

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.65

Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, полученных из медицинского учреждения**Р.Р. Еникеев* , Н.Ю. Татарина , Л.М. Захарчук , Е.Н. Виноградова ***Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com*

Получены изоляты штаммов бактерий, доминирующих на поверхностях оборудования медицинской лаборатории для отбора анализов крови. Чистые культуры этих бактерий идентифицированы как *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06, *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09. Определена устойчивость бактерий к ряду β-лактамных антибиотиков и спектиномицину. Все штаммы устойчивы к пенициллину и ампициллину со значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от 256 до 2048 мкг/мл, а также к антибиотикам цефалоспоринового ряда со значением МИК от 2 до 2048 мкг/мл. Резистентность бактерий к спектиномицину, применяемому у пациентов с аллергией на пенициллины и цефалоспорины, находится в диапазоне МИК от 16 до 256 мкг/мл.

У *B. cereus* HSA01 устойчивость к ампициллину и цефуроксиму обусловлена работой эффлюкс-насосов, к цефтазидиму обеспечивается действием металло-β-лактамаз (МБЛ), а к пенициллину объясняется работой обеих этих систем. Высокая устойчивость к ампициллину *B. cereus* HSA12 обеспечивается действием МБЛ, к цефуроксиму – активностью эффлюкса, в то время как резистентность к цефтазидиму сопровождается наличием МБЛ и действием эффлюкс-насосов. У *B. cereus* HSA03 резистентность к пенициллину, ампициллину, цефепиму и цефтазидиму объясняется активностью эффлюкса, к цефазолину и цефтазидиму обеспечивается действием МБЛ, а к ампициллину и цефтазидиму обусловлена наличием как МБЛ, так и эффлюкса. Устойчивость *B. subtilis* HSA06 к пенициллину и ампициллину обеспечивает только активность МБЛ. У *B. amyloliquefaciens* HSA09 устойчивость к ампициллину объясняется как наличием МБЛ, так и действием эффлюкс-насосов, а к пенициллину обеспечивается только действием эффлюкса.

Таким образом, у исследованной группы бацилл резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, металло-β-лактамазы и/или эффлюкс-насосы. Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, минимальная ингибирующая концентрация, эффлюкс-насосы, активность β-лактамаз, асептические помещения

Любая обитаемая среда на Земле, в которой люди проводят большую часть своего времени, характеризуется определенным микробным сообществом. Воздушное пространство и рабочие поверхности большинства рабочих помещений подвергаются очистке от микроорганизмов с помощью систем естественной вентиляции и влажной уборки с применением моющих веществ. Только в некоторых специальных помещениях – операционных, родильных отделениях, палатах интенсивной терапии, лабораториях для отбора проб крови, асептических комнатах для производства медицинских препаратов количество микроорганизмов в воздухе и на поверхностях оборудования поддерживается на минимальном уровне с помощью бактериальных фильтров, ультрафиолетового облучения и дезинфицирующих растворов.

Одним из видов таких асептических помещений являются лабораторные комнаты для отбора проб крови. Эти помещения являются агрессивной для микроорганизмов средой обитания в связи с постоянным воздействием УФ-излучения и регулярным использованием различных дезинфицирующих средств. В основе микробной контаминации таких помещений лежит постоянный приток новых посетителей, как правило, подвергающихся лечению антибиотиками и имеющих низкий иммунный статус. В результате на рабочих поверхностях лабораторных комнат выживают штаммы бактерий, устойчивых к дезинфицирующим растворам и часто обладающие множественной лекарственной

устойчивостью (МЛУ) [1]. Резистентные к УФ-излучению и дезинфицирующим средствам (чаще всего спорообразующие) бактерии, способны вызывать множество заболеваний у человека. Так установлено, что бактерии рода *Bacillus* являются возбудителями многих заболеваний, особенно у людей со сниженным иммунитетом [2–4]. Однако информации о клинических характеристиках бактерий, обитающих в чистых комнатах и асептических помещениях, еще очень мало. Известно, что МЛУ у бактерий может быть обусловлена одним или одновременно несколькими механизмами [1].

Целями работы были выделение из лаборатории для отбора проб крови изолятов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, изучение устойчивости к ряду клинически значимых β -лактамовых антибиотиков и определение возможных механизмов этой резистентности.

