

УДК 579.84.014:577.152

β -Лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования

М.В. Эйдельштейн

НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, Россия

β -Лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать β -лактамы антибиотики, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. Природная способность к продукции β -лактамаз характерна для многих видов микроорганизмов. Однако наибольшую значимость в последнее время приобретает широкое распространение плазмидно кодируемых β -лактамаз, являющихся факторами вторичной (приобретенной) резистентности у изначально чувствительных микроорганизмов.

Цель настоящего обзора – описание основных структурных и функциональных групп β -лактамаз аэробных грамотрицательных бактерий в соответствии с международно принятыми системами классификации. В обзоре рассмотрены наиболее часто встречающиеся у грамотрицательных возбудителей плазмидные β -лактамы TEM- и SHV-типа, их эволюция и роль в формировании устойчивости к различным β -лактамам, а также современные методы их диагностики и типирования.

Ключевые слова: β -лактамазы, антибиотикорезистентность, грамотрицательные бактерии, микробиологическая диагностика.

β -Lactamases of Aerobic Gram-Negative Bacteria: Description, Principles of Classification, Methods of Detection and Typing

M.V. Edelstein

Institute of Antimicrobial Chemotherapy of Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

β -Lactamases are represented by extensive range of genetically and functionally different enzymes that are able to destroy β -lactams that leads to development of resistance to these antibiotics in β -lactamases producing bacteria. Intrinsic production of β -lactamases is a common phenomenon for wide range of microorganisms. But at the present time the wide spread of plasmid-mediated β -lactamases that leads to secondary (acquired) resistance to β -lactams becoming more common.

The aim of this review is to describe the main structural and functional groups of β -lactamases of aerobic Gram-negative bacteria, with especial attention to plasmid-mediated TEM- and SHV-types β -lactamases, their evolution and role in the development of resistance to different β -lactams. The recent methods of detection and typing of β -lactamases are described.

Key words: β -lactamases, antimicrobial resistance, Gram-negative bacteria, microbiological diagnostics.

Контактный адрес:

Михаил Владимирович Эйдельштейн
214019, Смоленск, Россия, а/я 5
Эл. почта: me@antibiotic.ru

1. Механизм действия β -лактамаз

Согласно определению Комитета по номенклатуре Международного биохимического общества β -лактамазы классифицируются как «ферменты, осуществляющие гидролиз амидов, амидинов и других С–N связей ..., выделенные на основании субстрата – ... циклических амидов» [1].

Термин « β -лактамазы» является, таким образом, функциональным и объединяет различные бактериальные ферменты, способные расщеплять β -лактамы антибиотики, содержащие в своей структуре циклическую амидную связь.

Большинство известных β -лактамаз проявляет выраженную структурную гомологию с *пенициллинсвязывающими белками* (ПСБ), что свидетельствует об эволюционной взаимосвязи между ферментами этих групп [2]. Подобно ПСБ β -лактамазы, содержащие остаток серина в активном центре, взаимодействуют с β -лактамами антибиотиками с образованием эфирного комплекса. Однако в случае β -лактамаз этот комплекс быстро расщепляется с высвобождением нативного фермента и инактивированной молекулы субстрата (рис. 1).

Различия между β -лактамазами и ПСБ не всегда отчетливы, поскольку многие β -лактамазы могут образовывать стабильные эфиры с β -лактамами, выступающими в роли ингибиторов, а некоторые ПСБ обладают способностью к быстрому деацили-

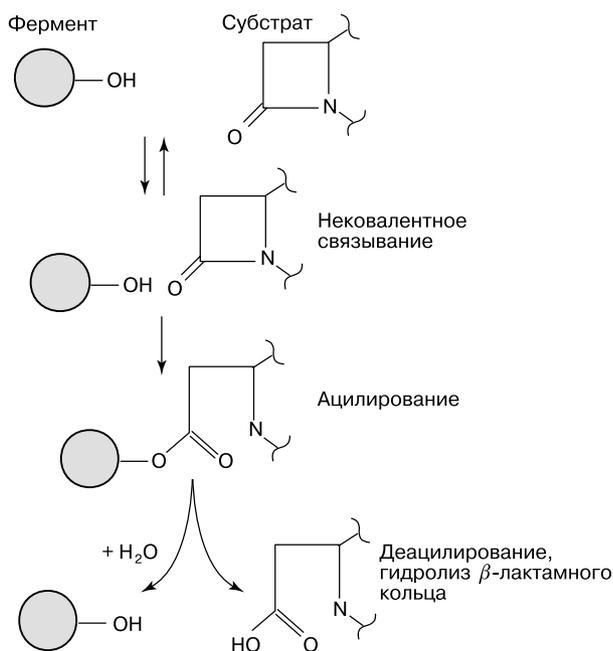


Рис. 1. Механизм расщепления β -лактамных антибиотиков β -лактамазами, содержащими серин в активном центре

рованию, проявляя слабую гидролитическую активность в отношении отдельных β -лактамных антибиотиков [3].

Сравнительно небольшое число ферментов, известных как металло- β -лактамазы, гидролизуют β -лактаманное кольцо с участием ионов цинка, находящихся в активном центре [4]. Наиболее существенной особенностью β -лактамаз этого типа является их активность в отношении карбапенемов [5].

2. Разнообразие и классификация β -лактамаз

С момента открытия β -лактамаз в 1940 г., когда Е.Р. Abraham и Е. Chain описали процесс инактивации пенициллина в бесклеточном экстракте культуры кишечной палочки [6], и до настоящего времени различными исследователями выявлено не менее 300 ферментов, отличающихся структурно и функционально, способных осуществлять гидролиз β -лактаманного кольца. За исключением нескольких видов клинически значимых микроорганизмов, среди которых следует отметить *Streptococcus pneumoniae* и *Helicobacter pylori*, β -лактамазы встречаются у подавляющего большинства бактериальных возбудителей инфекций [2].

Важнейшими свойствами β -лактамаз, определяющими их разнообразие, являются:

- 1) субстратная специфичность (способность к преимущественному гидролизу β -лактамов определенных групп – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов);
- 2) чувствительность к действию ингибиторов;
- 3) локализация кодирующих генов (хромосомная или плазмидная) и характер их экспрессии (конститутивный или индуцибельный).

Перечисленные функциональные особенности послужили основой создания различных систем классификации β -лактамаз. Актуальность дифференциации ферментов, предпочтительно гидролизующих пенициллины (пеницилиназы) или цефалоспорины (цефалоспорины), впервые отметили Р.С. Fleming и соавт. в 1963 г. [7]. Система классификации, предложенная Т. Sawai и соавт. в 1968 г., предусматривала использование иммунных сывороток в качестве дополнительного критерия дифференциации пеницилиназ, цефалоспорины и ферментов с широким субстратным спектром.

М.Н. Richmond и R.B. Sykes разделили все известные в начале 70-х годов β -лактамазы грамотрицательных микроорганизмов на 5 групп с учетом субстратного спектра, чувствительности к ингибиторам и отчасти локализации кодирующих генов [8]. В 1976 г. R. B. Sykes и M. Matthew расширили эту классификацию, подчеркнув роль плазмидных

β -лактамаз, которые могли быть дифференцированы на основании данных изоэлектрического фокусирования [9]. В функциональной схеме S. Mitsuhashi и M. Inoue (1981) была выделена дополнительная группа «цефуросим-гидролизующих» ферментов [10].

Параллельно с развитием функциональных подходов в классификации R. Ambler в 1980 г. использовал результаты сравнения первичной структуры β -лактамаз для описания молекулярных классов: сериновых ферментов (класс А), включая пенициллиназу *Staphylococcus aureus*, и металло- β -лактамаз (класс В) *Bacillus cereus* [11].

По мере накопления данных об аминокислотной последовательности β -лактамаз были также описаны два дополнительных класса ферментов, содержащих серин в активном центре: класс С-цефалоспоринаяз и класс D-оксациллиназ грамотрицательных бактерий [4]. В последнее время значение структурной классификации возросло в связи с расширением использования молекулярных методов диагностики и типирования β -лактамаз.

Прообразом современной классификации явилась предложенная К. Bush в 1989 г. система разделения β -лактамаз на 3 основные группы, в которой впервые предпринята попытка провести корреляцию между функциональными особенностями (спектром активности, чувствительностью к ингибиторам) и молекулярной структурой ферментов, продуцируемых различными видами микроорганизмов. Эта система была уточнена и дополнена в 1995 г. К. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros с учетом новых ферментов, описанных у энтеробактерий, и в настоящее время принята большинством исследователей [4, 12].

2.1. Цефалоспоринаязы, слабо ингибируемые клавулановой кислотой (группа 1)

Группа 1 в функциональной классификации К. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros включает ферменты грамотрицательных бактерий, соответствующие молекулярному классу С. Предпочтительными субстратами для них являются цефалоспорины. Клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам обладают незначительной ингибирующей активностью в отношении β -лактамаз данного типа.

Цефалоспоринаязы, как правило, являются хромосомно-кодируемыми и распространены среди многих видов семейства *Enterobacteriaceae*, а также у отдельных неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов, включая *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Влияние β -лактамаз класса С на фенотип резистентности различных видов бактерий определяется

характером экспрессии соответствующих генов (*ampC*). Для штаммов *Escherichia coli* и *Shigella* spp. характерен низкий уровень продукции хромосомных цефалоспоринаяз, который может быть обнаружен с помощью чувствительных тестов, однако не обеспечивает устойчивость к цефалоспорином и пенициллинам [3].

Продукция аналогичных ферментов у *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* и *Providencia rettgeri* носит индуцибельный характер. В отсутствие антибиотика цефалоспоринаязы вырабатываются в следовых количествах, однако многие β -лактамазы способны вызывать функциональную дерепрессию генов *ampC* и быстрое увеличение синтеза ферментов.

Чувствительность «индуцибельных» штаммов к тем или иным антибиотикам зависит, таким образом, не только от эффективности их расщепления β -лактамазами, но и от способности антибиотиков усиливать экспрессию *ampC*.

Ампициллин и цефалоспорины I поколения, являясь сильными индукторами, быстро разрушаются под действием цефалоспоринаяз и поэтому не обладают активностью в отношении перечисленных видов бактерий. Карбоксипенициллины, уреидопенициллины, цефалоспорины II–III поколений и монобактамы также являются лабильными, однако сохраняют активность, поскольку не вызывают индукцию.

Приобретенная резистентность к этим препаратам обычно развивается вследствие мутаций в локусе *ampD*, приводящих к постоянной гиперпродукции хромосомных цефалоспоринаяз. Карбапенемы и цефалоспорины IV поколения вследствие своей стабильности остаются эффективными как в отношении «индуцибельных», так и гиперпродуцирующих штаммов [13].

