

АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ПЕРМСКОГО КРАЯ

М.В. Кузнецова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

mar@iegm.ru

По данным исследований последнего десятилетия, все большее значение в этиологии внутрибольничных инфекций приобретают полирезистентные неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы [1-3]. Устойчивость к антибактериальным препаратам нередко определяется способностью бактерий к их ферментативному гидролизу бета-лактамазами широкого и, в большей степени, расширенного спектра (БЛРС) [4]. Ранее исследование антибиотикорезистентности концентрировалось только на микроорганизмах, выделенных из клинического материала, что связано с актуальностью данной темы для здравоохранения. Для понимания адаптивной изменчивости, проблем эволюции и родства штаммов, выделяемых от больных и из окружающей среды, нам представляется интересным изучение распространения и локализации генов бета-лактамаз у сапрофитных неферментирующих бактерий (НФБ) выделенных из различных почв Пермского края.

Объектами исследования являлись НФБ родов *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Acinetobacter*, выделенные путем прямого высева на ацетамидный агар с антибиотиком (ампициллин – 25 мкг/мл или тетрациклин – 10 мкг/мл). При оценке чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом использовали 19 антимикробных препаратов разных групп, включая карбенициллин, цефотаксим, цiproфлоксацин и гентамицин, обладающих антипсевдомонадной активностью. Оценка зон ингибирования роста бактерий осуществлялась по нормам для клинических изолятов родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter* [5].

Препараты хромосомной ДНК получали фенольным методом. Для выделения плазмидной ДНК использовали модифицированный щелочной метод Бирнбойма и Доли [6]. Амплификацию ДНК проводили с применением термостабильной *Taq*-полимеразы производства ООО «СибЭнзим» (Новосибирск) на термоциклере ТЗ (Biometra, Германия). Праймеры к генам бета-лактамаз типов TEM, CTX-M, SHV, DHA, FOX, CMY, ACT были синтезированы ООО «Евроген», Москва (таблица). Режим амплификации для праймеров TEM, CTX-M, CMY включал: начальный цикл денатурации – 1 мин при 94 °С; 35 циклов по схеме: денатурация 94 °С – 20 с; отжиг 46 °С – 60 с; синтез 72 °С – 60 с; завершающий цикл – 5 мин при 72 °С. Для праймеров SHV, DHA, FOX, ACT отжиг проводили при 55 °С – 60 с. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2 % (размер фрагмента более 1000 п.н.) или 1,5 % (размер фрагмента менее 1000 п.н.) агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли после окрашивания геля бромистым этидием с использованием системы гель-документации BioDocAnalyze (Biometra, Германия).

Наиболее распространенный фенотип: карбенициллин + эритромицин + тетрациклин. Гентамицин ингибировал рост микроорганизмов в 65 % случаев. Интересными фактами представляются выделение меропенем-резистентного штамма и распространенность нечувствительности к цiproфлоксацину (15 % резистентных, 45 % промежуточных). Учитывая высокую устойчивость к карбенициллину, цефотаксиму и ингибитор-защищенному амоксициллину (большой процент штаммов с промежуточной чувствительностью), дальнейшее исследование была направлено на выявление бета-лактамаз типов TEM, CTX-M, SHV, DHA, FOX, CMY, ACT.

Праймеры для амплификации генов бета-лактамаз [7]

Ген-мишень	Ожидаемый фрагмент гена, п.н.	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
TEM	1080	F-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R-GACAGTTACCAATGCTTAATCA
SHV	1014	F-CCGGGTATTCTTATTTGTCGC R-TCTTCCGATGCCGCCAGTCA
CTX-UNIV	585	F-CGATGTGCAGTACCAGTAA R-TAAGTGACCAGAATCAGCGG
CTX-M-8	585	F-ATGATGAGACATCGCGTTAAGC R-CCGTCGGTGACGATTTTCGCG
CTX-M-9	585	F-ATGGTGACAAAGAGCGTGC R-CCCTTCGGCGATGATTCTCGC
CTX-M-25	585	F-ATGATGAGAAAAAGCGTAAGG R-CCGTCGGTGACAATTCTGGCG
DHA	1199	F-CCGTTACTCACACACGGAAGG R-CGTATCCGCAGGGGCTGTTC
FOX	1180	F-CACCACGAGAATAACC R-GCCTTGAACTCGACCG
CMY	1433	F-CAATGTGTGAGAAGCAGTC R-CGCATGGGATTTTGGTTGCTG
ACT-1	418	F-CGAACGAATCATTCAGCACCG R-GCCAATACCGAGCAGGAGGTG

Наиболее часто среди изучаемых штаммов встречались гены TEM-типа – 45 % (рисунок). Реже наблюдалось наличие генов типа SHV – 20 %. Это согласуется с литературными данными о большой распространенности этих лактамаз у грамотрицательных бактерий и, возможно, связано с плазмидной локализацией кодирующих их генов.