Материалы и методы

Исследовали бактерии, выделенные из смывов рабочих поверхностей оборудования больницы лаборатория, предназначенной для отбора проб крови. Отбор проб, получение изолятов и чистых культур выполняли аналогично забору и анализу проб из Российского сегмента международной космической станции [5]. Пробы отбирали до начала работы лаборатории, через 10 мин после ночного УФ-облучения и утренней антисептической обработки рабочих поверхностей дезрастворами. Идентификацию бактерий осуществляли путем анализа генов 16S рРНК [6]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясо-пептонным бульоном (МПБ) и 1% глюкозы, проводили с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit KO 512 (Thermo Scientific, США) по методике, рекомендуемой разработчиками этого комплекта реактивов. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров (Синтол, Россия) В63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') и В1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Полученные фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле с помощью электрофореза (120 В). Агарозный гель готовили, добавляя агарозу (1–1,2%) в 1× трис-ацетатный (ТАЕ) буфер, нагревали до 90–95 °С, перемешивали до полного растворения агарозы, добавляли 7,5 мкл раствора бромистого этидия на каждые 150 мл раствора, охлаждали до 45–50 °С и заливали в специальную форму. После полимеризации гель переносили в электрофорезную горизонтальную камеру Mini-SubCellGT (Bio-Rad, США). В образцы с фрагментами ДНК добавляли буфер в объемном соотношении 1:5. Электрофоретическое разделение проводили в буфере 1× ТАЕ. Фрагменты нуклеиновых кислот определяли в УФ-свете. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABIPRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo

Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Scientific, США). Для видовой идентификации проводили сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с базой данных GenBank. Сходство штаммов с ближайшим гомологом гена 16S рРНК составляло 99,1–99,6%. Для подтверждения данных по идентификации бактерий, полученных анализом генов 16S рРНК, их идентификацию проводили также методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией – MALDI-ToF [7]. Идентификация микроорганизмов была осуществлена на приборе MALDI-Tof autoflex III L200 Biotyper (Bruker, Германия). Определение значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков (МИК) проводили методом их последовательных двукратных разведений с использованием 96-луночных планшетов (Eppendorf, Германия), как описано ранее [5]. Получали суточную культуру бактерий в МПБ с 1% глюкозы с оптической плотностью 1,0 (OD 600 нм), затем суспензию клеток разбавляли МПБ до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и вносили в лунки. Далее в лунки вносили антибиотик так, чтобы его концентрация в лунке первого ряда 12-рядного планшета составляла 4096 мкг/мл с последующим двукратным разведением в лунках следующих 11 рядов до концентрации 2 мкг/мл. Для оценки роста бактерий в каждую лунку добавляли резазурин (Sigma, США) до концентрации 50 мкМ. В последнем выпуске The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>. EUCAST, v.12.0. 2022) критерии интерпретации для оценки устойчивости *Bacillus* spp. к цефалоспорином отсутствуют, но присутствуют для очень близких по механизму и спектру действия к цефалоспорином антибиотикам – представителям класса β -лактамовых антибиотиков широкого спектра действия – имипенему и меропенему (карбапенемы). При этом значения МИК имипенема для устойчивых к нему штаммов комплекса *Bacillus cereus* приводятся в диапазоне выше 0,5 мкг/мл. Таким образом, в случае цефалоспоринов можно считать устойчивыми к ним все штаммы *Bacillus* spp. со значениями МИК этих антибиотиков выше 2 мкг/мл.

Для определения активности эффлокса в 96-луночный планшет вносили питательную среду и соответствующий антибиотик в концентрации от 4096 до 1 мкг/мл, а затем в каждую лунку добавляли протонофор – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (carbonyl-cyanide-3-chlorophenylhydrazone, СССР, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. В качестве контролей использовали лунки с антибиотиком, но без добавления СССР и лунки, содержащие только питательную среду с культурой и СССР. О влиянии

СССР на рост судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ [8]. Активность эффлюкса оценивали по отношению кратности уменьшения (КУ) МИК антибиотиков в культурах без СССР к значениям МИК при его добавлении. При величине $KY < 4$ отмечали отсутствие эффлюкса, при KY в диапазоне от 4 до 16 регистрировали его умеренную активность, а при $KY > 16$ фиксировали высокую активность [8].

Для оценки активности металло- β -лактамаз (МБЛ) использовали метод дисков с ЭДТА [9, 10]. Суспензию клеток распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона. Затем в центр среды помещали диск с 10 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, а на расстоянии 15 мм от него диски с антибиотиками. Образование зоны подавления роста бактериального газона между диском с ЭДТА и диском, содержащим антибиотик, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемой бактерии. Гены клинически значимых лактамаз детектировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR, RT-PCR) с помощью набора «Гены VIM, NDM, OXA-48, KPC, обуславливающие резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином I, II, III и IV поколений» (Литех, Россия), согласно инструкции производителя. Бактериальную ДНК для этого выделяли с помощью набора ДНК-сорб (Интерлабсервис, Россия). Все опыты проводили трехкратно в двух повторностях в каждой серии. Результаты в их конечном виде (приведенные в таблицах) получали путем вычисления среднего арифметического (X) из результатов всех повторностей (X_n) при условии, что они различались не более чем на 10% ($|X_n - X| \leq 0,05 X$). При этом расчет среднего арифметического проводили, исключая «сомнительные результаты» («X»), не входящие в доверительный интервал $|X_n - X| = t \cdot \sigma$, где X – среднее арифметическое без учета «сомнительных результатов», t – нормированное отклонение при $P_{0,95}$ для малых выборок ($n < 30$), а σ – среднее квадратичное отклонение ($\pm \sqrt{(\sum(X_n - X)^2 / (n-1))}$ без учета «X».

