

УДК 579.85.08

Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий

О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, М.Н. Степанова

НИИ антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО «СГМА Росздрава», Смоленск, Россия

Продукция металло- β -лактамаз ($M\beta L$) становится все более частой причиной резистентности к бета-лактамам антибиотикам у грамотрицательных неферментирующих бактерий, прежде всего, у *Pseudomonas* spp. и *Acinetobacter* spp. Очевидно, что наличие в клинических микробиологических лабораториях надежных методов выявления продукции $M\beta L$ является необходимым условием эффективного инфекционного контроля и предупреждения широкого распространения данного механизма резистентности. В статье представлены методы обнаружения $M\beta L$ у грамотрицательных неферментирующих бактерий. Метод «двойных дисков с ЭДТА» пред-

назначен для фенотипического скрининга $M\beta L$ и основан на обнаружении синергизма между цефтазидимом, имипенемом, меропенемом и этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) в отношении $M\beta L$ -продуцирующих штаммов. Метод мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) дополнительно позволяет идентифицировать внутренние фрагменты генов, кодирующих $M\beta L$ двух наиболее распространенных типов: VIM и IMP.

Ключевые слова: металло- β -лактамазы, $M\beta L$, грамотрицательные неферментирующие бактерии, антибиотикорезистентность.

Metallo- β -Lactamases: Importance and Detection Methods in Gram-Negative Non-Fermenting Bacteria

O.V. Shevchenko, M.V. Edelstein, M.N. Stepanova

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

More frequently metallo-beta-lactamase ($M\beta L$) production becomes a reason of resistance to beta-lactam antibiotics among non-fermentative Gram-negative bacteria, foremost among *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. pathogens. It is evident that availability of reliable $M\beta L$ detection methods in microbiology laboratories is an indispensable condition demanded for effective infection control and rapid spread prevention of this resistance mechanism. In this review we show some $M\beta L$ detection methods in Gram-negative bacteria. EDTA-double-disc synergy test is a useful tool for phenotypic

screening of $M\beta L$, which is based on synergy detection between ceftazidime, imipenem, meropenem and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) in $M\beta L$ -producing strains. In addition to it multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis allows to identify internal fragments of two most common $M\beta L$ -coding genes: VIM and IMP.

Key words: metallo- β -lactamases ($M\beta L$), gram-negative non-fermentative bacteria, antimicrobial resistance.

Контактный адрес:

Оксана Владимировна Шевченко

Эл. почта: Oksana.Shevchenko@antibiotic.ru

Введение

Антибиотики группы карбапенемов обладают чрезвычайно широким спектром активности и высокой стабильностью к расщеплению большинством известных β-лактамаз, продуцируемых различными видами микроорганизмов. Вследствие этого, карбапенемы рассматриваются как одни из наиболее эффективных препаратов для лечения тяжелых инфекций. Вместе с тем, приобретенная устойчивость к антибиотикам данной группы становится все более распространенной среди грамотрицательных неферментирующих бактерий – возбудителей нозокомиальных инфекций. Формирование резистентности к карбапенемам у представителей родов *Pseudomonas* (в частности *P. aeruginosa*) и *Acinetobacter* может быть связано с различными механизмами, например с изменением проницаемости наружной клеточной мембраны, активацией систем эффлюкса или продукцией отдельных сериновых β-лактамаз, обладающих карбапенемазной активностью. Однако наибольшее клиническое и эпидемиологическое значение имеет продукция приобретенных *металло-β-лактамаз* (МβЛ). Опасность ферментов данного класса обусловлена их высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающим практически все бета-лактамные антибиотики [1, 2].

