

УДК 579:577.18:616-071

## Подходы к определению бета-лактамазной реактивности макроорганизма: способы выполнения и их сравнительная характеристика

И.С. Веремей, И.В. Жильцов, В.М. Семёнов, И.И. Генералов, Е.Н. Полешук

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

## Approaches to beta-lactamase activity determination in macroorganism: the ways of realization and comparison of their characteristics

I.S. Veramei, I.V. Zhylytsou, V.M. Semenov, I.I. Generalov, E.N. Poleshuk

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

В работе рассмотрены основные модели определения бета-лактамазной активности и дана сравнительная характеристика используемым подходам. Оптимизированы химико-аналитические стадии неocupроинового варианта с целью определения степени разрушения бета-лактаманых антибиотиков в окружении белковой матрицы. Установлено, что введение этапа депротеинизации хлорной кислотой позволяет адаптировать неocupроиновый метод для решения вышеуказанной задачи.

Определены значения молярных показателей поглощения и спектральные характеристики бензилпенициллинового и ампициллинового комплексов, что позволяет использовать их в качестве чувствительных тест-объектов для определения бета-лактамазной реактивности организма. Проведены пилотные испытания изучаемых аналитических моделей. Обнаружено, что в сыворотках крови как больных, так и здоровых лиц присутствуют факторы, обладающие значительной бета-лактамазной активностью.

### Ключевые слова

«Биологическая» антибиотикорезистентность, бета-лактамазная активность, белки человеческой крови, инфекционные болезни, бета-лактаманые антибиотики.

Антибиотикоустойчивость бактерий на текущий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем инфектологии. Практически все известные науке бактерии - возбудители инфекционных заболеваний (за

### Summary

In this work basic models of beta-lactamase activity determination are considered and comparison characteristic for the used approaches is given. Analytical studies of neocuproine variant are optimized in order to determine the degree of beta-lactam antibiotics dissolution in protein matrix relationship. The inclusion of deproteinisation with perchloric acid phase is ascertained to allow adapting neocuproine method for working out the problem mentioned above.

Values of absorption molar coefficients and benzylpenicillin and ampicillin complex spectral characteristics are defined, that allows using them as sensory test-objects in order to determine beta-lactamase reactivity of an organism. Pilot tests of the explored analytical models are carried out. Some factors having significant beta-lactamase activity are discovered to be present at blood serum of both ill and healthy people.

### Keywords

“Biological” antibiotics resistance, beta-lactamase activity, blood proteins, infectious diseases, antibiotics of beta-lactam group.

редким исключением) в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

Основным механизмом устойчивости бактерий к бета-лактаманым антибиотикам является

синтез разнообразных бета-лактамаз (пенициллиназ, цефалоспориноз и т.п.).

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

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

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

Различия между бета-лактамазами и ПСБ не всегда отчетливы, поскольку многие бета-лактамазы могут образовывать стабильные эфиры с бета-лактамами, выступающими в роли ингибиторов («suicide substrate»), а некоторые ПСБ обладают способностью к быстрому деацилированию, проявляя слабую гидролитическую активность в отношении отдельных бета-лактамов антибиотиков [3].

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

Продукция бета-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 анализе реакции, вызванной процессом гидролиза бета-лактамов [6].

Наиболее широко используемым хромогенным субстратом является нитроцефин – цефалоспорин, расщепляемый большинством бета-лактамаз с образованием продукта, окрашен-

ного в интенсивно-красный цвет [7]. Наблюдение реакции гидролиза нитроцефина в растворе или на бумажных дисках является наиболее быстрым, чувствительным и специфичным тестом на наличие бета-лактамаз.

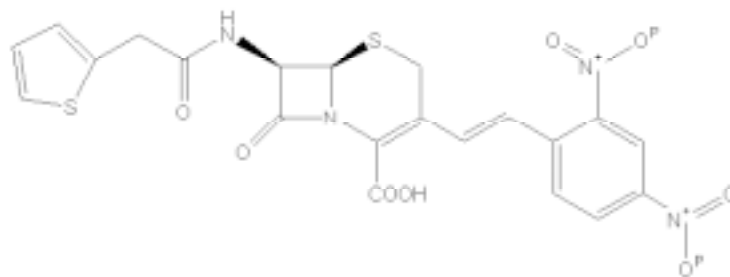
Альтернативные методы детектирования бета-лактамазной активности включают йодометрические и ацидометрические тесты. Первый вид исследований основан на способности продуктов гидролиза бета-лактамов антибиотиков восстанавливать йод до йодида, вызывая обесцвечивание йодокрахмального комплекса [6]. Изменение окраски кислотно-основных индикаторов, например, бромкрезолового пурпурного, вызванное появлением дополнительной карбоксильной группы при расщеплении бета-лактамового кольца, является основой использования ацидометрических методов [6].