Результаты и обсуждение

Получение и идентификация культур. В процессе получения изолятов бактерий по макроморфологическим (колонии на плотной среде) и микроморфологическим (морфология клеток под микроскопом) характеристикам из двадцати изолятов были отобраны пять, доминирующих по частоте встречаемости их колоний на плотных средах. Результаты идентификации чистых культур до вида, которые были осуществлены анализом последовательностей 16S рРНК и анализом белков методом MALDI-ToF, полностью совпали. Бактерии идентифицированы как *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06 и *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09.

Определение МИК. Исследована устойчивость бактерий к ряду β -лактамных антибиотиков – пенициллину, ампициллину, производным цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуросим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений и спектиномицину. Спектиномицин не относится к β -лактамным антибиотикам и используется в качестве резервного препарата в случаях невозможности лечения пациентов цефалоспорином третьего и четвертого поколений из-за аллергических реакций (табл. 1). Три из выделенных штаммов бактерий – *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03 показали очень высокую резистентность к пенициллину и ампициллину со значением МИК 2048 мкг/мл (табл. 1). Устойчивость *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 к пенициллину и ампициллину оказалась ниже. Значения МИК для этих антибиотиков у *B. amyloliquefaciens* HSA09 составляли 1024 мкг/мл, а у *B. subtilis* HSA06 – 256 мкг/мл (табл. 1). Устойчивость *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03 к антибиотикам цефалоспоринового ряда оказалась в несколько раз ниже, чем к пенициллину и ампициллину, однако значения МИК были достаточно высокими и составляли от 64 до 1024 мкг/мл. В отличие от этого штаммы *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали устойчивость только к традиционным антибиотикам ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл, в то время как устойчивость этих штаммов к цефалоспорином I–IV-го поколений цефазолину, цефуросиму, цефтриаксону, цефоперазону, цефтазидиму и цефепиму была низкой со значениями МИК 2–4 мкг/мл. Все пять штаммов бацилл показали резистентность к спектиномицину в диапазоне МИК от 16 мкг/мл у *B. subtilis* HSA06 до 265 мкг/мл у *B. cereus* HSA01 (табл. 1).

Определение наличия эффлюкса. Эффлюкс является одним из основных механизмов защиты клеток от антибиотиков [11]. Возможность функционирования эффлюкс-насосов определяли для тех антибиотиков, к которым у бактерий была обнаружена высокая резистентность (табл. 1). Установлено, что у *B. cereus* HSA01 в присутствии пенициллина или ампициллина активность эффлюкса высокая, так как кратность уменьшения значения МИК каждого из этих антибиотиков в присутствии СССР в среде составляла 32. У *B. cereus* HSA03 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 активность эффлюкса в присутствии пенициллина или ампициллина умеренная. В то же время у *B. cereus* HSA12 и *B. subtilis* HSA06 наличие СССР в среде с этими антибиотиками не выявило функционирования эффлюкса (табл. 2).

Для изучения эффлюкса у *B. cereus* HSA01 были отобраны также цефуросим, цефтазидим, цефепим (как цефалоспорины II, III и IV поколений, к которым у штамма HSA01 обнаружена высокая резистентность) и спектиномицин (как

антибиотик, заведомо не подверженный действию β -лактамазы и к которому штамм HSA01 проявил высокую устойчивость с МИК 256 мкг/мл). Показана умеренная активность эффлюкс-насосов у *B. cereus* HSA01 только в отношении цефуроксима и полное отсутствие эффлюкса при наличии в среде других антибиотиков (табл. 2).

У *B. cereus* HSA12 действие эффлюкса исследовали в отношении цефепима, цефтазидима и цефуроксима с МИК 1024 мкг/мл, а также цефтриаксона и цефазолина с МИК 512 и 128 мкг/мл соответственно. Наличие умеренной активности эффлюкса обнаружено только в присутствии цефтазидима и цефуроксима (табл. 2).

Действие эффлюкса у *B. cereus* HSA03 изучали в вариантах с цефазолином, цефуроксимом, цефтазидимом и цефепимом со значениями их МИК 128, 1024, 256 и 1024 мкг/мл соответственно

(табл. 2). Умеренная активность эффлюкс-насосов показана только в отношении цефепима и цефтазидима (табл. 2).

