lactamases / R. P. Ambler [et al.] // *Biochem. J.* 1991. Vol. 276. P. 269–270.
9. *Jain, A.* TEM and SHV genes in extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* species beta their antimicrobial resistance pattern / A. Jain, R. Mondal // *Indian j. med. res.* 2008. Vol. 128, № 6. P. 759–764.
10. *Nuesch-Inderbinen, M. T.* Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test / M. T. Nuesch-Inderbinen, H. Hachler, F. H. Kayser // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996. Vol. 15. P. 399–402.
11. *Jacoby, G.* Beta-lactamase nomenclature / G. Jacoby // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. Vol. 50, № 4. P. 1123–1129.
12. *Hujer, A.* Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 beta-lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance / A. Hujer, K. Hujer, R. Bonomo // *Biochim. biophys.* 2001. Vol. 1547. P. 37–50.
13. *Patterns* of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak / P. Gruteke [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. Vol. 41. P. 1161–1166.
14. *Selection* of SHV extended-spectrum-beta-lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-borne blaSHV gene / D. S. Hammond [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52, № 2. P. 441–445.