У редких штаммов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae* были выявлены плазмидно-кодируемые β -лактамазы класса С: MIR-1, BIL-1, MOX-1, FOX-1, гены которых проявляют гомологию с *ampC* *Enterobacter* spp. и *C. freundii* и экспрессируются конститутивно [3].

2.2. Пенициллиназы, цефалоспоринаязы и β -лактамазы широкого спектра, ингибируемые клавулановой кислотой (группа 2)

Группа 2 является наиболее обширной и объединяет ферменты, относящиеся к молекулярным классам А и D (рис. 2). На основании субстратных различий β -лактамазы, входящие в эту группу, разделены на 8 функциональных категорий.

Группа 2а включает в основном плазмидные

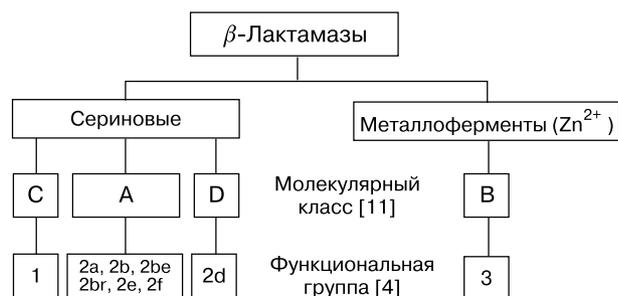


Рис. 2. Соответствие структурной и функциональной классификации β -лактамаз

пенициллиназы грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus* spp. и *Bacillus* spp. Стафилококковые β -лактамазы эффективно разрушают природные и полусинтетические пенициллины, кроме группы оксациллина, их функция подавляется ингибиторами – клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом [4].

К группе 2b относятся наиболее распространенные среди штаммов *E. coli*, *Proteus mirabilis* и *K. pneumoniae* плазмидные β -лактамазы TEM-1, TEM-2 и SHV-1. Предпочтительными субстратами для них являются пенициллины, включая ампициллин, амоксициллин, тикарциллин и карбенициллин. Уреидопенициллины, цефалоспорины I поколения и цефоперазон расщепляются ферментами данной группы с меньшей эффективностью [14]. Поэтому TEM-1, TEM-2 и SHV-1 часто описывают как пенициллиназы широкого спектра.

Группа 2be объединяет более 80 производных TEM-1, TEM-2 и SHV-1, известных как β -лактамазы расширенного спектра (extended-spectrum β -lactamases – ESBL), которые обладают способностью расщеплять цефалоспорины III–IV поколений и монобактамы наряду с ранними цефалоспоридами и пенициллинами.

Кроме того, к этой же функциональной группе могут быть отнесены плазмидные цефотаксимазы Toho-1, CTX-M-1 – CTX-M-16, принадлежащие к молекулярному классу A и проявляющие наиболее выраженную гомологию с хромосомными β -лактамазами *Kluyvera ascorbata*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *Citrobacter diversus* [15].

Среди различных представителей группы 2be отмечается выраженная субстратная предпочтительность к отдельным цефалоспоридам расширенного спектра, например цефтазидиму или цефотаксиму, однако продукция подавляющего большинства ESBL может вызывать резистентность ко всем оксимино- β -лактамам [3]. Карбапенемы и цефамицины не входят в спектр антибиотиков, разруша-

емых ESBL. Ферменты этой группы также проявляют чувствительность к ингибиторам.

Группа 2br, впервые выделенная в системе классификации К. Bush, G. Jacoby и А. Medeiros, представлена в основном производными TEM β -лактамаз, отличительной особенностью которых является устойчивость к ингибиторам. Большинство ингибиторорезистентных TEM (IRT) ферментов, а также единственная β -лактамаза SHV-типа (SHV-10), входящая в группу 2br, выявлены у клинических штаммов *E. coli* [16, 17, 18].

Группа 2c соответствует карбенициллиназам грамотрицательных бактерий, которые принадлежат к молекулярному классу A. Ферменты PSE-1, PSE-3 и PSE-4, относящиеся к этой группе, обладают более высокой скоростью гидролиза карбенициллина, чем бензилпенициллина, и подавляются клавулановой кислотой. Сходные свойства проявляют также β -лактамазы BRO-1 и BRO-2 *Moraxella catarrhalis* и β -лактамаза SAR-1 *Vibrio cholerae* [12].

Оксациллиназы (группа 2d) OXA-1 – OXA-9, OXA-10 (PSE-2) и OXA-11 наиболее эффективно расщепляют клоксациллин и оксациллин. Их активность слабо подавляется ингибиторами, вследствие чего оксациллиназы могут вызывать устойчивость энтеробактерий к амоксициллину/клавулановой кислоте [3].

Группа 2e включает цефалоспорины, характеризующиеся активностью в отношении оксиминоцефалоспоринов и высокой чувствительностью к клавулановой кислоте. Представителями этой группы ферментов являются индуцибельные хромосомные β -лактамазы (цефуросимазы) *P. vulgaris* и *C. diversus*, а также хромосомные β -лактамазы *Bacteroides* spp. и L2 *Stenotrophomonas maltophilia* [4].

Редкие β -лактамазы молекулярного класса A, гидролизующие карбапенемы и проявляющие чувствительность к клавуланату NMC-A, Imi-1 *Enterobacter cloacae* и Sme-1 *Serratia marcescens*, объединены в группу 2f [4].

2.3. Металло- β -лактамазы (группа 3)

Цинксодержащие β -лактамазы, относящиеся к молекулярному классу B и функциональной группе 3 в классификации К. Bush, G. Jacoby и А. Medeiros, проявляют гидролитическую активность в отношении подавляющего большинства β -лактамов, включая карбапенемы. Ферменты данного типа ингибируются соединениями, хелатирующими цинк, например ЭДТА.

Индукцибельные хромосомно-кодируемые металло- β -лактамазы описаны у *S. maltophilia* (L1),

Aeromonas spp. (A2, CphA), *Burkholderia cepacia* (PCM-1) и *Bacteroides fragilis* (CcrA) [5]. У отдельных штаммов *S. marcescens*, *P. aeruginosa* и *B. fragilis* были выявлены Zn²⁺-зависимые карбапенемазы, гены которых имеют плазмидную локализацию [3].

3. Распространенность TEM и SHV β-лактамаз и их роль в развитии резистентности к β-лактамам антибиотикам

3.1. β-Лактамазы широкого спектра TEM-1, TEM-2 и SHV-1

Особое значение плазмидных β-лактамаз TEM- и SHV-типов связано с их широким распространением среди грамотрицательных бактерий. По данным различных исследователей, TEM-1 встречается у 73–94% ампициллинорезистентных штаммов *E. coli* и составляет около 80% всех плазмидных β-лактамаз энтеробактерий [19, 20, 21]. Продукция этого фермента отмечается не только у многих видов семейства *Enterobacteriaceae*, но и у представителей других групп микроорганизмов, например *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Vibrio* spp. [3, 22, 23].

Распространенность TEM-1 наиболее вероятно связана с локализацией генов, кодирующих этот фермент, в составе транспозонов (*Tn2*, *Tn3*), обеспечивающих возможность их перемещения между конъюгативными плазмидами с широким кругом хозяев [24], однако данное обстоятельство не является единственным объяснением доминирования TEM-1.

TEM-2 отличается от TEM-1 заменой единственного аминокислотного остатка (Глн₃₉→Лиз), которая проявляется в основном в повышении изоэлектрической точки данного фермента (pI 5,4→5,6) и существенно не изменяет спектр его активности [3, 22]. Ген, кодирующий TEM-2, также входит в состав транспозона *Tn1*, который практически идентичен *Tn3*, за исключением точечной мутации в промоторной области, усиливающей транс-

крипцию *bla*_{TEM-2}, и 5 нуклеотидных замен в структурной части *bla*_{TEM} гена, 4 из которых являются молчащими [25].

Тем не менее, несмотря на минимальные генетические и фенотипические различия между TEM-1 и TEM-2, частота встречаемости последнего фермента не превышает 4% [26]. Продукция TEM-2 является наиболее характерной для штаммов *P. mirabilis* [17, 27, 28].

Наиболее родственные в структурном и функциональном отношении ферменты, относящиеся к генетической группе SHV, в большей степени распространены среди микроорганизмов рода *Klebsiella* [22, 29], хотя плазмидно-кодируемые β-лактамазы этой группы также встречаются у представителей других родов семейства *Enterobacteriaceae*. Ген SHV-1 может иметь как плазмидную, так и хромосомную локализацию у штаммов *K. pneumoniae* и не связан с мобильными генетическими элементами [2].

Аминокислотные последовательности ферментов TEM-1 и SHV-1 гомологичны на 65% [30]. Оба фермента обладают сходной пространственной структурой, характерной для β-лактамаз класса А [11, 31, 32], и близкими спектрами ферментативной активности (табл. 1).

Экспрессия генов TEM и SHV β-лактамаз осуществляется конститутивно, однако уровень продукции ферментов определяется эффективностью промоторов и копийностью плазмид, с которыми связаны гены [33, 34]. Продукция даже небольшого количества TEM-1, TEM-2 или SHV-1 приводит к формированию высокого уровня резистентности (МПК≥256 мкг/мл) к амино- и карбоксипеницилинам.

Каталитическая активность TEM пенициллиназ и SHV-1 в отношении уреидопенициллинов, цефалоспоринов I поколения и цефоперазона выражена меньше. Наблюдаемая у различных штаммов-продуцентов варибельность значений МПК этих антибиотиков (8–512 мкг/мл – у пиперациллина,

Таблица 1. Характеристика β-лактамаз широкого спектра TEM-1, TEM-2 и SHV-1 [4]

Фермент	Молекулярная масса, кДа	pI*	Относительная скорость гидролиза, %								IC ₅₀ , μМ**			
			PEN	AMP	CARB	LOR	LOT	TAX	TAZ	ATM	CA	SUL	TZB	
TEM-1	28,9	5,4	100	100	10	140	20	0,07	0,01	0,3	0,09	6,1	0,04	
TEM-2	28,9	5,6	100	100	6	120	9,4	0,08	<0,01	0,4	0,18	8,7	0,05	
SHV-1	28,8	7,6	100	150	6,3	48	6,5	0,18	0,02	0,38	0,03	17	0,14	

Примечание. * pI – изоэлектрическая точка фермента, ** IC₅₀ – концентрация, подавляющая 50% активности фермента. PEN – пенициллин, AMP – ампициллин, CARB – карбенициллин, LOR – цефалоридин, LOT – цефалотин, TAX – цефотаксим, TAZ – цефтазидим, ATM – азтреонам, CA – клавулановая кислота, SUL – сульбактам, TZB – тазобактам.