Определение активности β -лактамаз. Наряду с системой эффлюкса устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам может обеспечиваться также наличием у них ферментов β -лактамаз, разрушающих эти антибиотики. Различают сериновые β -лактамазы молекулярных классов С, А, D и МБЛ класса В [12]. На рис. 1 показан результат типичного опыта по выявлению МБЛ, относящихся к классу В, по образованию зоны подавления роста бактериального газона *B. cereus* HSA03 между диском, содержащим ЭДТА в центре чашки, и дисками, содержащими цефазолин и цефтазидим. Исследование наличия МБЛ у *B. cereus* HSA01 с помощью ЭДТА-теста показало наличие МБЛ-активности в отношении пеницил-

Таблица 1

МИК антибиотиков (мкг/мл) у штаммов бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Ампициллин	Пенициллин	Цефазолин	Цефуроксим	Цефтриаксон	Цефоперазон	Цефтазидим	Цефепим	Спектиномицин
<i>Bacillus cereus</i> HSA01	2048	2048	64	1024	128	128	512	512	256
<i>Bacillus cereus</i> HSA12	2048	2048	128	1024	512	128	1024	1024	128
<i>Bacillus cereus</i> HSA03	2048	2048	128	1024	256	128	256	1024	64
<i>Bacillus subtilis</i> HSA 06	256	256	2	4	2	2	4	2	16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HSA09	1024	1024	2	2	2	2	2	2	64

Таблица 2

Значения МИК антибиотиков, активность эффлюкс-насосов и наличие β -лактамаз у штаммов бактерий для пенициллина, ампициллина и некоторых цефалоспоринов

Микроорганизм	Антибиотик	МИК мкг/мл	МИК мкг/мл + СССР	Кратность уменьшения	Активность эффлюкса	Металло- β -лактамазы (ЭДТА-тест)	Лактамазы NDM, VIM (класс В), KPC (класс А), OXA-48 (класс D)
<i>B. cereus</i> HSA01	Ампициллин	2048	64	32	Высокая	–	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA01	Пенициллин	2048	64	32	Высокая	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефепим	512	512	1	Отсутствует	–	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефтазидим	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA01	Спектиномицин	256	256	1	Отсутствует	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA12	Ампициллин	2048	2048	1	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA12	Пенициллин	2048	2048	1	Отсутствует	–	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефепим	1024	1024	1	Отсутствует	–	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	–	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтазидим	1024	128	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтриаксон	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA03	Ампициллин	2048	128	16	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Пенициллин	2048	128	16	Умеренная	–	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефепим	1024	128	8	Умеренная	–	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефтазидим	256	32	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефуроксим	1024	1024	1	Отсутствует	н/о	Не обнаружено
<i>B. subtilis</i> HSA06	Ампициллин	256	256	1	Отсутствует	+	
<i>B. subtilis</i> HSA06	Пенициллин	256	128	2	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Ампициллин	1024	256	4	Умеренная	+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Пенициллин	1024	128	8	Умеренная	–	Не обнаружено

Знак «н/о» означает, что МБЛ для этих антибиотиков не определяли.

лина и цефтазидима (табл. 2). У *B. cereus* HSA12 тест выявил МБЛ, гидролизующие ампициллин, а также цефалоспорины III-го поколения цефтазидим и цефтриаксон с МИК этих антибиотиков 2048, 1024 и 512 мкг/мл соответственно. У *B. cereus* HSA03 МБЛ-активность обнаружена в отношении ампициллина, цефазолина и цефтазидима (табл. 2). Штамм *B. subtilis* HSA06 отличается очень низкими значениями МИК в отношении всех исследуемых антибиотиков-цефалоспоринов, но характеризуется достаточно высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 256 мкг/мл (табл. 1). У этого штамма ЭДТА-тест показал наличие МБЛ, гидролизующих оба этих антибиотика, в то время как активность эффлюкса у этого штамма в присутствии ампициллина и пенициллина отсутствует (табл. 2). *B. amyloliquefaciens* HSA09, характеризующийся очень низкими значениями МИК в отношении исследуемых антибиотиков цефалоспоринового ряда, но отличающийся высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл (табл. 1), показал умеренную активность эффлюкса в отношении этих двух антибиотиков, однако активность МБЛ обнаружена только к ампициллину (табл. 2).