МβЛ принадлежат к ферментам молекулярного класса В [3], в активном центре которых присутствует цинк (Zn^{2+}). Вследствие этого активность МβЛ подавляется не классическими ингибиторами сериновых β-лактамаз (клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом), а различными хелатирующими ионами двухвалентных металлов агентами, например *этилендиаминтетраацетатом* (ЭДТА) или 2-меркаптопропионовой кислотой. Для отдельных видов *грамотрицательных неферментирующих бактерий* (ГНБ), в частности *Stenotrophomonas maltophilia* и *Burkholderia cepacia*, характерна продукция видоспецифических МβЛ, обуславливающих природную резистентность этих видов к карбапенемам. Экспрессия приобретенных МβЛ встречается у различных видов грамотрицательных бактерий, в основном у представителей родов *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*) и *Acinetobacter* (*A. baumannii*), реже у представителей *Enterobacteriaceae*. За последнее десятилетие описано 5 генетических групп приобретенных МβЛ: VIM, IMP, SPM, GIM и SIM [1, 4–6]. Наиболее широкое распространение и клиническое значение получили ферменты VIM и IMP типов. На сегодняшний день описано 14 вариантов VIM и 23

варианта IMP ферментов (<http://www.lahey.org/studies/other.asp>). Начиная с первого обнаружения IMP-1 в Японии в 1988 г. [7], МβЛ были выявлены впоследствии практически на всех континентах. Данные зарубежных эпидемиологических исследований свидетельствуют о достаточно широкой распространенности МβЛ в Японии, странах Юго-Восточной Азии (в Гонк Конге, Сингапуре, Тайване, Таиланде, Корее), Европы (в Италии, Испании, Греции, Франции, Португалии, Англии, Польше, Хорватии и Германии) и Латинской Америки (в Бразилии). Отдельные случаи обнаружения МβЛ описаны в США, Канаде и многих других странах [1]. В России, по данным многоцентровых исследований «РЕЗОРТ» и «Металл», в период с 2002 по 2007 гг. МβЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* выявлены в 23 стационарах 9 городов (Воронеж, Краснодар, Липецк, Москва, Нижний Новгород, Новосибирск, Омск, Смоленск и Тюмень). Возможность быстрого распространения МβЛ в значительной степени обусловлена тем, что кодирующие их гены, за исключением *bla_{SIM-1}*, локализованы внутри мобильных генетических элементов [8, 9]. Кроме того, сцепление генов МβЛ с другими детерминантами резистентности является частой причиной множественной лекарственной устойчивости штаммов-продуцентов МβЛ.

В связи с особой клинической значимостью такого механизма резистентности, как продукция МβЛ, и опасностью широкого распространения ферментов данной группы среди штаммов ГНБ, наличие в арсенале клинических микробиологических лабораторий методов быстрой детекции МβЛ представляется чрезвычайно важным.

Ниже представлены фенотипический и молекулярно-генетический методы выявления МβЛ, которые могут быть использованы как взаимодополняющие. Фенотипический тест, так называемый «метод двойных дисков с ЭДТА», основан на выявлении синергизма между бета-лактамами – цефтазидимом, имипенемом и меропенемом, которые являются субстратами для МβЛ, и ЭДТА, которая ингибирует ферменты данного класса. Молекулярно-генетический тест основан на использовании ПЦР с праймерами к генам наиболее распространенных МβЛ: VIM- и IMP-типов. Поскольку наиболее значимым маркером продукции МβЛ является устойчивость к карбапенемам, рекомендуется проводить тестирование на наличие приобретенных МβЛ у всех штаммов, проявляющих сниженную чувствительность или резистентность к карбапенемам, прежде всего у *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp.

Выявление продукции МβЛ с помощью фенотипического метода «двойных дисков с ЭДТА»

Метод «двойных дисков с ЭДТА» основан на способности ЭДТА хелатировать ионы цинка из активного центра МβЛ и подавлять их гидролитическую активность в отношении β-лактамных субстратов. При определении чувствительности МβЛ-продуцентов диско-диффузионным методом в присутствии ЭДТА наблюдается расширение зон подавления роста вокруг дисков с бета-лактамными антибиотиками, связанное с ингибированием МβЛ и восстановлением активности бета-лактамов.

Материалы. Стандартное оборудование и материалы для микробиологической лаборатории.

Контрольные штаммы:

- *P. aeruginosa* ATCC® 27853 (МβЛ⁻);
- *P. aeruginosa* 20677 (МβЛ⁻);
- *P. aeruginosa* VR-143/97

(VIM-1);

- *P. aeruginosa* 565 (VIM-2);
- *P. aeruginosa* 010 (VIM-10);
- *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1);
- *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2);
- *P. putida* VA-758/00 (IMP-12);
- *P. aeruginosa* MV461 (IMP-13).