16–256 мкг/мл – у цефалотина, 0,5–64 мкг/мл – у цефоперазона) определяется главным образом количеством вырабатываемого фермента [3].

Клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам обладают различной ингибирующей способностью в отношении пенициллиназ. Сульбактам – наименее эффективный ингибитор, поэтому *in vitro* чувствительность к комбинации ампициллин/сульбактам ($\leq 8/4$ мкг/мл) наблюдается лишь у 25% пенициллиназопродуцирующих штаммов *E. coli*. В то же время чувствительность к амоксициллину/клавуланату ($\leq 8/4$ мкг/мл), тикарциллину/клавуланату ($\leq 16/2$ мкг/мл) и пиперациллину/тазобактаму ($\leq 16/4$ мкг/мл) отмечается соответственно у 60, 70 и более 90% штаммов, экспрессирующих *bla*_{TEM-1} [3].

Продукция β -лактамаз TEM-1, TEM-2 и SHV-1 не вызывает устойчивость к цефамидинам, оксимино-аминоазиололид-цефалоспорином, монобактамам и карбапенемам, поскольку препараты перечисленных групп практически не расщепляются данными ферментами [3, 4, 22].

3.2. Эволюция β -лактамаз расширенного спектра. Структурные и функциональные особенности ESBL

Внедрение в начале 80-х годов прошлого века в широкую клиническую практику цефалоспоринов III поколения (цефотаксима, цефтазидима), которые эффективно подавляют штаммы, продуцирующие классические плазмидные пенициллиназы, в течение короткого периода привело к появлению и широкому распространению производных TEM и SHV, способных эффективно связывать и разрушать оксимино-аминоазиололид- β -лактамы. Эти ферменты получили название ESBL – β -лактамаз расширенного спектра [2].

Первый клинический штамм, продуцирующий ESBL, был выделен в 1982 г. в Англии [22]. Этот штамм *K. oxytoca* явился причиной развития ряда инфекционных осложнений в неонатологическом отделении в Ливерпуле. Изначально выделенный штамм был резистентным к гентамицину, но чувствительным к цефтазидиму и продуцировал β -лактамазу TEM-1.

В ходе последующей терапии с использованием цефтазидима штамм приобрел резистентность к данному препарату. Ген резистентности был локализован в составе 141-тпн конъюгативной плазмиды. Практически он идентичен TEM-1, за исключением замены одного нуклеотида в положении 609.

Замена соответствующей аминокислоты (Arg₁₆₄→Ser) в активном центре фермента привела к появлению новой β -лактамазы, способной рас-

щеплять цефтазидим и получившей впоследствии название TEM-12 [36, 37]. Аналогичный фермент найден у цефтазидиморезистентных штаммов *E. coli* в США и *K. oxytoca* в Англии [37].

В 1983 г. в Западной Германии были выделены 3 штамма *K. pneumoniae* и один – *S. marcescens*, способные передавать при конъюгации резистентность к цефотаксиму [37]. Найденная у этих штаммов плазмидная β -лактамаза оказалась производной SHV-1 и была названа SHV-2. Так же, как и в случае TEM-12, новый фермент отличался от предшественника заменой единственного аминокислотного остатка (Gли₂₃₈→Сер) [38].

В настоящее время различные ESBL, производные TEM-1, TEM-2 и SHV-1, отличающиеся заменами одной и более аминокислот, широко распространены в странах Европы, Азии, Африки, Северной и Южной Америки и в Австралии [2]. По данным многих авторов, встречаемость ESBL у госпитальных штаммов *K. pneumoniae* составляет в различных странах от 7 до 75% [3, 39, 40]. В России в отдельных стационарах частота выявления этих ферментов у клебсиелл достигает 90% [41].

Распространение ESBL часто носит эпидемический характер, при этом доминируют определенные штаммы или ферменты в масштабах как отдельных центров, так и обширных географических зон. Так, например, в Бельгии и Франции преобладающими являются штаммы *K. pneumoniae*, относящиеся к одному серотипу K25 и продуцирующие SHV-4 [42], β -лактамазы TEM-10 и TEM-26 в основном распространены у различных штаммов в США [3]. Случаи конвергентной эволюции ESBL и *de novo* образования идентичных ферментов от разных предшественников также описаны в литературе [43, 44].

Наиболее частые продуценты ESBL – штаммы *K. pneumoniae* [3]. Причины преобладания ESBL у клебсиелл по сравнению с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, например *E. coli*, остаются невыясненными, поскольку пока не найдено различий в механизмах экспрессии и скорости накопления мутаций в генах TEM и SHV β -лактамаз у *E. coli* и *K. pneumoniae* [22]. Лечение инфекций, вызванных ESBL-продуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, часто осложняется их множественной антибиотикорезистентностью, поскольку гены ESBL обычно расположены в составе больших «полирезистентных» плазмид [45].

Описано около 60 отличающихся по спектру мутаций ESBL-производных TEM-типа и более 20 ESBL, относящихся к группе SHV. Для большинства этих ферментов имеются исчерпывающие данные о характере аминокислотных замен, определяющих расширенный спектр активности (табл. 2).

Отдельные мутации, например замена Гли₂₃₈→Сер, обнаруживаемая как у TEM-, так и SHV-производных, значительно повышают каталитическую активность в отношении цефтазидима, цефотаксима и азтреонама [22, 30]. Продукция β-лактамаз TEM-3, TEM-4, TEM-8, TEM-15, TEM-19, SHV-2, SHV-3, SHV-4 и SHV-5, содержа-

щих Сер-238, приводит к формированию высокого уровня резистентности (МПК ≥ 16 мкг/мл) ко всем оксиимино-β-лактамам [3].

Другие мутации, например Арг₁₆₄→Сер у TEM-7, TEM-10, TEM-12 и TEM-26, вызывают преимущественное повышение устойчивости к цефтазидиму (МПК – 4–256 мкг/мл), оставляя значения МПК

Таблица 2. Спектр мутаций у ESBL TEM- и SHV-типов [46]

Фермент	Позиции аминокислотных замен относительно TEM-1*															pI
	21	39	42	51	92	104	153	164	182	237	238	240	244	265	268	
TEM-1	L	Q	A	L	G	E	H	R	M	A	G	E	R	T	S	5,4
TEM-3		K				K					S					6,3
TEM-4	F					K					S			M		5,9
TEM-5							S		T			K				5,55
TEM-6						K		H								5,9
TEM-7		K					S									5,4
TEM-8		K				K	S			S						5,9
TEM-9	F					K	S							M		5,5
TEM-10							S					K				5,6
TEM-11		K					H									5,6
TEM-12							S									5,25
TEM-13		K												M		5,6
TEM-15						K					S					6,0
TEM-16		K				K		H								6,3
TEM-17						K										
TEM-18		K				K										6,3
TEM-19											S					5,4
TEM-20								T			S					5,4
TEM-21		K				K	R				S					6,4
TEM-22		K				K				G	S					6,3
TEM-24		K				K		S		T		K				6,5
TEM-25	F										S			M		5,3
TEM-26						K		S								5,6
TEM-27							H					K		M		5,9
TEM-28							H					K				6,1
TEM-29							H									5,42
TEM-42		K	V								S	K		M		5,8
TEM-43						K		H	T							6,1
TEM-46		K				K		S				K				6,5
TEM-47											S	K		M		6,0
TEM-48	F										S	K		M		6,0
TEM-49	F										S	K		M	G	6,0
TEM-52						K		T			S					6,0
TEM-53	F						S									
TEM-54													L			
TEM-56		K				K	R									6,4
TEM-57					D											5,2
TEM-60		K		P		K		S								6,4
TEM-61		K						H				K				6,5
TEM-63	F					K		S	T							5,6
TEM-66		K			D	K					S					6,0

	Позиция аминокислотных замен относительно SHV-1*											
	8	35	43	54	140	179	192	193	205	238	240	
SHV-1	I	L	R	G	A	D	K	L	R	G	E	7,6
SHV-2										S		7,6
SHV-2a		Q								S		7,6
SHV-3									L	S		7,0
SHV-4									L	S	K	7,8
SHV-5										S	K	8,2
SHV-6						A						7,6
SHV-7	F		S							S	K	7,6
SHV-8						N						7,6
SHV-9				Del	R		N	V		S	K	8,2
SHV-11		Q										7,6
SHV-12		Q								S	K	8,2

Примечание. *Нумерация аминокислотных остатков согласно R.P. Ambler [47]. Обозначения аминокислот: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, F – фенилаланин, G – глицин, H – гистидин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, P – пролин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, I – изолейцин. Del – делеция.

цефотаксима, цефтриаксона и цефпиромы для большинства штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* на уровне 0,06–4 мкг/мл [3]. Вместе с тем продукция значительного количества ферментов со «слабой» ESBL-активностью, особенно у штаммов с пониженной проницаемостью наружной клеточной мембраны, приводит к существенно более высокому уровню резистентности и, что наиболее важно, может являться причиной клинической неэффективности цефалоспоринов III–IV поколений [48].

Таким образом, ESBL-продуцирующие штаммы рассматриваются как биологически устойчивые ко всем оксимино- β -лактамам независимо от наблюдаемого *in vitro* уровня резистентности [3].

3.3. Ингибиторорезистентные β -лактамазы и ферменты, содержащие мутации, характерные для ингибиторорезистентных TEM ферментов и ESBL

Наряду с ферментами, проявляющими расширенный спектр активности, семейства TEM и SHV β -лактамаз включают дополнительное число производных, обладающих устойчивостью к ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму. За исключением SHV-10 все известные ингибиторорезистентные β -лактамазы класса А являются вариантами TEM-1 и TEM-2 (табл. 3).

IRT ферменты впервые описаны у штаммов *E. coli* в 1992 г. [49]. Впоследствии различные варианты IRT, в основном отличающиеся заменами аминокислотных остатков в позициях 69, 165, 182, 244, 275 и 276, были обнаружены у госпитальных и внебольничных штаммов *E. coli* [17, 50, 51], а также у отдельных клинических изолятов *P. mirabilis* [52] и *Klebsiella* spp. [53, 54]. Все энтеробактерии, проду-

цирующие IRT, были выделены в странах Западной Европы – Испании, Франции, Великобритании и Греции [17].