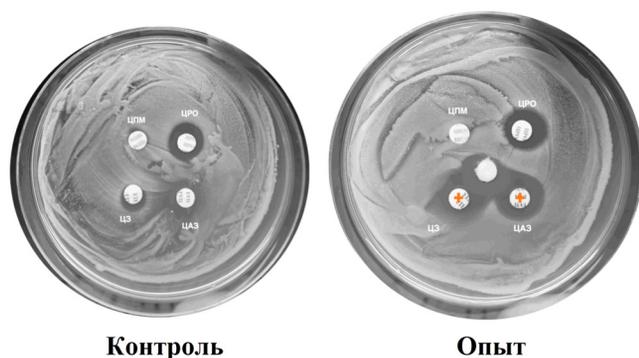


Рисунок. Определение наличия металло- β -лактамаз. Зона подавления роста *B. cereus* HSA03 возникла между дисками с ЭДТА, цефазолином и цефтазидимом.

Цефепим (ЦПМ);
 Цефтриаксон (ЦРО);
 Цефазолин (ЦЗ);
 Цефтазидим (ЦАЗ).

Кроме методики выявления активности МБЛ (класс В) с помощью ЭДТА-теста, применялась также методика RT-PCR определения как сериновых β -лактамаз, так и МБЛ типов KPC (класс А), NDM, VIM (класс В) и OXA-48 (класс D). Однако в группе исследуемых бактерий ни один из перечисленных типов β -лактамаз выявить не удалось (табл. 2).

Исследование микробного состава замкнутых помещений выявило преобладание в них бактерий родов *Staphylococcus* и *Bacillus* [5, 13–15]. Наличие бацилл связано с их способностью образовывать эндоспоры, что объясняет чрезвычайно высокую устойчивость к высушиванию, обработке дезрастворами, УФ-излучению и недостатку питатель-

ных веществ [16]. Многие виды бацилл, кроме *B. anthracis*, являются оппортунистическими и даже патогенными [2–4]. Бациллярные инфекции разделяют на три группы. Первая и вторая группы болезней вызываются в основном *B. cereus*, *B. sphaericus* и *B. thuringiensis*. Это поражения глаз и инфекции глубоких тканей. Третью группу заболеваний представляют инфекции, вызванные диссеминированием клеток бацилл из очага поражения лимфогенным или гематогенным путями по всему организму. Возникают бактериемия, эндокардит, менингит и другие формы генерализованной бактериальной инфекции. Основным видом, вызывающим такие инфекции, является *B. cereus*. [3, 17, 18]. Следовательно, *B. cereus* является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. При этом *B. cereus* формирует особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и *B. anthracis* [4, 18]. Показано, что некорректная антибиотикотерапия вызывает высокий уровень смертности у пациентов с бактериемией, вызванной *B. cereus* [3, 19]. Антимикробные препараты для эмпирической терапии должны выбираться в соответствии с чувствительностью к ним возбудителя. Однако еще мало данных о клинических характеристиках штаммов *B. cereus*, вызывающих инфекции системы кровообращения (bloodstream infections, BSI) и их эмпирической терапии. BSI-инфекции чаще всего связаны с такими факторами передачи, как аппараты искусственной вентиляции легких и венозные внутрисосудистые катетеры [17]. Таким образом, наш выбор в качестве объекта исследования поверхностей оборудования лаборатории для забора проб крови был оправданным.

Причиной появления в медицинской лаборатории бактерий, резистентных к антибиотикам, могут быть мутации, появившиеся в результате обработки оборудования различными дезинфектантами и УФ-лучами. Очень высока вероятность попадания в лабораторию устойчивых к противомикробным препаратам бактерий также с потоком посетителей, особенно с низким иммунным статусом, подвергавшихся в течение долгих лет лечению антибиотиками в неконтролируемых дозах [3, 13]. Устойчивость к антибиотикам у попадающих в лабораторию с посетителями штаммов бацилл могла появиться и в результате переноса в них генов с помощью плазмид – в частности от стафилококков [13, 14, 20, 21]. Исследованные нами штаммы бактерий могли приобрести один из известных механизмов защиты от антибиотиков. Мы исследовали возможность функционирования у наших штаммов двух механизмов защиты – эффлюкс и β -лактамазная активность.

У бактерий гены, кодирующие эффлюксные белки, находятся в хромосомах или плазмидах, поэтому способны передаваться в результате