Агар Мюллера–Хинтон (BIO-RAD Laboratories, Франция).

Диски с антибиотиками:

- цефтазидим 30 мкг (BIO-RAD Laboratories, Франция);
- имипенем 10 мкг (BIO-RAD Laboratories, Франция);
- меропенем 10 мкг (BIO-RAD Laboratories, Франция).

Двунариевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (РЕАХИМ, Россия).

Постановка теста. Постановку диско-диффузионного теста осуществляют в соответствии с методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [10].

Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенную на агаризованной среде. Несколько колоний стерильным тампоном или петлей переносят в пробирку с 3 мл стерильного изотонического

раствора натрия хлорида. Взвесь бактериальных клеток доводят до мутности 0,5 по МакФарланду и наносят стерильным ватным тампоном на поверхность агара Мюллера–Хинтон. Через 5–10 мин после инокулирования на подсохшую поверхность агара накладывают диски согласно следующей схеме: в центр – пустой диск, на который наносят 5 мкл 0,5 М раствора ЭДТА (рН 8,0), по бокам от него на расстоянии 15 мм между центрами дисков – диски с цефтазидимом, имипенемом и меропенемом (рис. 1). Чашки инкубируют в термостате при 35 °С в течение 16–18 ч. Параллельно с анализом испытуемых культур проводят исследование контрольных штаммов.

Интерпретация результатов. Образование расширенной зоны подавления роста между диском с ЭДТА и хотя бы одним из дисков, содержащих бета-лактамные антибиотики указывает на продукцию МβЛ у тестируемого микроорганизма