Из упомянутых выше способов определения бета-лактамазной активности на практике наиболее широко применяется спектрофотометрическая методика с использованием нитроцефина.

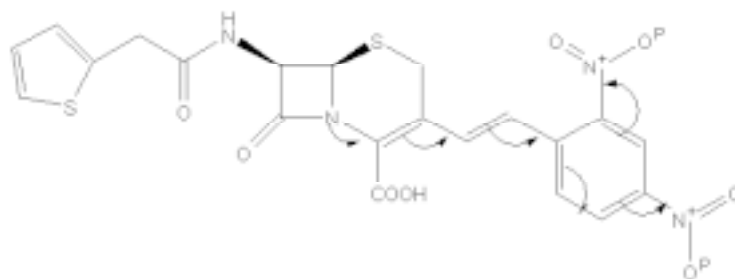
Определение бета-лактамазной активности ферментов с помощью нитроцефина основано на разрушении его бета-лактамового кольца, приводящего к батохромному сдвигу в хромофорной системе данной молекулы.

Данный антибиотик из группы цефалоспоринов второго поколения имел непродолжительное клиническое применение, что вполне очевидно из его лабильной химической структуры: 4-позиционное бета-лактамы кольцо испытывает дополнительное электроноакцепторное напряжение по цепи сопряженных двойных связей двух нитроксильных групп - см. рисунки 1, 2.

Именно эта особенность химической структуры нитроцефина широко используется в качестве «идеальной» модели формирования аналитического сигнала. Применение нитроцефина для определения бета-лактамазной активности широко распространилось в микробиологии, инфектологии и смежных областях. Однако, несмотря на всю привлекательность использования нитроцефина в качестве субстрата-хромогена, т.е. возможность проведения различных вариантов кинетических исследований, достаточно высокую чувствительность, специфичность, возможность применения в объектах, имеющих сложную аналитическую матрицу, данный тест необходимо осуществлять после деталь-



**Рис. 1. Структурная формула нитроцефина (3-(2,4-динитростирил)-(6R,7R)-7-(2-тиенилацетида)-цеф-3-ен-4-карбоновая кислота [CALBIOCHEM])**



**Рис. 2. Смещение электронной плотности в молекуле нитроцефина**

ной проверки на отсутствие побочных реакций лабильной бета-лактаманной связи с аминок-, сульфо- и гидроксильными группами белков [8]. Кроме того, нитроцефин дорог, очень неустойчив в растворах, которые ввиду этого вынужденно готовятся *ex tempore*, довольно быстро разрушается при хранении и не позволяет отличать бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) от обычных; он также не позволяет определять субстратную специфичность выявленной бета-лактамазной активности. Неустойчивость нитроцефина в растворе приводит, в числе прочего, к низкой воспроизводимости получаемых результатов, ввиду чего данная методика обычно используется для качественной либо полуколичественной оценки бета-лактамазной активности.

Наряду с нитроцефиновым методом, существует также неокупроиновый метод определения бета-лактамазной активности, основанный на реакции комплексообразования ионов меди, неокупроина и гидролизованной бета-лактаманной связи различных производных 6-аминопенициллановой кислоты, в результате которой образуется окрашенный продукт желтого цвета [8].

Применение неокупроинового метода представляется достаточно перспективным, поскольку с его помощью обнаруживается гидролизованная бета-лактаманная связь различных антибиотиков, что позволяет устанавливать субстратную специфичность выявляемой активности [8]. Кроме того, неокупроиновый метод позволяет вводить в аналитическую систему бета-лактаманские антибиотики различных групп (после определения химико-аналитических параметров). Неокупроин достаточно устойчив в водных растворах, что влечет за собой относительно высокую воспроизводимость результатов данной методики, делая возможным ее стандартизацию и, соответственно, количественную оценку бета-лактамазной активности.