Согласно результатам обзорного исследования, проведенного во Франции, наиболее частыми продуцентами IRT являются уропатогенные штаммы *E. coli*, что, вероятно, объясняется широким использованием ингибиторозащищенных пенициллинов для лечения инфекций мочевыводящих путей [51].

Устойчивость к ингибиторам может развиваться путем независимого накопления аналогичных мутаций у разных TEM ферментов. Так, ингибиторорезистентные β -лактамазы *P. mirabilis* TEM-44 и TEM-65 являются производными TEM-2, наиболее распространенной у данного вида микроорганизмов пенициллиназы, и образуются в результате мутаций Arg₂₄₄→Сер и Arg₂₄₄→Цис, также характерных для ферментов TEM-30 и TEM-31, предшественником которых является TEM-1 [17, 52].

Несмотря на резистентность к пенициллину, продуценты IRT обычно проявляют чувствительность к цефалоспорином, включая препараты I поколения (цефалотин). Уровень их устойчивости к пиперациллину/тазобактаму обычно ниже, чем к амоксициллину/клавулановой кислоте и ампициллину/сульбактаму, главным образом из-за более высокой стабильности пиперациллина [3].

Три фермента, описанные в настоящее время, объединяют в своей структуре мутации, характерные для ESBL и ингибиторорезистентных производных. SHV-10 является производной β -лактамазы расширенного спектра SHV-9 и отличается единственной аминокислотной заменой (Сер₁₃₀→Гли), в результате которой фермент практически полностью утрачивает активность в отно-

Таблица 3. Спектр мутаций у ингибиторорезистентных β -лактамаз TEM- и SHV-типов [46]

Фермент	Позиции аминокислотных замен относительно TEM-1*												pI		
	39	69	104	130	165	182	238	240	244	262	265	275		276	
TEM-1	Q	M	E	S	W	M	G	E	R	V	T	R	N	5,4	
TEM-30 (IRT-2)									S					5,2	
TEM-31 (IRT-1)									C					5,2	
TEM-32 (IRT-3)		I				T								5,4	
TEM-33 (IRT-5)		L												5,4	
TEM-34 (IRT-6)		V												5,4	
TEM-35 (IRT-4)		L											D	5,2	
TEM-36 (IRT-7)		V											D	5,2	
TEM-37 (IRT-8)		I											D	5,2	
TEM-38 (IRT-9)		V									L			5,2	
TEM-39 (IRT-10)		L			R								D	5,4	
TEM-40 (IRT-11)		I												5,4	
TEM-44 (IRT-13)	K								S					5,4	
TEM-45 (IRT-14)		L										Q		5,2	
TEM-50 (CMT-1)		L	K				S						D	5,6	
TEM-51 (IRT-15)									H					5,2	
TEM-58									S	I				5,2	
TEM-59 (IRT-17)	K			G										5,6	
TEM-65	K								C					5,4	
TEM-68 (CMT-2)							S	K			M	L		5,7	
		Позиции аминокислотных замен относительно SHV-1*													
		54		130		140		192		193		238		240	
SHV-1		G		S		A		K		L		G		E	7,6
SHV-10		Del		G		R		N		V		S		K	8,2

Примечание. *Нумерация аминокислотных остатков согласно R.P. Ambler [47]. Обозначения аминокислот: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, G – глицин, H – гистидин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, I – изолейцин, N – аспарагин. Del – делеция.

шении цефалоспоринов и одновременно приобретает устойчивость к ингибиторам [18].

β -Лактамаза TEM-50 (CMT-1) содержит мутации, обнаруживаемые у IRT-4 (Лей-164, Асп-276) и TEM-15 (Лиз-104, Сер-238). В результате их комбинирования TEM-50 проявляет кинетические параметры (K_m , k_{cat} и IC_{50}) на уровне средних значений соответствующих констант IRT-4 и TEM-15 и обеспечивает устойчивость штамма-продуцента (*E. coli* GR102) к невысоким концентрациям амоксицилина/клавулановой кислоты (МПК 64 мкг/мл) и цефтазидима (МПК 1 мкг/мл) [55].

β -Лактамаза TEM-68 (CMT-2) объединяет мутации, характерные для TEM-47 (Сер-238, Лиз-240, Мет-265) и IRT-9 (Лей-275). При этом гидролитическая активность TEM-68 в отношении цефалоспоринов расширенного спектра сопоставима с активностью TEM-47, но в меньшей степени подавляется клавулановой кислотой и тазобактамом [56].

Возможно, что эволюционно более эффективным путем формирования одновременной устойчи-

вости к ингибиторозащищенным пенициллинам и оксиимино- β -лактамам является продукция нескольких β -лактамаз, которая неоднократно отмечалась у клинических штаммов энтеробактерий [2, 3, 57].

4. Современные методы диагностики и типирования β -лактамаз

4.1. Фенотипические методы

4.1.1. Хромогенные тесты для обнаружения продукции β -лактамаз

Продукция β -лактамаз у многих видов микроорганизмов может быть выявлена с помощью чувствительных хромогенных тестов, основанных на использовании специальных субстратов, изменяющих окраску в результате расщепления, или на наблюдении реакции, сопряженной с процессом гидролиза β -лактамов [12].

Наиболее широко используемым хромогенным

субстратом является нитроцефин – цефалоспорин, расщепляемый большинством β -лактамаз с образованием продукта, окрашенного в интенсивно-красный цвет [58]. Наблюдение реакции гидролиза нитроцефина в растворе или на бумажных дисках, инокулированных исследуемой бактериальной культурой, является наиболее быстрым, чувствительным и специфичным тестом на наличие β -лактамаз.

Альтернативные методы детектирования β -лактамазной активности включают йодометрические и ацидометрические тесты. Первый вид исследований основан на способности продуктов гидролиза β -лактаманых антибиотиков восстанавливать йод до йодида, вызывая обесцвечивание йодокрахмального комплекса [12]. Изменение окраски кислотно-основных индикаторов, например бромкрезолового пурпурного, вызванное появлением дополнительной карбоксильной группы при расщеплении β -лактаманого кольца, является основой использования ацидометрических методов [12].

Для некоторых видов возбудителей, особенно *Haemophilus* spp. и *Neisseria* spp., выявление продукции β -лактамаз с помощью хромогенных тестов считается основным предиктором чувствительности к β -лактамам [3]. Однако для большинства микроорганизмов, в первую очередь для представителей семейства *Enterobacteriaceae*, важно не столько наличие β -лактамаз, сколько тип продуцируемых ферментов, который определяет спектр антибиотикорезистентности.

4.1.2. Анализ антибиотикограммы

Первичная информация о характере β -лактамаз может быть получена на основании анализа профилей чувствительности штаммов-продуцентов. В частности, при наличии у клинических штаммов *K. pneumoniae* резистентности к пенициллинам и цефалоспорином I–III поколений дополнительное

определение чувствительности к цефокситину или цефотетану позволяет дифференцировать продукцию плазмидно-кодируемых β -лактамаз класса C (*AmpC*) и ESBL, относящихся к молекулярному классу A [3].

В отдельных работах показано, что с помощью количественной оценки чувствительности к широкому спектру β -лактаманых антибиотиков (20 и более субстратов) возможна более точная идентификация β -лактамаз, относящихся к одной функциональной группе, например нескольких ESBL-производных TEM и SHV (табл. 4) [59]. Однако метод типирования β -лактамаз, основанный на интерпретации данных определения чувствительности, имеет существенные ограничения.

Во-первых, многие ферменты, отличающиеся структурно, могут вызывать сходные профили антибиотикорезистентности у штаммов-продуцентов. Так, механизмы устойчивости *E. coli* к ингибиторозащищенным пенициллинам, связанные с гиперпродукцией пенициллиназ TEM-1 и TEM-2, продукцией IRT или β -лактамаз OXA-типа, невозможно дифференцировать на основании оценки антибиотикограммы [60].

Во-вторых, спектр устойчивости и МПК различных β -лактаманов могут изменяться в зависимости от количества вырабатываемого фермента, что особенно важно учитывать при диагностике ESBL [3]. По данным О. Рапага и соавт., вариабельность МПК β -лактаманых антибиотиков, наблюдаемая у клинических штаммов *K. pneumoniae* с различным уровнем продукции SHV-5, не позволяет рассматривать анализ фенотипов резистентности как эффективный метод эпидемиологического типирования ESBL-продуцирующих штаммов [61].

В-третьих, идентификация невозможна при наличии у штаммов нескольких β -лактамаз или дополнительных механизмов устойчивости, таких,

Таблица 4. **Наборы антибиотиков, позволяющих дифференцировать продукцию различных β -лактамаз у энтеробактерий [59]**

Фермент	Ингибиторозащищенные пенициллины						Цефалоспорины						Другие β -лактамы						
	XL	AB	TLC	PTC	CE	CT	TZ	TZL	LO	CB	CR	CZ	PX	FZ	PM	XM	CN	IP	AT
SHV		+		+		+	+	+		+	+	+			+				+
TEM		+	+	+		+	+		+			+	+	+	+	+			+
OXA	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AmpC			+		+	+			+	+	+	+							+

Примечание. XL – амоксициллин/клавулановая кислота, AB – ампициллин/сульбактам, TLC – тикарциллин/клавулановая кислота, PTC – пиперациллин/тазобактам, CE – цефалотин, CT – цефотаксим, TZ – цефтазидим, TZL – цефтазидим/клавулановая кислота, LO – лоракарбеф, CB – цефтибутен, CR – цефпиром, CZ – цефтриаксим, PX – цефподоксим, FZ – цефодизим, PM – цефепим, XM – цефуроксим, CN – цефотетан, IP – имипенем, AT – азтреонам. (+) – отличительный субстрат.

как снижение проницаемости наружной мембраны [3]. В связи с этим следует отметить, что экспрессия множественных факторов устойчивости к β -лактамам антибиотикам становится все более распространенной, особенно среди госпитальных штаммов энтеробактерий [2, 41, 57].

4.1.3. Скрининговые методы выявления ESBL

Наиболее сложной является интерпретация результатов определения чувствительности ESBL-продуцирующих штаммов. Поскольку при тестировании таких штаммов значения МПК цефалоспоринов III–IV поколений не всегда достигают уровня резистентности (8–16 мкг/мл), возникает необходимость использования специальных методов диагностики ESBL [3]. Применяемые с этой целью фенотипические тесты основаны на эффекте подавления активности ESBL в отношении оксимино- β -лактамов в присутствии клавулановой кислоты.

Метод «двойных дисков» представляет вариант классического дискодиффузионного метода определения чувствительности, который позволяет обнаружить продукцию ESBL по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения, например цефтазидимом, расположенного на расстоянии 20–30 мм от диска, содержащего клавулановую кислоту, обычно в виде комбинации амоксициллин/клавуланат (рис. 3).