горизонтального переноса. А возникающие мутации приводят к повышенной экспрессии генов, кодирующих эффлюкс-насосы для выведения из клетки часто нескольких препаратов [22]. Различают семейства первичных и второстепенных насосов. Первичные транспортеры включают семейство ABC, которое действует за счет гидролиза АТФ, а в группу второстепенных эффлюкс-насосов входят семейства MFS, SMR, RND, MATE, функционирующие за счет мембранного электрохимического потенциала [21, 22]. У представителей рода *Bacillus* обнаружены насосы всех известных семейств [23]. Изучение структуры эффлюкс-насосов у бактерий группы *B. cereus*, три из которых – *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* являются патогенами людей, животных и насекомых, показало, что у штаммов этих видов функционирует, соответственно, по 93, 93 и 103 системы эффлюкса из всех известных семейств. Однако большинство идентифицированных систем оттока антибиотиков были классифицированы в пределах семейств MFS (более 50 насосов у каждого из трех штаммов) или ABC (до 35 транспортных систем) и всего от 3 до 5 эффлюкс-насосов каждого из семейств RND, MATE и SMR [22]. Характер влияния СССР на действие антибиотиков (табл. 2) и данные литературы позволяют считать, что транспортеры, обнаруженные у исследованных нами штаммов бацилл, вероятно, относятся к второстепенным транспортерам семейства MFS. Результаты, свидетельствующие о том, что функционирование эффлюкс-систем, регистрируемое в присутствии одного антибиотика не обнаруживается при действии других препаратов с аналогичным механизмом действия (табл. 2), можно объяснить тем, что у каждого штамма *B. cereus* могут функционировать одновременно десятки систем эффлюкса. У *B. cereus* ATCC 14579 в геноме обнаружено 28, 53, 4, 4, и 3 системы насосов, принадлежащих к семействам ABC, MFS, MATE, SMR, и RND соответственно. У исследуемых бактерий не определяли наличие первичных насосов семейства ABC [23]. Количеством, разнообразием и соотношением разных семейств эффлюкса у каждого штамма бацилл, функционирующих одновременно и с разной эффективностью в отношении разных по структуре антибиотиков, может быть обусловлено также наличие или отсутствие эффлюкса по отношению к определенному антибиотику у разных штаммов *B. cereus*. Кроме того, у каждого штамма, кроме эффлюкса, могут работать и другие механизмы защиты, действующие одновременно с оттоком.

Определение активности МБЛ с помощью ЭДТА-теста показало, что она выявлялась чаще всего в отношении ампициллина – у *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03, *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 и реже в присутствии пенициллина – у *B. cereus* HSA01 и *B. subtilis* HSA06

(табл. 2). ЭДТА-тест обнаружил действие МБЛ также в отношении цефтазидима у *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03, а при наличии цефтриаксона у *B. cereus* HSA12 и цефазолина – у *B. cereus* HSA03 (табл. 2). *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. licheniformis* являлись одними из первых объектов биохимических исследований β -лактамаз, на результатах которых были основаны будущие исследования β -лактамаз и их классификация [12]. Были описаны четыре молекулярных класса β -лактамаз (А, В, С и D) на основе размера молекулы и гомологии между аминокислотными последовательностями активного центра, и считалось, что ферменты класса D существуют только у граммотрицательных бактерий. Но недавно ферменты класса D были обнаружены у *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. atrophaeus* [24]. Общее количество всех уникальных лактамаз, принадлежащих к более чем 20 семействам и 4 классам, составляет около 2800 [12]. Идентификация β -лактамаз до класса возможна на основе реакций с ингибитором лактамаз класса А клавулановой кислотой, ингибитором серин-лактамаз широкого спектра действия авибактамом и хелатором ионов металлов ЭДТА для идентификации МБЛ [12]. У штаммов бацилл, исследуемых с помощью ЭДТА-теста, показана активность МБЛ, относящихся к классу В (табл. 2). Однако методом RT-PCR обнаружить β -лактамазы определенных семейств – NDM, VIM, (класс В), KPC (класс А) и OXA-48 (класс D) не удалось ни у одной из исследуемых бактерий (табл. 2). МБЛ сгруппированы в соответствии со сходством последовательностей и координацией цинка в три подкласса: В1, В2 и В3. Показано, что МБЛ VcII у *B. cereus* относится к подклассу В1, куда входят также ферменты семейств VcII, CcrA, IMP-1, VlaV, SPM-1, VIM-2 и NDM-1 [12, 25]. Следовательно, МБЛ этих семейств и семейства IMP, наличие которых мы еще не исследовали методом RT-PCR, необходимо в дальнейшем изучить у выделенных бацилл. С помощью ЭДТА-теста МБЛ (класс В) обнаружены у всех штаммов исследуемых бацилл (табл. 2). Однако отсутствие активности МБЛ у этих бацилл в присутствии некоторых антибиотиков (табл. 2), свидетельствует о необходимости применять наряду с ЭДТА-тестом другие методики обнаружения МБЛ, поскольку чувствительность этого метода может зависеть как от особенностей штамма бактерий, так и от свойств конкретного антибиотика, например, в присутствии цефепима ни у одного штамма бацилл действие МБЛ обнаружить не удалось. Следует отметить, что у бактерий рода *Bacillus* наряду с действием эффлюкса и β -лактамазами, в отношении β -лактамов может функционировать и такой механизм антибиотикостойчивости, как модификация мишени [26, 27]. В вегетативных и спорулирующих клетках *B. cereus* было обнаружено 8 основных типов пе-

нициллинсвязывающих белков (ПСБ) бактериальных мембран. Изучено сродство этих ПСБ к β -лактамам цефалоспоринового ряда цефалексину, цефокситину и цефотаксиму [26]. Следовательно, у бактерий рода *Bacillus* могут одновременно функционировать по крайней мере несколько механизмов защиты от антибиотиков – действие эффлюкса, β -лактамаз и модификация мишени. Эти механизмы могут функционировать одновременно, но вклад каждого из них зависит как от штамма бактерий, так и конкретного антибиотика.

