

УДК 579.841.11:577.18

К. М. Нестерук, І. Є. Соколова, О. В. Братусь

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

**РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA – ПРОДУЦЕНТІВ
МЕТАЛО- β -ЛАКТАМАЗ**

У багатьох країнах із клінічного матеріалу виділено грамнегативні мікроорганізми, що виявилися продуцентами метало- β -лактамаз. Досліджено полірезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa*, виділені із сечі пацієнтів. Оцінено чутливість штамів до іміпенему та досліджено продукцію карбапенемгідролізуювальних ферментів у резистентних і помірно стійких штамів. За результатами фенотипового тесту встановлено високий рівень розповсюдженості метало- β -лактамаз. Це зумовлює необхідність здійснення моніторингу за поширенням продуцентів ферментів, які гідролізують карбапенеми.

Е. Н. Нестерук, И. Е. Соколова, Е. В. Братусь

Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ
ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* – ПРОДУЦЕНТОВ
МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗ**

Во многих странах из клинического материала выделены грамотрицательные микроорганизмы, которые оказались продуцентами метало- β -лактамаз. Исследованы полирезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из мочи пациентов. Оценена чувствительность штаммов к имипенему и исследована продукция карбапенемгидролизующих ферментов у резистентных и умеренно стойких штаммов. При использовании фенотипического теста установлен высокий уровень распространенности метало- β -лактамаз. Это обуславливает необходимость проведения мониторинга за распространением продуцентов ферментов, которые гидролизуют карбапенемы.

К. М. Nesteruk, I. E. Sokolova, O. V. Bratus

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

**OCCURRENCE OF CARBAPENEM RESISTANT
PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUCING
METALLO- β -LACTAMASES**

The existence of Gram-negative bacilli producing metallo- β -lactamase has been increasingly reported in many countries. The polyresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients' urine were studied. The sensitiveness of strains to imipenem was assessed. The production of carbapenem-hydrolysing enzymes in resistant and moderately resistant strains was investigated. A high level of prevalence of the metallo- β -lactamase according to phenotypical test was showed. The necessity of monitoring of the distribution of carbapenem-hydrolysing enzymes producers is grounded.

Вступ

Інфекції сечовивідних шляхів відносять до найпоширеніших бактеріальних інфекцій в амбулаторній практиці урологів, акушерів-гінекологів і терапевтів [4]. У розвитку інфекцій сечовивідних шляхів головне місце займають грамнегативні мікроорганізми, проте етіологічна структура збудників змінюється із року в рік, що пов'язано з упровадженням нових антибіотиків та зміною мікрофлори людини. У зв'язку з цим важливим є дослідження структури комплексу збудників та їх чутливості до антибіотиків.

Стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів – неминучий наслідок широкого клінічного застосування останніх. У різні періоди – залежно від структури застосування антибіотиків – найрозповсюдженіші ті або інші механізми резистентності. Протягом останніх років карбапенеми, насамперед іміпенем і меропенем, міцно утримують одне з перших місць як препарати резерву при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів. Однак і ці антибіотики не стали винятком із загального правила, уже незабаром після впровадження карбапенемів описано мікроорганізми, що виявляють до них стійкість. Відомо декілька механізмів резистентності мікроорганізмів до карбапенемів, однак основний із них – ферментативний гідроліз антибіотиків метало- β -лактамазами (М β Л) [3–5].

Враховуючи все вказане вище, мета даної роботи – оцінити розповсюдженість серед полірезистентних мікроорганізмів, виділених із сечі, карбапенемрезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa* – продуцента метало- β -лактамаз.

Матеріал і методи досліджень

Полірезистентні штами *P. aeruginosa* виділені із сечі пацієнтів у лабораторії Діагностичного центру медичної академії протягом 2010 року. При використанні диско-дифузійного методу оцінки антибіотикочутливості виділених бактерій відібрано резистентні та помірно стійкі штами відносно іміпенему.

Принцип диско-дифузійного методу ґрунтується на феномені пригнічення антибіотиком поверхневого видимого росту мікроорганізмів на щільному агаровому середовищі. Для приготування інокуляту використовували 18–20-годинну агарову культуру досліджуваного штаму *P. aeruginosa*. Суспензію з агарової культури доводили до оптичної густини 0,5 за стандартом Мак-Фарланда [2]. Підготовлений таким чином інокулят наносили стерильним ватним тампоном на поверхню чашки Петрі із середовищем Мюллера–Хінтона та рівномірно розтирали по поверхні у декількох площинах. На поверхню агару накладали стандартний диск, який містив 10 мкг іміпенему. Діаметр зон затримки росту з урахуванням діаметра самого диска вимірювали з точністю до 1 мм. При вимірюванні зон затримки росту орієнтувалися на повне пригнічення видимого росту [2].