Однако в предварительных испытаниях нами было установлено отрицательное влияние белковой матрицы на процесс комплексообразования. Таким образом, целью нашего исследования являлась оптимизация условий определения бета-лактамазной активности субстрата путем включения этап депротенинизации хлорной кислотой.

## Материалы и методы

Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофлуориметре SOLAR-CM2203, (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии.

В эксперименте использовали бензилпенициллина натриевую соль, ампициллин и цефтриаксон. Изомолярные серии исследуемых антибиотиков готовили последовательным разведением маточных растворов в диапазоне концентраций 0,2–1,0 ммоль/л. Для разрушения бета-лактамной связи калибровочные растворы смешивали с 0,2 М раствором гидроксида натрия, выдерживали в термостате при 37°C 30 минут. Далее к исследуемым растворам прибавляли ацетатный буфер (рН=4,75), неокупроиновый реагент и выдерживали при комнатной температуре 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя вышеуказанное время измеряли спектры поглощения и оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. Полученные данные обрабатывали с помощью регрессионного анализа.

Для пилотного испытания изучаемых аналитических моделей использовали факториальную схему планирования эксперимента. Первым фактором (А) в двух модальностях являлась категория обследуемых (а1 – сыворотка больных и а2 – сыворотка доноров в двух повторностях). Следующим фактором (В) в двух модальностях являлся вид антибиотика (b1 – бензилпенициллина натриевая соль и b2 – ампициллин в концентрациях достаточных, чтобы обеспечить надежный аналитический сигнал). Модельный раствор антибиотика смешивали с исследуемой сывороткой в соотношении 1:1 и помещали в термостат (t=37°C) на 20 минут. Спустя вышеуказанное время к тест-объектам прибавляли раствор хлорной кислоты. В качестве контроля использовали модельный раствор бензилпенициллина и ампициллина, разведенный дистиллированной водой в соотношении 1:1 с добавлением хлорной кислоты. Все тест-объекты встряхивали на вортексе в течение 2 минут и центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Отбирали надосадочную жидкость. Учитывая вероятность потерь антибиотика с белковым осадком, вводили дополнительный контроль. Для этого предварительно гидролизованные

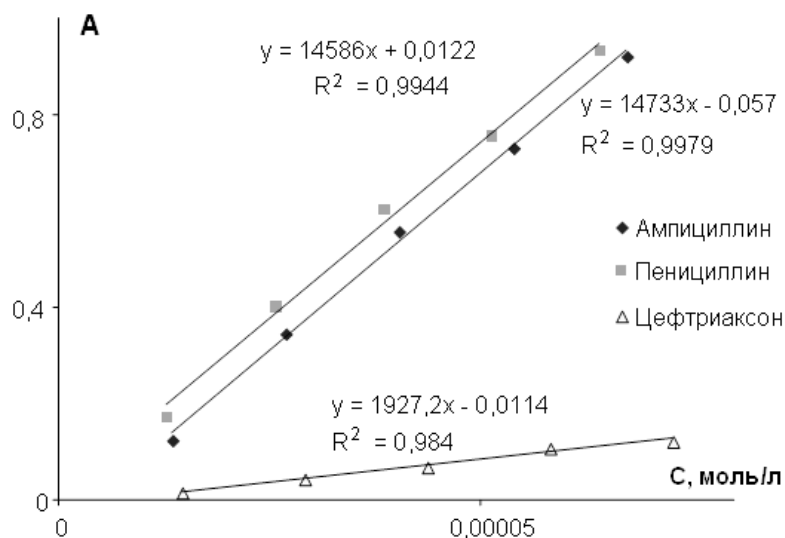
бета-лактамы вносили в эквивалентных количествах в испытуемые сыворотки и далее проводили депротеинизацию, как указано выше. Далее к исследуемым растворам прибавляли ацетатный буфер (рН=4,75), неокупроиновый реагент и выдерживали при комнатной температуре 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя вышеуказанное время измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. Полученные данные обрабатывали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (multifactor ANOVA).