Известные модификации данного метода, повышающие эффективность детектирования ESBL, включают использование дисков с различными оксимино- β -лактамами, а также их размещение на разном удалении от диска, содержащего ингибитор [12].

Прямое сравнение уровней устойчивости к цефалоспоринам расширенного спектра и их комбинациям с клавулановой кислотой, используемое в ряде коммерчески доступных диагностических сис-

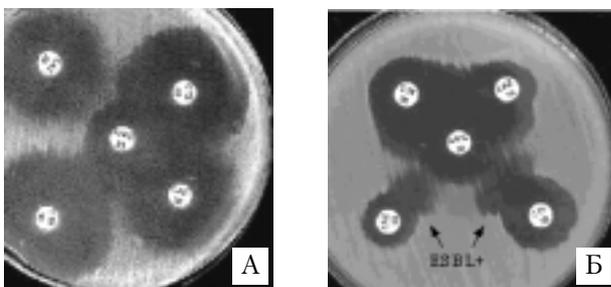


Рис. 3. Использование метода «двойных дисков» для выявления продукции ESBL: А – отрицательный результат, Б – положительный результат. Обозначения дисков: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), CAZ – цефтазидим (30 мкг), CTX – цефотаксим (30 мкг)

тем, обеспечивает более объективную оценку продукции ESBL.

В частности, критерием идентификации ESBL с помощью E-тестов (AB Biodisk, Швеция) является снижение МПК цефтазидима в 4 и более раз в присутствии клавулановой кислоты (2 мкг/мл) [62], а при использовании дисков, содержащих комбинации цефподоксима (10/1 мкг; Oxoid Ltd, Великобритания), цефтазидима и цефотаксима с клавулановой кислотой (30/10 мкг; MAST Ltd, Великобритания), – увеличение зоны подавления роста не менее чем на 6 мм [63], или в 1,5 раза [64] по сравнению с дисками, содержащими аналогичные субстраты без ингибитора.

Использование нескольких цефалоспоринов в качестве индикаторных субстратов, как правило, повышает эффективность выявления ESBL [12]. Цефтазидим может быть предпочтительным субстратом при тестировании *K. oxytoca*, поскольку в отличие от цефотаксима, цефтриаксона и азтреонама сохраняет активность в отношении штаммов, гиперпродуцирующих хромосомную β -лактамазу K1 [3], а при исследовании штаммов *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia* spp. с конститутивной экспрессией *ampC* наиболее чувствительными индикаторами продукции ESBL являются цефалоспорины IV поколения – цефепим и цефпиром [3].

4.1.4. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)

Использование ИЭФ для исследования β -лактамаз впервые описано А. Matthew и соавт. в 1975 г. [65]. Данный метод был первоначально использован для дифференциации хромосомных и плазмидно-кодируемых β -лактамаз грамотрицательных бактерий. Впоследствии он позволил идентифицировать множество ферментов, отличающихся значениями изоэлектрических точек.

Как правило, анализ β -лактамаз с помощью ИЭФ не требует их тонкой очистки, поскольку после электрофоретического разделения специфическая гидролитическая активность β -лактамаз может быть выявлена путем окрашивания гелей нитроцефином или другим хромогенным субстратом [65]. Модификации методов детектирования β -лактамазной активности в геле, в частности использование селективных ингибиторов (клавулановой кислоты, ЭДТА), позволяют установить не только значения изоэлектрических точек, но и принадлежность β -лактамаз к определенной функциональной группе [58].

Для выделения β -лактамаз перед ИЭФ обычно применяются такие быстрые методы, как разрушение наружной клеточной мембраны с помощью ультразвука, высокого давления, последовательно-

го замораживания–оттаивания, осмотического шока или хлороформной экстракции, с последующим центрифугированием для удаления разрушенных клеток [66].

При использовании готовых полиакриламидных гелей, содержащих амфолиты, определение изоэлектрических точек может быть проведено в течение нескольких часов [67]. Скорость анализа в сочетании с возможностью одновременного тестирования значительного количества штаммов позволяет использовать метод ИЭФ для исследования эпидемиологии β -лактамаз [58].

До середины 80-х годов прошлого века число известных плазмидных β -лактамаз не превышало 20. Все они могли быть дифференцированы с помощью ИЭФ [68]. В настоящее время только группы TEM и SHV ферментов насчитывают более 100 производных, многие из которых обладают идентичными значениями изоэлектрических точек (табл. 2, 3). Например, значения рI 5,4, 5,6 и 7,6, характерные для β -лактамаз TEM-1, TEM-2 и SHV-1, также соответствуют более 30 различным ESBL и IRT производным.

Кроме того, диапазоны рI TEM, OXA и SHV ферментов частично перекрываются, что в ряде случаев обуславливает невозможность их дифференциации на основании одних только данных изофокусирования.

4.1.5. Исследование ферментативной кинетики

Два типа исследований наиболее широко используются для определения кинетических параметров β -лактамаз: спектрофотометрия и рН-статическое титрование [12, 58].

Метод автоматического рН-титрования основан на измерении скорости добавления щелочного раствора, необходимого для поддержания стабильности рН в процессе ферментативного расщепления β -лактаманного субстрата. Данный метод более трудоемкий и требует большего расхода субстратов и исследуемого фермента, чем при спектрофотометрическом анализе.

Кроме того, при использовании рН-титрования определение скорости расщепления цефалоспоринов, образующих множественные заряженные продукты гидролиза, или цвиттерионных β -лактамов (ампициллина, имипенема, цефалоридина), растворы которых обладают буферной емкостью, может быть недостаточно точным [12].

Поскольку расщепление β -лактаманых антибиотиков в растворе обычно сопровождается снижением его оптической плотности в ультрафиолетовом диапазоне, спектрофотометрия обеспечивает наиболее удобный способ определения активности

β -лактамаз [58]. Быстрое сравнение ферментов можно провести путем определения относительной скорости гидролиза различных β -лактамов. Необходимыми условиями для этого являются:

- 1) использование насыщающей концентрации субстрата ($[S] \geq 1\text{ мМ}$), при которой скорость гидролиза приближается к максимальной (V_{max});
- 2) оценка начальной (наиболее быстрой) фазы реакции [12].

Точные значения V_{max} и константы Михаэлиса (K_m) могут быть получены только путем измерения скорости гидролиза не менее чем при 10 различных концентрациях каждого антибиотика ($0,2 \times K_m \leq [S] \leq 10 \times K_m$) или с помощью анализа полной кинетической кривой расщепления субстрата, начальная концентрация которого в 2,5–5 раз превышает K_m [58].

Исследование ферментативной кинетики позволяет выявить важнейшие функциональные особенности β -лактамаз. Оно является обязательным для описания новых ферментов и изучения их роли в формировании резистентности. Однако в связи с высокой трудоемкостью и высокой вероятностью погрешности измерений и расчета кинетических констант данный метод неприменим для типирования большого количества ферментов [58, 68, 69].

4.2. Генотипические методы

В последнее время развитие молекулярно-генетических методов, включая методы молекулярной гибридизации, *in vitro* амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определения нуклеотидной последовательности генов (*секвенирования*), сделало возможным их широкомасштабное использование в клинической лабораторной диагностике.

В области клинической микробиологии основой создания и внедрения в практику новых молекулярно-диагностических методов являются фундаментальные исследования генетической организации патогенных микроорганизмов. Благодаря накоплению и систематическому анализу информации о первичной структуре генов микроорганизмов стала возможной не только прямая генетическая идентификация (*генодиагностика*) возбудителей инфекционных болезней, но и исследование их наиболее важных свойств, таких, как вирулентность, токсигенность и чувствительность к антимикробным препаратам [70, 71].

4.2.1. Секвенирование генов β -лактамаз

Применительно к исследованию β -лактамаз определение кодирующих нуклеотидных последовательностей и сравнение их с последовательностями

ми известных генов являются необходимыми процедурами для описания новых ферментов [68]. Кроме того, вследствие недостаточной дифференцирующей способности фенотипических методов ДНК-секвенирование общепризнанно считается наиболее точным и надежным методом типирования известных β -лактамаз, включая различные производные плазмидных β -лактамаз TEM и SHV типов у клинических штаммов микроорганизмов [72].

В то же время определение полной нуклеотидной последовательности гена является трудоемким и дорогостоящим методом. Традиционные методы секвенирования включают предварительные этапы выделения и клонирования исследуемых фрагментов ДНК. При наличии информации о характере нуклеотидных последовательностей, фланкирующих исследуемый участок ДНК, в последнее время чаще применяется метод прямой амплификации и секвенирования соответствующих генов, который позволяет избежать необходимости их клонирования.

Использование автоматических систем секвенирования с возможностью детектирования нерадиоактивной метки позволяет дополнительно снизить трудоемкость и повысить безопасность анализа. При сравнении различных методов определения нуклеотидной последовательности генов SHV β -лактамаз показано, что автоматическое секвенирование с использованием флуоресцентно меченных дидезокситерминаторов (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, США) предпочтительнее по сравнению с традиционными методами, так как позволяет избежать ошибок, связанных с высокой Г+Ц насыщенностью bla_{SHV} генов ($\approx 61\%$) относительно генов других плазмидных β -лактамаз (содержание Г+Ц: 49, 41 и 50% для bla_{TEM-1} , bla_{PSE-1} и bla_{OXA-1} соответственно) [73].

Вследствие значительной протяженности генов β -лактамаз (>1000 пн) определение их полной нуклеотидной последовательности обычно требует проведения нескольких реакций секвенирования с использованием праймеров, комплементарных внутренним участкам гена, что увеличивает стоимость и трудоемкость анализа.

Таким образом, метод ДНК-секвенирования в настоящее время не может быть использован для анализа β -лактамаз у большого количества клинических штаммов, например, при эпидемиологических исследованиях [69].

4.2.2. ДНК-гибридизация

Гибридизация с ДНК-зондами, которые представляют протяженные (>200 пн) участки β -лактамных генов,

может быть использована для выявления ферментов определенной генетической группы, например TEM, SHV-OHIO-LEN, OXA, PSE [68].

В случае плазмидной локализации генов β -лактамаз и при наличии данных рестрикционного картирования ДНК-зонды могут быть получены путем выделения соответствующих рестрикционных фрагментов. В последнее время для получения гибридных зондов чаще применяется ПЦР с праймерами, комплементарными внутренним фрагментам генов β -лактамаз.