Для виявлення продукції карбапенемаз у *P. aeruginosa* застосовано Hodge тест. Досліджували помірно стійкі та резистентні до іміпенему штами.

Для приготування інокуляту використовували 18–20-годинну агарову культуру індикаторного мікроорганізму – *Escherichia coli* ATCC 25922, використаного як негативний контроль. Суспензію з агарової культури доводили до оптичної густини 0,5 за стандартом Мак-Фарланда. Інокулят розсівали на поверхні чашки Петрі із середовищем Мюллера–Хінтона. У центр чашки клали паперовий диск з іміпенемом (10 мг) і за допомогою мікродозатора наносили 10 мкл 50 мМ розчину $ZnSO_4$. Відібрані добові штами *P. aeruginosa* підсівали до паперового диска з іміпенемом радіальною лінією від центра чашки до периферії. У такий самий спосіб на кожну чашку висівали штами

P. aeruginosa VIM-10, який слугував позитивним контролем. Після цього проводили добуву інкубацію за температури +37 °С. Присутність зміненої зони пригнічення росту розглядали як позитивний результат продукції ферментів, які гідролізують карбапенеми [6; 8; 9].

Для фенотипічного скринінгу продукції МβЛ застосовано метод DDST (від англ. *DDST – double-disk synergy test*) подвійних дисків з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТО) [8]. Принцип методу ґрунтується на здатності ЕДТО хелатувати йони цинку з активного центру метало-β-лактамаз і пригнічувати їх гідролітичну активність відносно β-лактамних субстратів. При визначенні чутливості МβЛ-продуцентів методом диск-дифузії за присутності ЕДТО спостерігали розширення зон пригнічення росту навколо дисків із β-лактамними антибіотиками, що пов'язано з інгібуванням МβЛ і відновленням активності β-лактамів.

Постановка диско-дифузійного тесту здійснена для штамів *P. aeruginosa* – продуцентів карбапенемаз відповідно до методичних вказівок щодо виявлення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Досліджені культури *P. aeruginosa* висівали на середовище Мюллера–Хінтона означеним вище способом і через 5–10 хвилин на підсохлу поверхню агару накладали диски за такою схемою: у центр – пустий диск, на який наносили 5 мкл 0,5 М розчину ЕДТО (рН 8,0), з боків від нього на відстані 15 мм між центрами дисків – диски з цефтазидимом, іміпенемом і меропенемом. Чашки інкубували в термостаті при +37 °С протягом 16–18 годин [2; 7; 8].

Одночасно з аналізом досліджуваних культур проводили оцінку контрольних штамів: *P. aeruginosa* VIM-10 – як позитивного контролю, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – як негативного контролю.

Утворення розширеної зони пригнічення росту між диском з ЕДТО і хоч з одним диском, що містить лактамні антибіотики, вказує на продукцію МβЛ у тестованого мікроорганізму. Комбінація із трьох дисків (іміпенем, меропенем, цефтазидим) використовується для підвищення чутливості методу, оскільки деякі штами можуть проявляти синергізм тільки з одним з антибіотиків [9; 10].

Результати та їх обговорення

Із 17 досліджуваних штамів (табл.) визначено 11 резистентних, 4 – помірно стійких і 2 – чутливих до іміпенему, що складають відповідно 64,7, 23,5 та 11,8 %. Для подальшого вивчення взято в роботу резистентні та помірно стійкі мікроорганізми (15 штамів). Фенотипічний Hodge-тест застосований для виявлення продукції карбапенемаз у *P. aeruginosa*. Досліджували помірно стійкі та резистентні штами до іміпенему, адже саме цей антибіотик використовується у клінічній практиці, він чутливіший до карбапенемаз [6; 8].

У ході експерименту серед 15 штамів (11 резистентних і 4 помірно стійких) за Hodge тестом визначено 6 штамів з активною продукцією карбапенемаз. Як позитивний результат у визначенні продукції ферментів, що гідролізують карбапенеми, приймали присутність зміненої зони інгібування навколо паперового диска з іміпенемом, обробленого розчином $ZnSO_4$. Позитивні результати тесту для досліджуваних штамів збігалися з результатами, отриманими для позитивного контрольного штаму *P. aeruginosa* VIM-10 (рис. 1).

Отримані 9 негативних результатів свідчать про наявність у штамів *P. aeruginosa* інших механізмів резистентності до карбапенемів, окрім дії карбапенемаз. До таких механізмів відносять втрату поринового білка *opr D*, хромосомну β-лактамазу класу *Amp C* та ефлюкс [1; 5].