Таким образом, среди штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхностей оборудования медицинской лаборатории для отбора анализов крови, преобладали известные способностью вызывать ряд заболеваний человека штаммы *B. cereus*. Все три представителя *B. cereus* показали высокую устойчивость к ампициллину и пенициллину со значением МИК 2048 мкг/мл и ряду β -лактамных антибиотиков цефалоспоринового ряда I–IV-го поколений в диапазоне

64–1024 мкг/мл (табл. 1). В отличие от этого, штаммы *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали устойчивость только к традиционным антибиотикам ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл, в то время как значения МИК для цефазолина, цефуроксима, цефтриаксона, цефоперазона, цефтазидима и цефепима составляли только 2–4 мкг/мл. У исследованной группы бацилл резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, МБЛ и/или эффлюкс-насосы. Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

Исследование осуществлялось в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nikaido H.* Multidrug resistance in bacteria // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78. P. 119–146.
2. *Farrar W.E., Reboli A.C.* The genus *Bacillus*—Medical // *The Prokaryotes. Handbook on the biology of bacteria*, vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. P. 609–630.
3. *Bianco A., Capozzi L., Monno M.R., Del Sambio L., Manzulli V., Pesole G., Loconsole D., Parisi A.* Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 11: 599524.
4. *Ehling-Schulz M., Koehler T.M., Lereclus D.* The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential // *Gram-positive pathogens*. 3rd Ed. / Eds. V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, M. Braunstein, and J.I. Rood. Washington: ASM Press, 2019. P. 875–902.
5. *Yenikeyev R.R., Tatarinova N.Y., Zakhar-chuk L.M.* Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 224–230.
6. *Janda J.M., Abbot S.L.* 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45. N 9. P. 2761–2764.
7. *Hrabak J., Chudackova E., Walkova R.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis // *Clin. Microbiol. Rev.* 2013. Vol. 26. N 1. P. 103–114.
8. *Ardebili A., Lari A.R., Talebi M.* Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // *Ann. Lab. Med.* 2014. Vol. 34. N 6. P. 433–438.
9. *Aoki N., Ishii Y., Tateda K., Saga T., Kimura S., Kikuchi Y., Kobayashi T., Tanabe Y., Tsukada H., Gejyo F., Yamaguchi K.* Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo- β -lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. Vol. 54. N 11. P. 4582–4588.
10. *Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А.* Распространенность металл- β -лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012–2015 гг. // *Вестн. РАМН.* 2015. Т. 70. № 6. С. 679–683.
11. *Li X.Z., Nikaido H.* Efflux-mediated drug resistance in bacteria // *Drugs.* 2004. Vol. 64. N 2. P. 159–204.
12. *Bush K.* Past and present perspectives on β -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. Vol. 62. N 10: e01076-18.
13. *Timmery S., Hu X., Mahillon J.* Characterization of bacilli isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the International Space Station // *Astrobiology.* 2011. Vol. 11. N 4. P. 323–334.
14. *Coil D.A., Neches R.Y., Lang J.M., Brown W.E., Severance M., Cavalier D.D., Eisen J.A.* Growth of 48 built environment bacterial isolates on

board the International Space Station (ISS) // Peer J. 2016. Vol. 4: e1842.

15. Moissl-Eichinger C., Cockell C., Rettberg P. Venturing into new realms? Microorganisms in space // FEMS Microbiol. Rev. 2016. Vol. 40. N 5. P. 722–737.

16. Horneck G., Moeller R., Cadet J., Douki T., Rocco L., Mancinelli R.L., Wayne L., Nicholson W.L., Panitz C., Rabbow E., Rettberg P., Spry A., Stackebrandt E., Vaishampayan P., Venkateswaran K.J. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes – Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // Astrobiology. 2012. Vol. 12. N 5. P. 445–456.

17. Uchino Y., Iriyama N., Matsumoto K., Hirabayashi Y., Miura K., Kurita D., Kobayashi Y., Yagi M., Kodaira H., Hojo A., Kobayashi S., Hatta Y., Takeuchi J. A case series of *Bacillus cereus* septicemia in patients with hematological disease // Intern. Med. 2012. Vol. 51. N 19. P. 2733–2738.

