

УДК 579.61

О. В. Крисенко, Т. В. Скляр, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЗАГАЛЬНОЇ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА КЛАСИФІКАЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНИХ β -ЛАКТАМАЗ

Наведено дані стосовно основних структурних і функціональних груп бактеріальних β -лактамаз, а також сучасні системи класифікації β -лактамаз, які ґрунтуються на спектрах активності, чутливості до інгібіторів і особливостях молекулярної структури. Показано найважливіші властивості β -лактамаз: субстратна специфічність, чутливість до дії інгібіторів, особливості генетичної детермінації. Особливу увагу приділено β -лактамазам грамнегативних бактерій TEM-, SHV-типу, їх ролі у формуванні стійкості до різних β -лактамів.

А. В. Крысенко, Т. В. Скляр, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОБЩЕЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ И КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ β -ЛАКТАМАЗ

Приведены данные относительно основных структурных и функциональных групп бактериальных β -лактамаз. Описаны современные системы классификации β -лактамаз, которые базируются на спектрах активности, чувствительности к ингибиторам и особенностях молекулярной структуры. Представлены основные свойства β -лактамаз: субстратная специфичность, чувствительность к действию ингибиторов, особенности генетической детерминации. Особое внимание уделяется β -лактамазам грамотрицательных бактерий TEM-, SHV-типа, их роли в формировании устойчивости к различным β -лактамам.

A. V. Krysenko, T. V. Sklyar, A. I. Vinnikov

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

SOME ASPECTS OF GENERAL CHARACTERISTIC AND CLASSIFICATION OF BACTERIAL β -LACTAMASES

Main structural and functional groups of bacterial β -lactamases are cited in the data review. Modern systems of classification, which was based on spectra of activity, sensitivity to inhibitors and peculiarities of molecular structure are described. The basic properties of β -lactamases are presented: substrate specificity, sensitivity to inhibitors, features of genetic determination. The special attention is given to β -lactamases of gram-negative bacteria TEM-, SHV-type and its role in the development of resistance to different β -lactams.

Вступ

Основні механізми резистентності до β -лактамічних антибіотиків – зниження спорідненості пеніцилінзв'язувальних білків (ПЗБ), синтез додаткових ПЗБ (ПЗБ 2А типу) та продукція β -лактамаз, які гідролізують β -лактаміне кільце [12]. Саме останній механізм забезпечує високі рівні стійкості. Все це пояснює значну увагу до широкого

кола проблем, пов'язаних із β -лактамазами. Отже, мета даного огляду – проаналізувати літературні дані стосовно загальних характеристик і класифікації β -лактамаз.

Класифікація β -лактамаз

Природна здатність до продукування β -лактамаз характерна для багатьох видів мікроорганізмів. Однак найбільшій значимості останнім часом набуває значне поширення кодованих плазмідами β -лактамаз, що є факторами вторинної (набутої) резистентності у початково чутливих мікроорганізмів [3; 4; 11].

Відповідно до визначення Комітету з номенклатури Міжнародного біохімічного товариства, β -лактамази класифікуються як «ферменти, що здійснюють гідроліз амідів, амідинів і інших C–N зв'язків ..., виділені на підставі субстрату – ... циклічних амідів» [5]. Термін « β -лактамази» є, таким чином, функціональним і поєднує різні бактеріальні ферменти, здатні розщеплювати β -лактамі антибіотики, що містять у своїй структурі циклічний амідний зв'язок.

Більшість відомих β -лактамаз проявляє виражену структурну гомологію з ПЗБ, що свідчить про еволюційний взаємозв'язок між ферментами цих груп [1; 4; 6]. Подібно ПЗБ β -лактамази, що містять залишок серину в активному центрі, взаємодіють із β -лактамі антибіотиками з утворенням ефірного комплексу. Однак у випадку β -лактамаз цей комплекс швидко розщеплюється з вивільненням нативного ферменту й інактивованої молекули субстрату.

Із моменту відкриття β -лактамаз у 1940 році, коли Е. Р. Abraham і Е. Chain описали процес інактивації пеніциліну у безклітинному екстракті культури кишкової палички, і дотепер різними дослідниками виявлено не менше 300 ферментів, що відрізняються структурно й функціонально, здатних здійснювати гідроліз β -лактаміного кільця. За винятком декількох видів клінічно значимих мікроорганізмів, серед яких слід відзначити *Streptococcus pneumoniae* і *Helicobacter pylori*, β -лактамази трапляються в переважній більшості бактеріальних збудників інфекцій [2; 7].