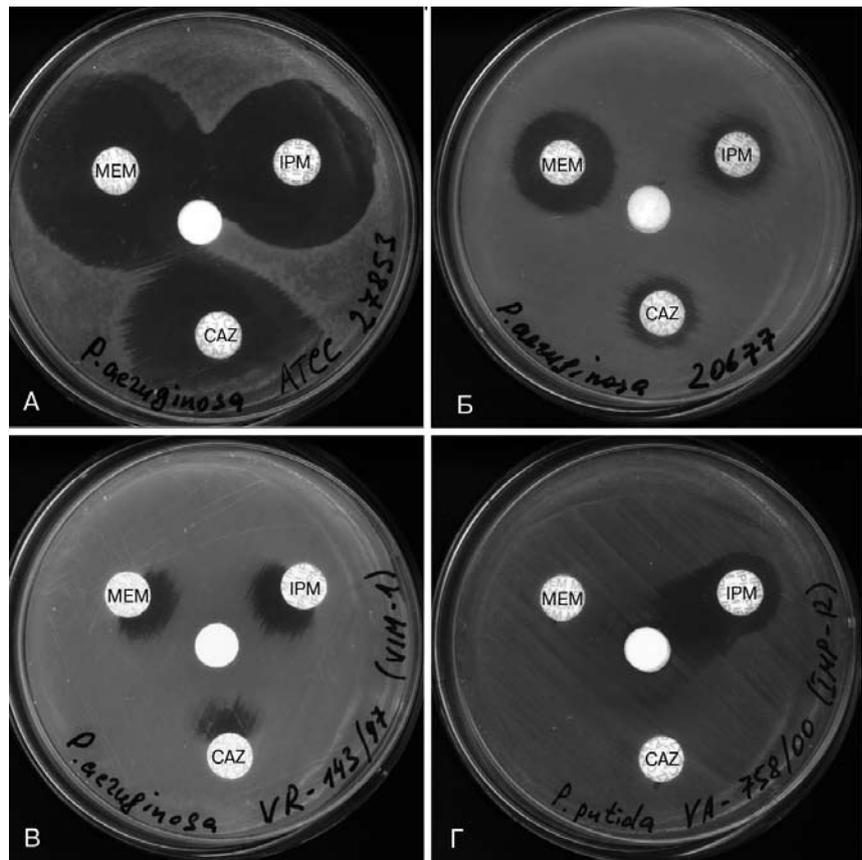


Рис. 1. Выявление продукции МβЛ с помощью метода «двойных дисков с ЭДТА». Отрицательные результаты (МβЛ⁻): А – *P. aeruginosa* ATCC® 27853; Б – *P. aeruginosa* 20677; положительные результаты (МβЛ⁺): В – *P. aeruginosa* VR-143/97 (VIM-1); Г – *P. putida* VA-758/00 (IMP-12). Обозначения дисков: CAZ – цефтазидим (30 мкг), IPM – имипенем (10 мкг), MEM – меропенем (10 мкг), диск без маркировки содержит 5 мкл 0,5 М раствора ЭДТА.

(см. рис. 1, В и 1, Г). Комбинация из трех дисков (имипенем, меропенем, цефтазидим) используется для повышения чувствительности метода, поскольку некоторые штаммы могут проявлять синергизм только с каким-либо одним из антибиотиков.

Примечание. При тестировании отдельных МβЛ-продуцирующих штаммов, проявляющих высокий уровень устойчивости к цефтазидиму, имипенему и меропенему (отсутствие зон подавления роста вокруг дисков с данными антибиотиками или МПК ≥ 64 мкг/мл), может быть получен ложноотрицательный результат из-за отсутствия видимого синергизма между дисками с ЭДТА и бета-лактамами антибиотиками, расположенными на расстоянии 15 мм между центрами (рис. 2, А и 2, В). В связи с этим для высокорезистентных штаммов рекомендуется дополнительная постановка теста с размещением дисков на более близком расстоянии – 10 мм между центрами (см. рис. 2, Б и 2, Г).

Выявление генов IMP и VIM с помощью мультиплексной ПЦР

Все процедуры, связанные с выделением бактериальной ДНК, амплификацией и анализом продуктов ПЦР, должны осуществляться в соответствии с «Методическими рекомендациями по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции» [11].

Представленный в данном разделе метод ПЦР позволяет детектировать гены всех известных β-лактамаз, принадлежащих к группам VIM и IMP. Метод основан на использовании в одной реакции двух пар праймеров к внутренним участкам генов *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* и может быть реализован как с использованием стандартного оборудования для ПЦР и электрофоретического анализа продуктов амплификации, так и в формате ПЦР в реальном времени. При этом идентификация и разделение ПЦР продуктов *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* генов осуществляются на основании оценки их молекулярной

массы или температуры плавления. Основными преимуществами реализации данного метода в формате ПЦР в реальном времени являются: высокая скорость, низкая трудоемкость и снижение риска контаминации продуктами ПЦР, что особенно важно при проведении эпидемиологических исследований.

Материалы. Стандартное оборудование и материалы для ПЦР-лабораторий.

Контрольные штаммы:

- *P. aeruginosa* ATCC® 27853 (МβЛ⁻);
- *P. aeruginosa* VR-143/97 (VIM-1);
- *P. aeruginosa* 565 (VIM-2);
- *P. aeruginosa* 010 (VIM-10);
- *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1);
- *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2);
- *P. putida* VA-758/00 (IMP-12);
- *P. aeruginosa* MV461 (IMP-13).

ДНК-амплификатор (например, DNA Engine PTC-200, Bio-Rad, США) или система ПЦР в реальном времени (например, Rotor-Gene, Corbett Research, Австралия или Chromo4, Bio-Rad, США).