Недостатком использования полинуклеотидных зондов является их способность к кросс-гибридизации с генами различных β -лактамаз, принадлежащих к одной генетической группе, и невозможность типирования с их помощью различных производных, отличающихся по спектру мутаций.

Использование олигонуклеотидных зондов для дифференциации близкородственных β -лактамаз TEM-1 и TEM-2 впервые описали в 1987 г. M. Ouellette и соавт. [74]. В 1990 г. C. Mabilat и P. Courvalin предложили использование синтетических гептадекануклеотидных фрагментов, комплементарных участкам bla_{TEM} генов с известными позициями нуклеотидных замен, для типирования TEM β -лактамаз у клинических штаммов энтеробактерий методом блот-гибридизации колоний [75].

Дизайн первоначально предложенных 12 олигонуклеотидных зондов был основан на данных структуры 5 участков, мутации в которых обуславливают различия между пенициллиназами TEM-1 и TEM-2, а также первых 5 производных TEM с расширенным спектром активности TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-6 и TEM-7. Скрининг коллекции из 256 ESBL-продуцирующих клинических штаммов энтеробактерий с помощью предложенных олигонуклеотидных зондов позволил выявить не только ранее описанные ферменты, но и ряд производных с альтернативными комбинациями известных аминокислотных замен TEM-13, TEM-14 и TEM-19. Для типирования ESBL были также успешно использованы нерадиоактивные (биотинилированные) зонды [76].

Впоследствии были разработаны олигонуклеотидные зонды для типирования ингибиторорезистентных производных TEM, отличающихся заменами аминокислот в позициях 69 (TEM-32, -33, -34, -35, -37, -38, -39), 244 (TEM-30, -31) и 276 (TEM-35, -36, -37, 39) [77]. Для их идентификации у клинических штаммов *E. coli* были использовано 15 зондов с различными вариантами нуклеотидных замен, соответствующих 3 позициям в полипептидной цепи TEM.

Благодаря высокой точности и производительности метод гибридизации с олигонуклеотидными зондами (олиготипирования) широко используется для изучения распространенности ТЕМ β -лактамаз с определенным спектром мутаций. Однако по мере увеличения количества описываемых ТЕМ-производных и обнаружения новых мутаций в генах, кодирующих ферменты этой группы, дефинитивное определение β -лактамаз с помощью олиготипирования становится технически все более затруднительным из-за необходимости использования большого количества зондов.

В частности, уже сейчас в генах $bla_{\text{ТЕМ}}$ описано более 30 нуклеотидных замен, приводящих к заменам аминокислот, и приблизительно равное количество молчащих мутаций. С учетом их взаимного расположения анализ всех «функциональных» мутаций с помощью олиготипирования в формате блот-гибридизации становится практически невозможным.

Вероятно, в будущем разработка методов микрогибридизации в формате ДНК-чипов, допускающих использование сотен и тысяч олигонуклеотидных зондов, позволит решить проблему типирования β -лактамаз данной группы.

4.2.3. Использование ПЦР для исследования β -лактамаз

ПЦР является одним из наиболее практически значимых молекулярно-диагностических методов, который широко используется для выявления и исследования различных детерминант устойчивости к антибиотикам у клинических штаммов микроорганизмов, включая гены β -лактамаз [71].

В качестве самостоятельного диагностического метода ПЦР, как и гибридизация, может быть использована для выявления известных β -лактамаз, относящихся к определенной генетической группе. Благодаря преимуществу в чувствительности ПЦР в некоторых случаях позволяет установить наличие микроорганизмов, продуцирующих β -лактамазы, непосредственно в клинических образцах без предварительного культивирования.

Так, например, F. Tenover и соавт. описали использование ПЦР с праймерами, специфичными для генов ТЕМ и ROV β -лактамаз, для прямого обнаружения штаммов *H. influenzae*, резистентных к ампициллину, в образцах спинномозговой жидкости [78]. При этом выявлена почти 100% корреляционная связь между выявлением $bla_{\text{ТЕМ}}$ генов, результатами определения чувствительности выделенных штаммов *H. influenzae* к ампициллину и детектирования продукции β -лактамаз с помощью нитроцефина.

Аналогичный метод ПЦР разработали J.-L. Simard и P. Roy для выявления продукции пенициллиназы ТЕМ-1 у штаммов *N. gonorrhoeae* [79].

Для большинства видов семейства *Enterobacteriaceae* положительный или отрицательный результат амплификации не имеет такого диагностического значения, как для *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*, в связи с разнообразием продуцируемых энтеробактериями β -лактамаз, различия между которыми в большей степени влияют на характер устойчивости к β -лактамам антибиотикам. Необходимость дифференциации генов β -лактамаз, отличающихся спектром мутаций, требует привлечения дополнительных методов анализа соответствующих ПЦР-продуктов [80].

Известные методы быстрого выявления точечных мутаций в фрагментах ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР, можно условно разделить на *четыре* основные группы:

- 1) методы селективного расщепления рестриционными эндонуклеазами, например, анализ *полиморфизма длины рестриционных фрагментов* (ПДРФ);

- 2) методы анализа конформационных изменений ДНК, связанных с появлением мутаций, включая наиболее часто используемый метод *одноцепочечного конформационного полиморфизма* (SSCP);

- 3) методы гибридизации с внутренними олигонуклеотидными зондами или амплификации с праймерами, комплементарными участкам мутаций;

- 4) методы химического или ферментативного расщепления гетеродуплексов в участках неспаренных оснований [80].

До настоящего времени только 3 метода были использованы для исследования β -лактамаз: ПДРФ, SSCP и *лигазная цепная реакция* (ЛЦР).

4.2.4. Полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ)

Метод ПДРФ основан на способности рестриционных эндонуклеаз расщеплять двухцепочечную ДНК в участках с определенной нуклеотидной последовательностью – *сайтах рестрикции*. Благодаря этому любые изменения первичной структуры генов, связанные с исчезновением или появлением нового сайта рестрикции, могут быть обнаружены путем амплификации, расщепления с помощью соответствующих рестриктаз и электрофоретического разделения полученных фрагментов ДНК (рис. 4).

Как один из наиболее доступных методов, ПЦР–ПДРФ-анализ был использован для выявления мутаций, приводящих к развитию устойчивости к различным препаратам у многих видов микро-

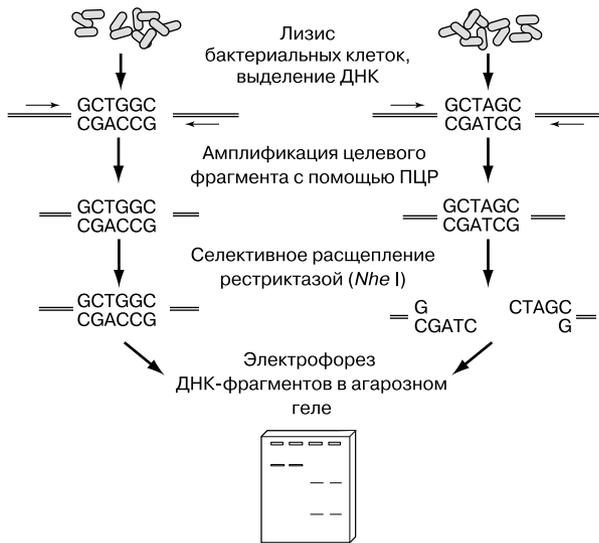


Рис. 4. Алгоритм ПЦР–ПДРФ-анализа

организмов: ванкомицину (*vanC*) у *Enterococcus* spp., изониазиду (*katG*) и стрептомицину (*rrs*) у *M. tuberculosis*, фторхинолонам (*gyrA*) у *E. coli* и β -лактамам (*bla*_{TEM} и *bla*_{SHV}) у *E. coli*, *K. pneumoniae* и других энтеробактерий [70].

Применение ПЦР–ПДРФ для анализа генов TEM β -лактамаз впервые описали G. Arlet и соавт. в 1995 г. [81]. Этот метод позволил охарактеризовать отдельные мутации в генах 10 контрольных TEM ферментов и исследовать на генетическом уровне различия между β -лактамазами расширенного спектра TEM-20, TEM-21 и TEM-29, которые были выявлены у клинических штаммов *K. pneumoniae* и предварительно описаны только с использованием биохимических тестов.

Однако следует отметить, что секвенирование *bla*_{TEM-20}, *bla*_{TEM-21} и *bla*_{TEM-29}, проведенное той же группой авторов в 1999 г., позволило внести дополнительные изменения и уточнения в структуру соответствующих ферментов, предсказанную на основании данных ПДРФ [82].

M. Canica и соавт. исследовали с помощью ПЦР–ПДРФ и секвенирования гены ингибиторорезистентных TEM β -лактамаз у 27 клинических штаммов *E. coli* и на основании спектра выявленных мутаций показали возможность конвергентной эволюции IRT от двух различных генетических линий, представленных рестрикционными группами *bla*_{TEM-1b} и *bla*_{TEM-2} производных [83].

В 1996 г. M.T. Nuesch-Inderbinen и соавт. предложили метод обнаружения ESBL SHV-типа, основанный на ПЦР-амплификации *bla*_{SHV} генов и их селективном расщеплении рестриктазой *Nhe* I, так называемый ПЦР/*Nhe* I тест [84].

Расширенный спектр ферментативной активности у производных SHV-1 обычно связан с заменой Гли₂₃₈→Сер [29]. В свою очередь, эта аминокислотная замена является следствием Г→А транзиции в кодирующей нуклеотидной последовательности и сопровождается формированием уникального сайта рестрикции *Nhe* I (Г↓ЦТАГЦ). Положительный результат расщепления *bla*_{SHV} ампликона с помощью *Nhe* I свидетельствует, таким образом, о наличии ESBL.

ПЦР/*Nhe* I тест был использован для анализа контрольных штаммов, продуцирующих β -лактамазы SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-5 и SHV-7, а также 34 клинических штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* и *S. enterica*, ДНК которых гибридизовалась с внутренним зондом *bla*_{SHV}. При этом специфичность детектирования ESBL составила 100%, а чувствительность – 97%. В то же время чувствительность стандартного метода Е-тестов, с которым проводилось сравнение, с учетом современных критериев интерпретации оказалась менее 65%.

Необходимо отметить, что некоторые недавно описанные ESBL, включая SHV-6, SHV-8 и SHV-11, не могут быть обнаружены с помощью ПЦР/*Nhe* I теста, поскольку гены этих ферментов отличаются мутациями в других кодонах и не содержат сайт рестрикции *Nhe* I. Кроме того, исследования по сайтнонаправленному мутагенезу SHV β -лактамаз в позиции 238 показывают, что замены глицина не только серином, но и другими аминокислотами, не связанные с образованием сайта *Nhe* I в нуклеотидной последовательности, также могут вызывать резистентность к цефотаксиму и цефтазидиму [85].