18. Schmid P.J., Maitz S., Kittinger C. *Bacillus cereus* in packaging material: Molecular and phenotypic diversity revealed // Front. Microbiol. 2021. Vol. 12: 698974.

19. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 // Crit. Care Med. 2013. Vol. 41. N 2. P. 580–637.

20. Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer // Science. 2019. Vol. 364. N 6442. P. 778–782.

21. Foster T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects // FEMS Microbiol. Rev. 2017. Vol. 41. N 3. P. 430–449.

22. Baranova N., Elkins C.A. Antimicrobial drug efflux pumps in other gram-positive bacteria // efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, regulation and clinical implications / Eds. X. Li, C.A. Elkins, and H.I. Zgurskaya. Springer Publ., 2016. P. 197–218.

23. Hassan K.A., Fagerlund A., Elbourne L.D.H., Voros A., Kroeger J.K., Simm R., Tourasse N.J., Finkle S., Henderson P.J.F., Okstad J.A., Paulsen I.T., Kolsato A. The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group // PLoS One. 2017. Vol. 12. N 5. P. 35.

24. Stewart N.K., Bhattacharya M., Toth M., Smith C.A., Vakulenko S.B. A surface loop modulates activity of the *Bacillus* class D β -lactamases // J. Struct. Biol. 2020. Vol. 211. N 2: 107544.

25. Karsisiotis A.I., Damblon C.F., Gordon C.K., Roberts G.C.K. Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid // Biochem J. 2013. Vol. 456. N 3. P. 397–407.

26. Miyamoto T, Sukimoto K, Sayed A., Kim S., Honjoh K., Hatano S. Detection of penicillin-binding proteins in *Bacillus cereus* by using biotinylated β -lactams // J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 2000. Vol. 44. N 3. P. 299–307.

27. van Duijkeren E., Schink A.K., Roberts M.C., Wang Y., Schwarz S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents // Microbiol. Spectr. 2017. Vol. 6. N 2. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017>.

Поступила в редакцию 21.12.2022

После доработки 16.04.2022

Принята в печать 13.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics in strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples obtained from a medical institution

R.R. Yenikeev* , N.Y. Tatarinova , L.M. Zakharchuk , E.N. Vinogradova 

Department of Microbiology, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com

Isolates of bacterial strains dominating on the surfaces of medical laboratory equipment for the selection of blood tests were obtained. Pure cultures of these bacteria are identified as *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06, *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09. The resistance of bacteria to a number β -lactam antibiotics and spectinomycin was determined. All strains are resistant to penicillin and ampicillin with a minimum inhibitory concentration (MIC) from 256 to 2048 $\mu\text{g/ml}$, as well as to cephalosporin antibiotics with a MIC value from 2 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial resistance to spectinomycin used in patients with allergy to penicillins and cephalosporins is in the MIC range from 16 to 256 $\mu\text{g/ml}$.

In *B. cereus* HSA01, resistance to ampicillin and cefuroxime is due to the operation of efflux pumps, to ceftazidime is provided by the action of metal- β -lactamases (MBL), and to penicillin is explained by the operation of both these systems. High resistance to ampicillin *B. cereus* HSA12 is provided by the action of MBL, to cefuroxime – by efflux activity, while resistance to ceftazidime is accompanied by the presence of MBL and the action of efflux pumps. In *B. cereus* HSA03, resistance to penicillin, ampicillin, cefepime, and ceftazidime is explained by efflux activity, to cefazolin and ceftazidime is provided by MBL, and to ampicillin and ceftazidime is due to the presence of both MBL and efflux. The resistance of *B. subtilis* HSA06 to penicillin and ampicillin is provided only by MBL activity. In *B. amyloliquefaciens* HSA09, resistance to ampicillin is explained by both the presence of MBL and efflux pumps, and to penicillin is provided only by the action of efflux.

Thus, in the studied group of bacilli, resistance to penicillin, ampicillin and a number of cephalosporin derivatives is provided, depending on the strain and the specific antibiotic, of metal- β -lactamase and/or efflux pumps. Pumps function due to the electrochemical potential of the cell membrane and belong to the group of secondary transporters.

Keywords: *Bacteria of the genus Bacillus, antibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, efflux pumps, β -lactamase activity, aseptic rooms*

Сведения об авторах

Еникеев Радмир Рустамович – аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: radmir.yenikeyev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8467-9051>

Татарина Наталья Юрьевна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: nata.tatarinova53@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9883-5780>

Захарчук Леонид Михайлович – докт. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: zakharchuk@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3783-3279>

Виноградова Елизавета Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: lizavin@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4936-2593>