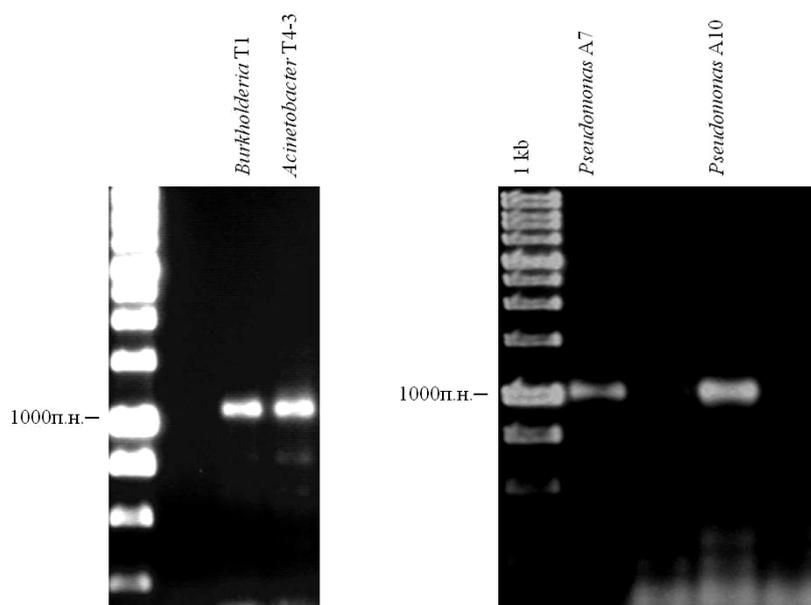


Рис. ПЦР-фрагменты генов (1080 п.н.), кодирующих бета-лактамазы TEM типа.

Частота встречаемости в генетическом материале генов CTX-M, DHA, ACT-типов не превышала 10 %. У одного штамма коллекции был обнаружен ген резистентности CMY-типа. Ни в одном из изолятов не обнаружены гены FOX-лактамазы. Выявлено, что гены

наиболее распространенных ферментов (TEM, CTX-M, SHV) чаще встречаются в изолированном виде. Пять штаммов содержали детерминанты резистентности двух типов, ни в одном из изолятов не было обнаружено комбинаций трех и более лактамаз одновременно. Шесть штаммов не содержали генов β -лактамаз исследованных классов, и по-видимому, их устойчивость к лактамным антибиотикам обусловлена другими механизмами.

Исследовано наличие плазмид у почвенных изолятов грамотрицательных бактерий. Установлено, что большинство (83 %) выделенных устойчивых к антибиотикам культур *Pseudomonas* почвенного происхождения содержат плазмиды размером от 6 до 20 т.п.н. Возможную связь плазмид с признаками резистентности предстоит выяснить в дальнейшем.

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении факторов антибиотикоустойчивости среди сапрофитных НФБ окружающей среды.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-96093.

1. И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // КМАХ. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271–285.
2. Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, А.Н. Фаращук, Л.С. Страчунский Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности // КМАХ. – 2006. – Т. 8, № 3. – С. 243–259.
3. В.А. Руднов Современное клиническое значение синегнойной инфекции и возможности ее терапии у пациентов отделений реанимации // Инфекц. и антимикроб. тер. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 170–177.
4. С.В. Сидоренко Тенденции в распространении антибиотикорезистентности среди возбудителей внебольничных инфекций на территории Российской Федерации // Consilium medicum. – 2007. – № 1. – С. 75–79.
5. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, Методические указания МУК 4.2.1890-04 Edn. М., 2004.
6. Клонирование ДНК. Методы / Пер. с англ.; под ред. Д. Гловера. – М.: Мир, 1988. – 538с.
7. С.В. Сидоренко, А.Г. Березин, Д.В. Иванов Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефалоспориновым антибиотикам // Антиб. и химиотер. – 2004. – Т. 49, № 3. – С. 3–13.

ШТАММЫ *RHODOCOCCLUS* ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

А.Ю. Максимов, М.В. Кузнецова, Ю.Г. Максимова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

maks@iegm.ru

Биотрансформация и биокаталитический синтез органических соединений является одним из важнейших направлений современной биотехнологии. Широкое применение в прикладном биокатализе находят ферменты классов гидролаз и некоторые гидратирующие лиазы. Это связано как с потребностью в проведении реакций гидролиза, так и со свойствами самих ферментов и их продуцентов (технологическая стабильность, отсутствие потребности в растворимых кофакторах, возможность сверхсинтеза и др.). В частности, наиболее успешный опыт использования биокаталитических процессов в промышленности связан с процессами гидратации и гидролиза нитрилов.

У бактерий известны два основных пути метаболизма нитрилов: двустадийный гидролиз, в котором участвуют два фермента – нитрилгидратаза (КФ 4.2.1.84) и амидаза (КФ 3.5.1.4) и одностадийный гидролиз, осуществляемый нитрилазой (КФ 3.5.5.1).

Производство акриламида, осуществляемое в России и Японии путем гидратации нитрилгидратазой нитрила акриловой кислоты, является первым успешным примером крупнотоннажного биокаталитического синтеза [1, 2]. Гидролиз других нитрилов и амидов с