В целом узкий спектр детектируемых мутаций является наиболее существенным ограничением для использования метода ПЦР–ПДРФ применительно к исследованию β -лактамаз.

4.2.5. Одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP)

Метод SSCP впервые описали M. Orita и соавт. в 1989 г. для обнаружения мутаций в генах человека [86]. Впоследствии метод использован для диагностики наследственных и соматических генетических болезней. В настоящее время ПЦР–SSCP-анализ также широко применяется в клинической молекулярной микробиологии. Список известных приложений этого метода включает видовое и субвидовое типирование патогенных микроорганизмов [87], выявление мутаций в различных генах, связанных с формированием антибиотикорезистентности, например *katG*, *inhA*, *ahpC*, *rpoB*, *embB*, *gyrA* у *M. tuberculosis* [70], *bla*_{TEM} и *bla*_{SHV} у энтеробактерий [60, 69].

Метод SSCP основан на эффекте влияния точечных мутаций на электрофоретическую подвижность коротких (100–450 нуклеотидов) одноцепочечных фрагментов ДНК (оцДНК) при их разделении в нативных условиях. В ходе SSCP-анализа фрагменты ДНК, полученные в результате ПЦР, подвергаются температурной денатурации (плавлению) и быстрому охлаждению с целью стабилизации разделенных цепей ДНК. Каждая из цепей приобретает определенную конформацию, которая зависит от формирования внутренних участков комплементарности и, следовательно, от взаимного расположения нуклеотидов в цепи.

Полученные оцДНК конформеры разделяются с помощью неденатурирующего электрофореза в высокоразрешающем полиакриламидном геле при пониженной температуре (4–20°C), обеспечивающей устойчивость их пространственной структуры. Единичные нуклеотидные замены приводят к заметному изменению подвижности исследуемой ДНК по сравнению с контрольной (рис. 5).

V. Speldooren и соавт. впервые применили метод ПЦР–SSCP для исследования генов IRT [60]. В связи с необходимостью анализа полной нуклеотидной последовательности *bla*_{TEM} (≈1000 пн), три пары праймеров были использованы для амплификации частично перекрывающихся фрагментов ДНК, соответствующих промоторной (388 пн) и структурной частям гена (426 и 418 пн). SSCP-анализ этих фрагментов позволил дифференцировать гены с известной нуклеотидной последовательностью *bla*_{TEM-1a, -1b, -2, -30, -32, -35} и выявить новые мутации в генах *bla*_{TEM-33, -34, -36, -37, -38, -39}, предварительно идентифицированных с помощью олиготипирования.

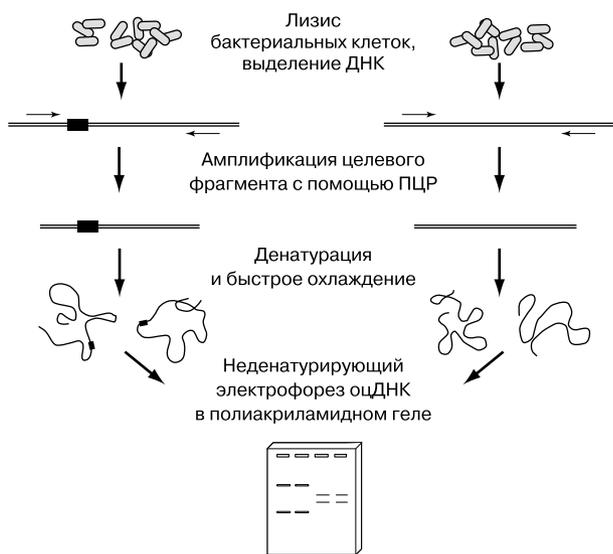


Рис. 5. Алгоритм ПЦР–SSCP-анализа

При исследовании 8 клинических штаммов *E. coli*, выделенных в одном стационаре и отличающихся резистентностью к ингибиторозащищенным пенициллинам, данный метод позволил установить гиперпродукцию пенициллиназы TEM-1 у 3 штаммов, а также наличие известных β-лактамаз TEM-30, TEM-32, TEM-35 и нового фермента TEM-58 с уникальной комбинацией аминокислотных замен (Arg₂₄₄→Сер и Val₂₆₁→Иле) у 4 других штаммов.

Одновременно с разработкой метода ПЦР–SSCP для исследования IRT β-лактамаз в 1995–1998 гг. была показана возможность использования этого подхода для генетического типирования отдельных ферментов группы SHV [69, 88].

Метод SSCP, предложенный F.H. M'Zali и соавт. для дифференциации SHV-производных, предполагает анализ отдельного участка *bla*_{SHV} гена длиной 475 пн, который включает позиции наиболее частых нуклеотидных замен. Соответствующий этому участку ПЦР-продукт подвергается расщеплению рестриктазой *Pst* I на 2 фрагмента (300 и 175 пн), которые затем анализируются с помощью SSCP-электрофореза и окрашивания серебром.

Несмотря на ограничения, связанные с невозможностью оценки полной нуклеотидной последовательности гена, данный вариант SSCP успешно использован для дифференциации β-лактамаз SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-7 у контрольных штаммов [69, 88], а также у большого числа госпитальных ESBL-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в различных медицинских центрах [40]. При этом для выборочно исследованных культур было показано наличие корреляции между результатами SSCP-типирования и определения нуклеотидной последовательности амплифицируемого фрагмента *bla*_{SHV}.

Тем не менее многие ферменты, например SHV-1, SHV-2a и SHV-11, а также SHV-6 и SHV-12, не могут быть дифференцированы с использованием данного подхода, поскольку мутация Лей₃₅→Глн, определяющая различия между ними, находится за пределами амплифицируемого фрагмента ДНК. Для решения этой проблемы авторы предложили параллельное использование методов ПЦР–SSCP и ПЦР–ПДРФ, последний из которых предполагает амплификацию более широкого участка *bla*_{SHV} гена и его расщепление рестриктазой *Dde* I [89].

Задача скрининга мутаций в полной нуклеотидной последовательности генов TEM и SHV β-лактамаз может быть также решена путем последовательной рестрикции протяженных ПЦР-продуктов и SSCP-анализа полученных рестрикционных фрагментов ДНК. Основным преимуществом данного подхода, известного как REF–SSCP (одноце-

почечный конформационный полиморфизм рестриционных фрагментов), является его высокая производительность в сочетании с возможностью выявления широкого спектра известных и неизвестных точечных мутаций.

Метод REF–SSCP успешно использован нами для дифференциации многочисленных вариантов TEM и SHV β -лактамаз. В частности, нерадиоактивный SSCP-анализ *Taq* I–*Pst* I-рестриционных фрагментов *bla*_{TEM} генов позволил выявить спектр мутаций, определяющих различия между пенициллиназами TEM-1, TEM-2 и их производными с расширенным спектром активности TEM-3, TEM-4, TEM-7, TEM-9, TEM-12, TEM-26, а применение альтернативной комбинации рестриктаз *Taq* I–*Ava* II – обнаружить мутации, характерные для IRT-производных TEM-32, TEM-37, TEM-39 [90].

Аналогичный подход с использованием рестриктаз *Bsa*O I–*Nhe* I предложен для дифференциации ферментов SHV-группы SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-6 [91].

Необходимо отметить, что при наличии оборудования, обеспечивающего высокую стандартизацию условий SSCP-анализа, данный подход может быть использован как один из наиболее эффективных методов исследования эпидемиологии TEM и SHV β -лактамаз. Однако наиболее существенным его недостатком является невозможность определения характера выявленных мутаций, а следовательно, точного типирования ферментов.

4.2.6. Лигазная цепная реакция (ЛЦР)

ЛЦР представляет собой метод многократного последовательного лигирования олигонуклеотидных праймеров, комплементарных исследуемой последовательности ДНК, осуществляемый термостабильной лигазой.

В каждой реакции ЛЦР используются две взаимокплементарные пары праймеров. При условии строгого соответствия целевой последовательности ДНК праймеры каждой пары связываются с одной из ее цепей таким образом, что 5'-конец одного праймера располагается непосредственно вслед за

3'-концом другого, создавая возможность их ковалентного связывания с помощью ДНК-лигазы. В последующих циклах ЛЦР связавшиеся олигонуклеотиды могут служить матрицей для отжига и лигирования праймеров комплементарной пары.

Таким образом, реакция носит циклический характер и может быть использована для чувствительного обнаружения точечных мутаций в участках связывания праймеров [70].

Использование ЛЦР для детектирования мутаций в генах SHV β -лактамаз, предварительно амплифицированных с помощью ПЦР, предложили J. Kim и Y. Kwon в 1999 г. [92]. Они показали возможность дифференциации генов 7 контрольных β -лактамаз (SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-12) с помощью 4 наборов ЛЦР-праймеров (16 олигонуклеотидов), соответствующих участкам мутаций Лей₃₅→Глн, Арг₂₀₅→Лей, Гли₂₃₈→Сер и Глу₂₄₀→Лиз.

5. Заключение

Многообразие β -лактамаз, их широкое распространение среди грамотрицательных бактериальных возбудителей инфекций и одновременно ведущая роль в формировании устойчивости к β -лактамам антибиотикам диктуют необходимость всестороннего изучения и внедрения в широкую практику надежных и максимально стандартизованных методов их диагностики. В частности, важное практическое значение имеет использование клинико-диагностическими лабораториями чувствительных хромогенных тестов для выявления продукции β -лактамаз у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*, а также фенотипическое определение ESBL у госпитальных штаммов энтеробактерий.

Вместе с тем изучение разнообразия, свойств и эпидемиологии β -лактамаз является важной задачей специализированных референтных лабораторий, исследующих механизмы устойчивости к β -лактамам. Успех в решении этой задачи в значительной степени определяется возможностью комплексного использования современных фенотипических и молекулярно-генетических методов исследования.

Литература

1. Webb E. C., editor. Enzyme nomenclature. London: Academic Press Inc. (London) Ltd.; 1984. p. 366-74.
2. Bush K. The evolution of β -lactamases. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. John Willey & Sons; 1997. p. 152-69.
3. Livermore D.M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Reviews 1995; 8: 557-84.
4. Bush K., Jacoby G., Medeiros A. Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
5. Rasmussen B.A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:223-32.
6. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940; 373:837.