Найважливішими властивостями β -лактамаз, що визначають їх різноманітність, є:

- субстратна специфічність (здатність до переважного гідролізу β -лактамів визначених груп – пеніцилінів, цефалоспоринів, монобактамів, карбапенемів);
- чутливість до дії інгібіторів;
- локалізація генів (хромосомна або плазмідна) і характер їх експресії (конститутивний або індукційний) [5].

Зазначені функціональні особливості стали основою створення різних систем класифікації β -лактамаз. Актуальність диференціації ферментів, що переважно гідролізують пеніциліни (пеніцилінази) або цефалоспорини (цефалоспоринази), уперше відзначили Р. С. Fleming зі співавторами у 1963 році. Система класифікації, запропонована Т. Sawai зі співавторами у 1968 році, передбачала використання імунних сироваток як додатковий критерій диференціації пеніцилінази, цефалоспоринази і ферментів із широким субстратним спектром.

М. Н. Richmond і Р. В. Sykes поділили всі відомі на початку 1970-х років β -лактамази грамнегативних мікроорганізмів на п'ять груп з урахуванням субстратного спектра, чутливості до інгібіторів і частково локалізації кодувальних генів. У 1976 році Р. В. Sykes і М. Matthew розширили цю класифікацію, підкресливши роль плазмідних β -лактамаз, які могли бути диференційовані на підставі даних ізоелектричного фокусування. У функціональній схемі S. Mitsuhashi і М. Inoue (1981) виділено додаткову групу «цефуроксим-гідролізувальних» ферментів [9].

Паралельно з розвитком функціональних підходів у класифікації R. Ambler в 1980 році використовував результати порівняння первинної структури β-лактамаз для опису молекулярних класів: серинових ферментів (клас A), включаючи пеніциліназу *Staphylococcus aureus*, і метало-β-лактамаз (клас B) *Bacillus cereus* [10].

Прообразом сучасної класифікації стала запропонована К. Bush в 1989 році система поділу β-лактамаз на три основні групи, у якій уперше зроблено спробу провести кореляцію між функціональними особливостями (спектром активності, чутливістю до інгібіторів) і молекулярною структурою ферментів, що продукуються різними видами мікроорганізмів. Ця система уточнена й доповнена в 1995 році К. Bush, G. Jacoby і А. Medeiros з урахуванням нових ферментів, описаних у ентеро-бактерій, і в цей час прийнята більшістю дослідників [8].

Група перша у функціональній класифікації К. Bush, G. Jacoby і А. Medeiros включає ферменти грамнегативних бактерій, що відповідають молекулярному класу C. Кращі субстрати для них – цефалоспорини. Клавуланова кислота, сульбактам і тазобактам володіють незначною інгібувальною активністю відносно β-лактамаз даного типу [7].

Цефалоспориноми, як правило, кодуються хромосоною й поширені серед багатьох видів родини Enterobacteriaceae, а також у окремих неферментувальних грамнегативних мікроорганізмів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa* [7; 10; 11].

Друга група – найбільша, поєднує ферменти, що належать до молекулярних класів A і D. На підставі субстратних розходжень β-лактамази, що входять у цю групу, поділені на 8 функціональних категорій.

Перша категорія (група 2a) включає в основному плазмідні пеніцилінази грампозитивних мікроорганізмів *Staphylococcus spp.* і *Bacillus spp.* Стафілококові β-лактамази ефективно руйнують природні й напівсинтетичні пеніциліни, крім групи оксациліну, їх функція пригнічується інгібіторами – клавулановою кислотою, сульбактамом і тазобактамом.

До другої категорії (група 2b) належить найпоширеніші серед штамів *E. coli*, *Proteus mirabilis* і *K. pneumoniae* плазмідні β-лактамази TEM-1, TEM-2 і SHV-1. Кращі субстрати для них – пеніциліни, включаючи ампіцилін, амоксицилін, тикарцилін і карбеніцилін. Цефалоспорини I покоління й цефоперазон розщеплюються ферментами даної групи з меншою ефективністю. Тому TEM-1, TEM-2 і SHV-1 часто описують як пеніцилінази широкого спектра.

Третя група (2be) поєднує понад 80 похідних TEM-1, TEM-2 і SHV-1, відомих як β-лактамази розширеного спектра (extended-spectrum β-lactamases – ESBL), які мають здатність розщеплювати цефалоспорини III–IV поколінь і монобактами поряд із ранніми цефалоспоринами й пеніцилінами.

Крім того, до цієї ж функціональної групи можуть бути віднесені плазмідні цефотаксимази Toho-1, CTX-M-1 – CTX-M-16, що належать до молекулярного класу A і проявляють найвиразнішу гомологію з хромосомними β-лактамазами, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* і *Citrobacter diversus*. У той же час у Східній Європі описане поширення клонально-родинних штамів *Salmonella typhimurium*, які продукують фермент CTX-M-4. Відповідно до останніх молекулярно-епідеміологічних досліджень, проведених у різних географічних зонах, спостерігається досить чіткий характер поширення БЛРС CTX-типу.