**Чутливість *Pseudomonas aeruginosa* до іміпенему
та продукція ферментів, які гідролізують карбапенеми**

Ступінь чутливості бактерій до антибіотиків	Чутливість до іміпенему, % штамів	Здатність продукувати карбапенемази, % штамів
Чутливі	11,8	–
Помірно стійкі	23,5	6,6
Резистентні	64,7	33,3

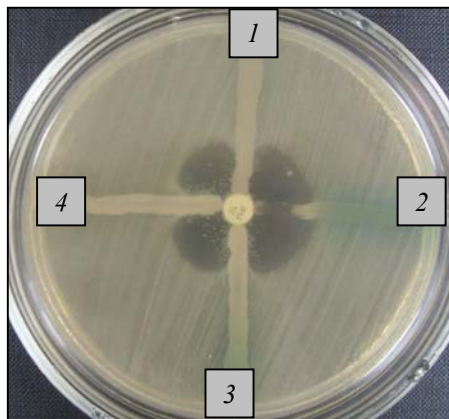


Рис. 1. Hodge тест – виявлення продукції карбапенемаз:

1 – позитивний контроль *Pseudomonas aeruginosa* VIM-10, 2 – негативний результат, 3, 4 – досліджувані штами *P. aeruginosa* – продуценти карбапенемаз (позитивний результат)

Отримані результати вказують на те, що розповсюдженість штамів-продуцентів карбапенемаз серед резистентних до іміпенему *P. aeruginosa* складає 39,9 %. Найбільшу групу карбапенемаз складають метало- β -лактамази (молекулярного класу *B*), серед яких виділяють: VIM, SPM та IMP групи. До карбапенемаз також відносять ферменти класу *A* – груп SME, NMS/IMI та KPS; класу *D* (OXA), що здійснюють гідроліз пеніцилінів і цефалоспоринів [3].

На наступному етапі дослідження проведено скринінг метало- β -лактамаз серед штамів *P. aeruginosa* – продуцентів карбапенемаз.

Метало- β -лактамази належать до ферментів молекулярного класу *B*, і, на відміну від серинових β -лактамаз, ферменти цього типу мають в активному центрі два атоми цинку. У результаті цього активність М β Л пригнічується не класичними інгібіторами серинових β -лактамаз (клавулановою кислотою, сульбактамом, тазобактамом), а різними хелатувальними, тобто зв'язуючими іони двовалентних металів агентами, наприклад, етилендіамінтетрацтовою кислотою чи 2-меркаптопропіоновою кислотою. Білкова глобула М β Л складається з двох доменів, у кожному з яких є по два атоми цинку. Обидва домени мають практично однакову топологію. Передбачається, що ці ферменти виникли в результаті дуплікації гена, який кодує один із доменів [2; 3; 8]. Метало- β -лактамази ефективно гідролізують усі β -лактаміні антибіотики. Тому виявлення продуцентів М β Л серед грамнегативних мікроорганізмів необхідне для оптимального лікування пацієнтів, контролю за швидкістю розповсюдження резистентності [8].

За результатами аналізу встановлено, що всі 6 досліджуваних штамів *P. aeruginosa* продукують М β Л (рис. 2). Це свідчить про високий рівень розповсюдженості М β Л-індукованої резистентності до карбапенемів.

За останнє десятиліття описано 5 генетичних груп набутих МβЛ: VIM, IMP, SPM, GIM і SIM. Найширше розповсюдження та клінічне значення отримали ферменти VIM і IMP типів. Швидке розповсюдження МβЛ значною мірою зумовлене тим, що їх кодувальні гени, за винятком blaSIM-1, локалізовані всередині мобільних генетичних елементів – інтегронів. Крім того, зчеплення генів МβЛ з іншими детермінантами резистентності у складі інтегронів – часта причина множинної антибіотикостійкості штамів-продуцентів МβЛ [3].