## Результаты исследования

Полученные результаты, а также параметры уравнений линейной регрессии представлены на рисунке 3. По оси абсцисс расположена концентрация окрашенного комплекса в конечном (измеряемом) растворе, выраженная в моль/л, а по оси ординат – оптическая плотность. Совершенно очевидно, что тангенс угла наклона прямой соответствует молярному показателю поглощения для данного комплекса. Молярный показатель поглощения бензилпенициллинового комплекса, определенный нами ( $\epsilon=14733$ ), неплохо согласуется с работой [8] ( $\epsilon=14500$ ). Молярный показатель ампициллинового комплекса составляет 14586 единиц оптической плотности, что позволяет его использовать в качестве чувствительного тест-объекта для неокупроиновой реакции. Столь сходные значения молярных показателей поглощения очевидны, учитывая химическую структуру бензилпенициллина и ампициллина. Спектры поглощения вышеуказанных комплексов в диапазоне 360–550 нм практически не отличались. В то же время молярный показатель поглощения комплекса цефтриаксона составляет только 1927,2 единиц оптической плотности, что, возможно, связано с наличием в химической структуре цефтриаксона объемного бокового радикала.

Результаты пилотного испытания ампициллиновой и бензилпенициллиновой аналитической модели приведены в таблице 1.

Дисперсионный анализ факториальной схемы планирования эксперимента не показал достоверных изменений вариантов и повторностей, однако замена первой «позиции» донора и больного сразу же обнаружила достоверные отличия как по вариантам, так и по повторностям (таблица 2).



**Рис. 3.** Молярные показатели поглощения неокупроиновых комплексов бензилпенициллина, ампициллина и цефтриаксона

**Таблица 1**

**Разложение бета-лактаменных антибиотиков в исследуемых образцах сыворотки (%)**

A	a1		a2		Сумма
B	b1	b2	b1	b2	
1	20,77	1,23	62,15	43,08	127,23
2	70,23	48,00	42,46	18,62	179,31
Сумма	91,00	49,23	104,61	61,69	306,54

**Таблица 2**

**Разложение бета-лактаменных антибиотиков в исследуемых образцах сыворотки (%)**

A	a1		a2		Сумма
B	b1	b2	b1	b2	
1	62,15	43,08	20,77	1,23	127,23
2	70,23	48,00	42,46	18,62	179,31
Сумма	132,38	91,08	63,23	19,85	306,54

Это свидетельствует о том, что факторы, обладающие бета-лактамазной активностью, присутствуют в сыворотке крови как больных, так и здоровых лиц. В дополнение к этому, проведенный дисперсионный двухфакторный анализ выявил достоверные отличия как по типу антибиотика, так и между отдельными образцами

сывороток крови. Наличие высокой степени корреляции разложения бензилпенициллина и ампициллина, возможно, связано, со специфичностью взаимодействия данных факторов и объектов с бета-лактамазной активностью.

Малый размер группы и ограниченная реакгентная база данного эксперимента не позволи-

ли провести анализ кинетики реакции, а также уточнить зависимость уровня бета-лактамазной активности крови от возраста и пола исследуемых лиц. Таким образом, полученные нами результаты носят сугубо предварительный характер.

### Выводы

1. В сыворотке крови как больных, так и здоровых лиц присутствуют факторы, обладающие бета-лактамазной активностью.
2. Полученные нами значения молярных показателей поглощения и спектральные характеристики бензилпенициллинового и ампи-

циллинового комплексов хорошо согласуются с таковыми, описанными в зарубежных исследованиях, что подтверждает высокую чувствительность и воспроизводимость неокупроиновой методики, и, соответственно, возможность ее применения для детекции и количественной оценки бета-лактамазной активности различных субстратов.

3. Введение этапа депротеинизации хлорной кислотой позволяет адаптировать неокупроиновый метод для определения бета-лактамазной реактивности различных субстратов в условиях значительной концентрации белка в анализируемом растворе.

### Литература

1. Webb E.C., editor. Enzyme nomenclature. London: Academic Press Inc. (London) Ltd.; 1984: 366-374.
2. Bush K. The evolution of b-lactamases. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. John Willey & Sons; 1997: 152-169.
3. Livermore D.M. b-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Reviews 1995; 8: 557-584.
4. Bush K., Jacoby G., Medeiros A. Functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-1233.
5. Rasmussen B.A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing b-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 223-232.
6. Livermore D.M., Williams J.D. b-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V., editor. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991; 503-578.
7. Payne D.J., Farmer T.H. Biochemical and enzyme kinetic Applications for the Characterization of b-lactamases. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998; 513-535.
8. Menashi A.C., Abraham J., Antone Menashi A.M. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity. Analytical Biochemistry; 1988; 168: 252-258.