Серед різних представників третьої категорії відзначається виражена субстратна перевага до окремих цефалоспоринів розширеного спектра, наприклад цефтазидиму або цефотаксиму, однак продукція переважної більшості ESBL може викликати

резистентність до всіх оксिमіно- β -лактамів. Карбапенеми й цефаміцини не входять у спектр антибіотиків, що руйнуються ESBL. Ферменти цієї групи також проявляють чутливість до інгібіторів.

Четверта категорія (2br), уперше виділена в системі класифікації К. Bush, G. Jacoby і А. Medeiros, представлена в основному похідними TEM β -лактамаз, відмінною рисою яких є стійкість до інгібіторів. Більшість інгібіторорезистентних TEM (IRT) ферментів, а також єдина β -лактамаза SHV-типу (SHV-10), що входить у четверту категорію, виявлені в клінічних штамів *E. coli*.

П'ята категорія (2c) об'єднує карбеніцилази грамнегативних бактерій, що належать до молекулярного класу А. Ферменти PSE-1, PSE-3 і PSE-4, що відносяться до цієї групи, мають вищу швидкість гідролізу карбеніциліну, ніж бензилпеніциліну, і пригнічуються клавулановою кислотою. Подібні властивості проявляють також β -лактамази BRO-1 і BRO-2 *Moraxella catarrhalis* і β -лактамаза SAR-1 *Vibrio cholerae*.

Оксацилінази – шоста категорія (2d) – OXA-1 – OXA-9, OXA-10 (PSE-2) і OXA-11 найбільш ефективно розщеплюють клоксацилін і оксацилін. Їх активність слабо пригнічується інгібіторами, внаслідок чого оксацилінази можуть викликати стійкість ентеробактерій до амоксициліну/клавуланової кислоти.

Сьома категорія (2e) включає цефалоспоринази, що характеризуються активністю відносно оксिमіноцефалоспоринів і високою чутливістю до клавуланової кислоти. Представники цієї групи ферментів – індукцйбельні хромосомні β -лактамази (цефуросимази) *P. vulgaris* і *C. diversus*, а також хромосомні β -лактамази *Bacteroides spp.* і L2 *Stenotrophomonas maltophilia*.

Рідкісні β -лактамази молекулярного класу А (2f), які гідролізують карбапенеми та проявляють чутливість до клавуланату NMC-A, Imi-1 *Enterobacter cloacae* і Sme-1 *Serratia marcescens*, об'єднані у восьму категорію [14].

β -лактамази, що містять цинк, відносяться до молекулярного класу В і функціональної групи 3, виявляють гідролітичну активність відносно більшості β -лактамів (включаючи карбапенеми), не активні відносно монобактамів (азтреонаму). Ці ферменти не чутливі до інгібіторів серинових β -лактамаз (клавуланат, сульбактам, тазобактам). Особливе значення має продукція набутих метало- β -лактамаз у грамнегативних бактерій. За останнє десятиліття описано 6 генетичних груп набутих MBL: VIM, IMP, SPM, GIM, SIM і AIM. Найбільше поширення одержали ферменти VIM- і IMP-типів. На сьогодні охарактеризовано 18 варіантів VIM і 23 ферменти IMP-типу. Ці ферменти виявлені у багатьох країнах, але найчастіше трапляються в Європі та Південно-Східній Азії. Гени набутих MBL (за винятком SPM) звичайно входять до складу інтегронів. У свою чергу, плазмідна локалізація багатьох інтегронів, що несе гени MBL, забезпечує можливість їх поширення між різними видами мікроорганізмів [10; 15].

Поширення β -лактамаз серед грамнегативних бактерій

Особливе значення плазмідних β -лактамаз TEM- і SHV- типів пов'язане з їх значним поширенням серед грамнегативних бактерій [12; 13]. За даними різних дослідників, TEM-1 зустрічається в 73–94 % ампіцилінорезистентних штамів *E. coli* і складає близько 80 % усіх плазмідних ентеробактерій. Продукція цього ферменту відмічається не тільки у багатьох видів родини Enterobacteriaceae, а й у представників інших груп мікроорганізмів (*Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio spp.* тощо).

TEM-2 відрізняється від TEM-1 заміною єдиного амінокислотного залишку (Глн₃₉ – Лиз), що виявляється в основному в підвищенні ізоелектричної точки даного ферменту ($pH=5,4-5,6$) та істотно не змінює спектра його активності. Ген, що кодує TEM-2, також

входить до складу транспозону Tn1, який практично ідентичний Tn3, за винятком точкової мутації у промоторній області, що підсилює транскрипцію blaTEM-2, і 5 нуклеотидних замін у структурній частині blaTEM гена, 4 з яких є мовчазними генами.