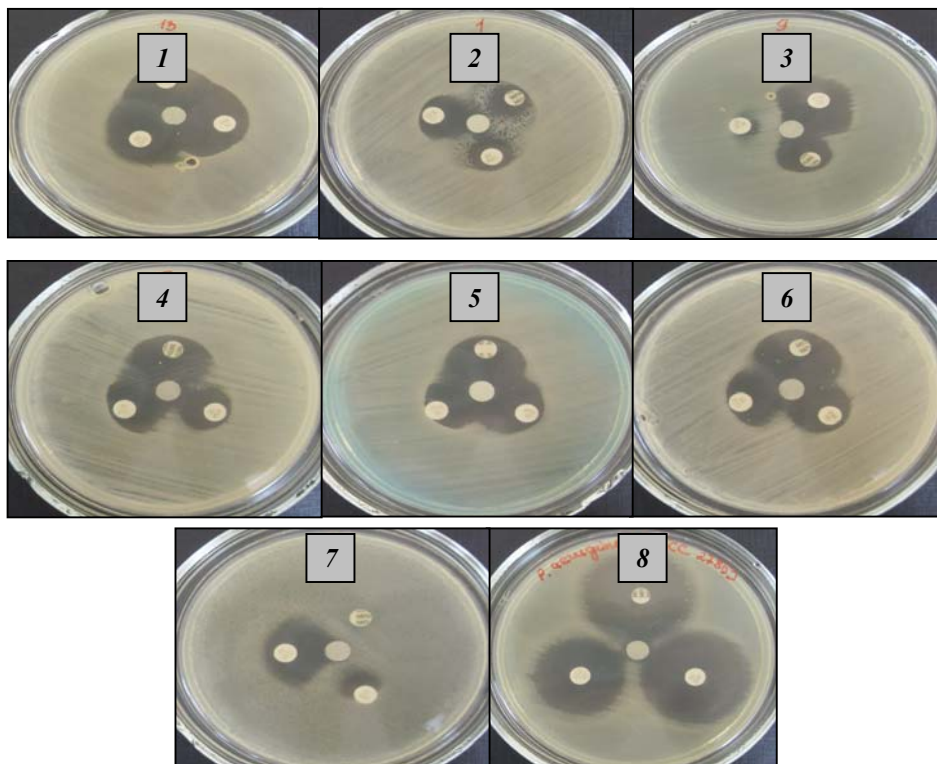


Рис. 2. Виявлення продукції метало-β-лактамаз за допомогою методу подвійних дисків з ЕДТО: 1–6 – досліджувані штами *P. aeruginosa* (позитивні результати, МβЛ+), 7 – *P. aeruginosa* VIM-10 (позитивний контроль), 8 – *P. aeruginosa* ATCC 27853 (негативний контроль)

Зростаюча розповсюдженість набутих метало-β-лактамаз змушує звернути увагу на підвищення їх клінічної важливості, а також необхідність здійснення моніторингу за поширенням продуцентів МβЛ.

Висновки

Серед 17 полірезистентних штамів *P. aeruginosa* виявлено 11 резистентних і 4 помірно стійких до іміпенему. За підсумками Hodge-тесту, серед резистентних і помірно стійких до іміпенему штамів виявлено 6 позитивних результатів на продукцію карбапенемаз. Розповсюдженість штамів-продуцентів карбапенемаз серед резистентних і помірно стійких до іміпенему складає відповідно 33,3 та 6,6 %. Отримані 9 негативних результатів свідчать про наявність у штамів *P. aeruginosa* інших механізмів резистентності до карбапенемів, крім дії карбапенемаз. За результатами фенотипічного тесту наявність метало-β-лактамаз встановлена у 100 % штамів, що продукують карбапенемгідролізувальні ферменти. Такий високий рівень розповсюдженості МβЛ зумов-

лений тим, що їх кодувальні гени локалізовані всередині мобільних генетичних елементів – інтегронів. Зчеплення генів МβЛ з іншими детермінантами резистентності у складі інтегронів – причина множинної антибіотикостійкості штамів-продуцентів МβЛ.

Бібліографічні посилання

1. **Антибактериальные** лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. – М. : Медицина, 2004. – 944 с.
2. **Методика** клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. – Т. 3. Клиническая микробиология. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В. В. Меньшикова. – М. : Лабора, 2009. – 880 с.
3. **Сидоренко С. В.** Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
4. **Страчунский Л. С.** Резистентность грамотрицательных возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антибактериальным препаратам / Л. С. Страчунский, С. В. Сехин, Э. Р. Абрамова // Терапевтический архив. – 2000. – № 6. – С. 30–35.
5. **Яковлев С. В.** Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC // Фарматека. – 2007. – № 8/9. – С. 56–62.
6. **Anderson K. F.** Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae / K. F. Anderson, D. R. Lonsway, J. K. Rasheed // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 8. – P. 2723–2725.
7. **Arakawa Y.** Convenient test for screening metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds / Y. Arakawa, N. Shibata, K. Shibayama // Journal of Clinical Microbiology. – 2000. – Vol. 6. – P. 40–43.
8. **Lee K.** Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species / K. Lee, Y. Chong, H. B. Shin // Clinical Microbiology and Infection. – 2001. – Vol. 7. – P. 88–102.
9. **Lee K.** Evaluation of Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* / K. Lee, Y. S. Lim, D. Yong // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 10. – P. 4623–4629.
10. **Migliavacca R.** Simple microdilution test for detection of metallo-β-lactamase-producing in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Migliavacca, J. D. Docquier, C. Mugnaioli // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 11. – P. 4388–4390.

Надійшла до редколегії 26.04.2011