7. Fleming P.C., Goldner M., Glass D.G. Observations on the nature, distribution, and significance of cephalosporinase. *Lancet* 1963; 1:1399-401.
8. Richmond M.H., Sykes R.B. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9:31-88.
9. Sykes R.B., Matthew M. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2:115-57.
10. Mitsuhashi S., Inoue M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. In: Mitsuhashi S., editors. *Beta-lactam antibiotics*. New York: Springer-Verlag; 1981. p. 41-56.
11. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol.)* 1980; 289:321-31.
12. Livermore D.M., Williams J.D. β -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V., editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 503-78.
13. Livermore D.M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78 (Suppl.):7-16.
14. Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M. Catalytic properties of class A β -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998; 1:581-98.
15. Tzouveleki L.S., Tzelepi E., Tassios P.T., Legakis N.J. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14:137-42.
16. Bonomo R.A., Rice L.B. Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Frontiers Bioscience* 1999; 4:34-41.
17. Nicolas-Chanoine M.H. Inhibitor-resistant β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:1-3.
18. Prinarakis E.E., Miriagou V., Tzelepi N., Gazouli M., Tzouveleki L.S. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
19. Huovinen S., Huovinen P., Jacoby G.A. Detection of plasmid-mediated β -lactamases with DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:175-9.
20. Roy C., Segura C., Tirado M., Reig R., Hermida M., Tervel D., et al. Frequency of plasmid determined beta-lactamases in 680 consecutively isolated strains of *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1986; 4:146-7.
21. Simpson I.N., Harper P.B., O'Callaghan C.H. Principal β -lactamases responsible for resistance to β -lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:929-36.
22. Du Bois S.K., Marriott M.S., Amyes S.G. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:7-22.
23. Wiedemann B., Kliebe C., Kresken M. The epidemiology of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 (Suppl. B.):1-22.
24. Chen S.T., Clowes R.S. Variation between the nucleotide sequences of *Tn1*, *Tn2*, and *Tn3* and expression of β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987; 169:913-6.
25. Goussard S., Courvalin P. Sequences of the genes *blaT-1B* and *blaT-2*. *Gene* 1991; 102:71-3.
26. Thomson C.J., Amyes S.G. Molecular epidemiology of the plasmid-encoded TEM-1 β -lactamase in Scotland. *Epidemiol Infect* 1993; 110:117-25.
27. Bonnet R., De Champs C., Sirot D., Chanal C., Labia R., Sirot J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2671-7.
28. Palzkill T., Thomson K.S., Sanders C.C., Moland E.S., Huang W., Milligan T.W. New variant of TEM-10 β -lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:199-200.
29. Heritage J., M'Zali F.H., Gascoyne-Binzi D., Hawkey P.M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:309-18.
30. Huletsky A., Couture F., Levesque R.C. Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1725-32.
31. Knox J.R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2593-601.
32. Kuzin A.P., Nukaga M., Nukaga Y., Hujer A.M., Bonomo R.A., Knox J.R. Structure of the SHV-1 β -lactamase. *Biochemistry* 1999; 4:5720-7.
33. Siu L.K., Ho P.L., Yuen K.Y., Wong S.S., Chau P.Y. Transferable hyperproduction of TEM-1 β -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the pribnow box. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41:468-70.
34. Wu P.J., Shannon K., Phillips I. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:927-39.
35. Payne D.J., Marriot M.S., Amyes S.G.B. Characterisation of a unique ceftazidime hydrolysing β -lactamase, TEM-E2. *J Med Microbiol* 1990; 32:131-4.
36. Heritage J., Hawkey P.M., Todd N., Lewis I.J. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1981-6.
37. Knothe H., Shah P., Kremery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315-7.
38. Kliebe C., Nies B. A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M., Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-7.
39. Jacoby G.A., Medeiros A.A. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1697-704.
40. Yuan M., Aucken H., Hall L.M., Pitt T.L., Livermore D.M. Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum β -lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:527-39.
41. Сидоренко С. В. Механизмы антибиотикорезистентности. В кн: Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлова С.Н., под ред. Антибактериальная терапия. Практическое руководство. Москва: Фармединфо; 2000. с. 1-6.

42. Arlet G., Rouveau M., Casin I., Bouvet P.J., Lagrange P. H., Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2553-8.
43. Hibbert-Rogers L.C., Heritage J., Todd N., Hawkey P.M. Convergent evolution of TEM-26, a β -lactamase with extended-spectrum activity. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:707-20.
44. Peixe L.V., Sousa J.C., Perez-Diaz J.C., Baquero F. A bla(TEM-1b)-derived TEM-6 β -lactamase: a case of convergent evolution. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1206.
45. Jacoby G.A., Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:164-9.
46. Jacoby G., Bush K. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. [cited 2000 Jul 24] Available from: URL: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.
47. Ambler R.P. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* 1991; 276:269-72.
48. Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers S., Ansquer M., Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; II:302-6.
49. Thomson C.J., Shanahan P.M., Amyes S.G. Nucleotide sequences of inhibitor-resistant TEM β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:572-3.
50. Chaibi E.B., Sirot D., Paul G., Labia R. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristic. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:447-58.
51. Henquell C., Sirot D., Chanal C., De Champs C., Chatron P., Lafeuille B., Texier P., Sirot J., Cluzel R. Frequency of inhibitor-resistant TEM β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in France. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:707-14.
52. Bret L., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 β -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38:183-91.
53. Bermudes H., Jude F., Chaibi E.B., Arpin C., Bebear C., Labia R., Quentin C. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived β -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1657-61.
54. Lemozy J., Sirot D., Chanal C., Huc C., Labia R., Dabernat H., Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2580-2.
55. Sirot D., Recule C., Chaibi E.B., Bret L., Croize J., Chanal-Claris C., Labia R., Sirot J. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1322-5.
56. Fielt J., Palucha A., Miaczynska B., Stankiewicz M., Przondo-Mordarska H., Hryniewicz W., Gniadkowski M. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiellae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1499-505.
57. Winokur P.L., Eidelstein M.V., Stetsiouk O., Strachounski L., Blahova J., Reshedko G.K., Croco M.A.T., Hollis R.J., Pfaller M.A., Jones R.N. Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:103-8.
58. Payne D.J., Farmer T.H. Biochemical and enzyme kinetic Applications for the Characterization of β -lactamases. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 513-35.
59. Bolmstrom A., Nordstrom U., Kolar D. Etest for fingerprinting of bacteria producing β -lactamases. *Proceedings of the 19th International Congress of Chemotherapy; Montreal; 1995. Abstr. P4226*.
60. Speldooren V., Heym B., Labia R., Nicolas-Chanoine M.-H. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:879-84.
61. Paniara O., Platsouka E., Dimopoulou H., Tzelepi E., Miragou V., Tzouveleki L.S. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *J Chemother* 2000; 12:204-7.
62. Cormican M.G., Marshall S.A., Jones R.N. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen. *J Clin. Microbiol* 1996; 34:1880-4.
63. M'Zali F.H., Chanawong A., Kerr K.G., Birkenhead D., Hawkey P.M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E test ESBL. *J. Antimicrob. Chemother* 2000; 45:881-5.
64. Appleton A., Hall S. Evaluation of a novel diagnostic disc method for detection of extended-spectrum β -lactamases. *Proceedings of the 3rd European Congress of Chemotherapy; Madrid; 2000. Abstr. T304*.
65. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88:169-78.
66. Arstila T., Jacoby G.A., Huovinen P. Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of β -lactamases by isoelectric focusing. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32:809-16.
67. Huovinen S. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia PhastSystem. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:1730-2.
68. Payne D.J., Thomson C.J. Molecular Approaches for the Detection and Identification of β -lactamases. *Molecular Bacteriology*. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 495-512.

69. M'Zali F.H., Gascoyne-Binzi D.M., Heritage J., Hawkey P.M. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 797-802.
70. Cockerill III F.R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:199-212.
71. Saunders N.A., Clewley J.P. DNA amplification: general concepts and methods. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 63-82.
72. Mabilat C., Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. In: Persing D., Smith T., editors. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington: ASM, 1993; p. 553-9.
73. Bradford P.A. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla_{SHV}* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2960-3.
74. Ouellette M., Rossi J.J., Bazin R., Roy P.H. Oligonucleotide probes for the detection of TEM-1 and TEM-2 β -lactamase genes and their transposons. *Can J Microbiol* 1987; 33:205-11.
75. Mabilat C., Courvalin P. Development of «oligotyping» for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2210-6.
76. Tham T.N., Mabilat C., Courvalin P., Guesdon J.L. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 57:109-15.
77. Henquell C., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM β -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:427-30.
78. Tenover F.C., Huang M.B., Rasheed J.K., Persing D.H. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2729-37.
79. Sanchez-Pescador R., Stempien M.S., Urdea M.S. Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 β -lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1934-8.
80. Taylor G.R., editor. *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*. Boca Raton: CRC Press.; 1997. p. 37-9.
81. Arlet G., Brami G., Decre D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange P.H., Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-8.
82. Arlet G., Goussard S., Courvalin P., Philippon P. Sequences of the genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:969-71.
83. Canica M.M., Lu C.Y., Krishnamoorthy R., Paul G.C. Molecular diversity and evolution of *bla_{TEM}* genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *J Mol Evol* 1997; 44:57-65.
84. Nuesch-Inderbinen M.T., Hachler H., Kayser F.H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:399-402.
85. Hujer K.M., Hujer A.M., Bonomo R.A. Site-saturation mutagenesis of the 238 position in the SHV-1 beta-lactamase. *Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco; 1999. Abstr. 2051.
86. Orita M., Ivahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
87. Widjojoatmojo M.N., Fluit A.C., Verhoef J. Rapid Identification of Bacteria by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32:3002-7.
88. M'Zali F.H., Heritage J., Gascoyne-Binzi D.M., Snelling A.M., Hawkey P.M. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:123-5.
89. Chanawong A., M'Zali F.H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P.M. Characterisation of extended-spectrum β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett*; 1:85-9.
90. Edelstein M.V., Stratchounski L.S. Development of single-strand conformational polymorphism (SSCP) PCR Method for discriminatory detection of genes coding for TEM-family β -lactamases. *Proceedings of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Diego; 1998. Abstr. E-96.
91. Edelstein M., Edelstein I., Suvorov M., Kozlov R. Differentiation of SHV-type β -lactamases by REF-SSCP analysis of entire *bla_{SHV}* gene sequence *Proceedings of the 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Stockholm; 2000. Abstr. TuP233.
92. Kim J., Kwon Y. Development of ligase chain reaction (LCR)-PCR method for discriminatory detection of genes coding for SHV variants. *Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco; 1999. Abstr. 2051.