Найближчі за структурою та у функціональному відношенні ферменти, що відносяться до генетичної групи SHV, більшою мірою поширені серед мікроорганізмів роду *Klebsiella*, хоча β-лактамази, що кодуються плазмідами цієї групи, також зустрічаються й у інших представників родини Enterobacteriaceae. Ген SHV-1 може мати як плазмідну, так і хромосомну локалізацію у штамів *K. pneumoniae*, і не пов'язаний із мобільними генетичними елементами.

Впровадження на початку 1980-х років у загальну клінічну практику цефалоспоринов III покоління (цефотаксиму, цефтазидиму), що ефективно пригнічують штами, які продукують класичні плазмідні пеніцилінази, протягом короткого періоду призвело до появи та значного поширення похідних TEM і SHV, здатних ефективно зв'язувати та руйнувати оксिमіно-аміногіазоліл-β-лактами. Ці ферменти одержали назву ESBL-β-лактамаз розширеного спектра.

Найчастіші продуценти ESBL – штами *K. pneumoniae*. Причини переваги ESBL у клібсіел порівняно з іншими представниками родини Enterobacteriaceae, наприклад *E. coli*, залишаються нез'ясованими, оскільки поки не знайдено розходжень у механізмах експресії та швидкості накопичення мутацій у генах TEM і SHV β-лактамаз у *E. coli* і *K. pneumoniae*. Лікування інфекцій, викликаних штамми *K. pneumoniae*, які продукують ESBL, часто ускладнюється їх множинною антибіотикорезистентністю, оскільки гени ESBL звичайно розташовані у складі великих «полірезистентних» плазмід.

Наведені дані свідчать про значну актуальність проблеми поширення β-лактамаз і їх роль у виникненні та поширенні стійкості у бактерій до β-лактамних антибіотиків.

Бібліографічні посилання

1. **Грязнова С. Н.** Пенциллинсвязывающие белки. Энзиматическая активность и свойства / С. Н. Грязнова, А. Н. Субботина // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1986. – Т. 31, № 7. – С. 487–498.
2. **Сазыкин Ю. О.** Новые аспекты резистентности к бета-лактамам антибиотикам // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1986. – Т. 31, № 7. – С. 483–486.
3. **Сазыкин Ю. О.** Современные проблемы комбинированной антибиотикотерапии / Ю. О. Сазыкин, П. С. Навашин // Антибиотики и химиотерапия. – 1993. – Т. 38, № 4–5. – С. 22–28.
4. **Сидоренко С. В.** Бета-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 32–38.
5. **Страчунский Л. С.** β-лактамаз расширенного спектра действия – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза // Клиническая микробиология и химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 92–96.
6. **Эйдельштейн М. В.** Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – № 3. – С. 223–242.
7. **Эйдельштейн М. В.** Динамика распространенности и чувствительности БЛРС продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России / М. В. Эйдельштейн, Л. С. Страчунский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 323–336.
8. **Характеристика** и клиническое значение бета-лактамаз расширенного спектра / А. Г. Березин, О. М. Ромашов, С. В. Яковлев, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 7. – С. 18–23.
9. **Bush K.** Functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure / K. Bush, G. Jacoby, A. Medeiros // Antimicrob. Agents Chemother. – 1990. – Vol. 10. – № 40. – P. 40–46.

10. **Bush K.** The evolution of β -lactamases. Antibiotic resistance // Antimicrob. Agents Chemother. – 1995. – Vol. 8, N 39. – P. 84.
11. **Opal S. M.** Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria / S. M. Opal, A. A. Medeiros // Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. – Philadelphia : Churchill Livingstone, 2004. – P. 253–270.
12. **Paterson D.** International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections / D. Paterson, W. C. Ko, A. Von Gottberg // Ann. Intern. Med. – 2004. – Vol. 140. – P. 26–32.
13. **Paterson D. L.** Extended-spectrum beta-lactamases a clinical update / D. L. Paterson, R. A. Bonomo // Clin. Microbiol. Reviews. – 2005. – Vol. 18. – P. 7–8.
14. **Rasmussen B. A.** Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases / B. A. Rasmussen, K. Bush // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – Vol. 12, N 45. – P. 32–35.
15. **Metallo- β -lactamases:** the quiet before the storm? / R. W. Timothy, A. M. Toleman, P. Laurent, N. Patrice // Clinical Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 18, N 2. – P. 306–325.

Надійшла до редколегії 30.11.2009