Оборудование для гель-электрофореза ПЦР-продуктов, полу-

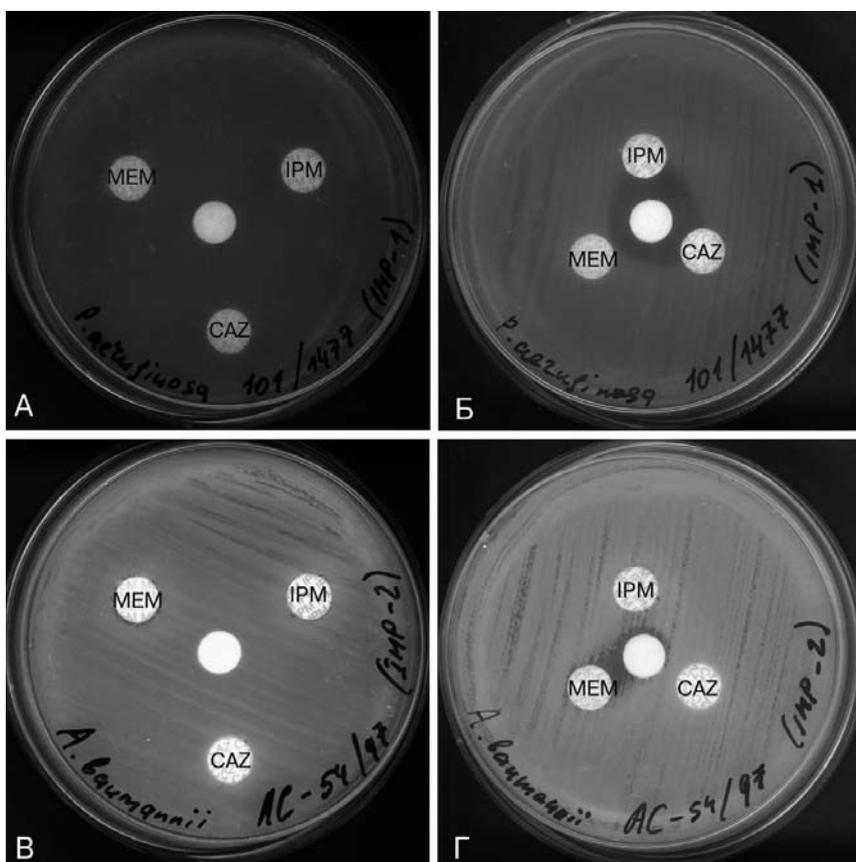


Рис. 2. Влияние величины расстояния между дисками на выявление продукции МβЛ. Расстояние между дисками 15 мм: А – *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1); В – *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2); расстояние между дисками 10 мм: Б – *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1); Г – *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2).

Таблица 1. Приготовление амплификационной смеси

Компоненты	Объем*, мкл	Конечная концентрация**
Смесь праймеров*** (концентрация каждого 25 мкМ)	2,0	0,5 мкМ (каждого)
5X ПЦР-буфер (67 мМ Трис-НСl [рН 8,3]; 17 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 % Твин-20; 0,12 мг/мл БСА; 8 % глицерин)	5,0	1X
Смесь дНТФ (концентрация каждого 2 мМ)	2,5	200 мкМ (каждого)
Раствор MgCl ₂ (25 мМ)	1,5	1,5 мМ
Диметилсульфоксид (ДМСО) или раствор SYBR Green I (1:1000) в ДМСО****	1,0	
ТaqF ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,3	1,5 ед
Стерильная деионизированная или бидистиллированная вода	9,7	
Общий объем	22	

Примечание:

* – объем, добавляемый в расчете на одну реакцию;

** – концентрация после добавления всех компонентов и образца ДНК;

*** – праймеры: VIM-Fa: 5'-GTTTGGTTCGCATATCGC-3'
 VIM-Ra: 5'-TCGTCATGAAAGTGCGT-3'
 IMP1-F: 5'-GCTAAAGATACTGAAAAATTAGT-3'
 IMP1-R: 5'-TCATTTGTTAATTCAGATGCATA-3';

**** – ДМСО добавляется при использовании классической ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации; раствор SYBR Green I (1:1000) в ДМСО добавляется в случае использования ПЦР в режиме реального времени.

ченных с помощью обычного ДНК-амплификатора (при отсутствии системы ПЦР в реальном времени).

Комплекты реагентов для амплификации ДНК и электрофоретического анализа продуктов ПЦР (АмплиСенс-200, ЭФ-200, Интерлабсервис, Россия).

Диметилсульфоксид (РЕАХИМ, Россия).

Флуоресцентный краситель SYBR Green I (Amresco Inc., США).

Выделение ДНК. Выделение бактериальной ДНК проводят с помощью температурного лизиса в ТЕ-буфере. Используют суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенную на агаризованной среде. Три-четыре колонии (половина 1-мкл петли) переносят в центрифужную пробирку, содержащую 500 мкл стерильной бидистиллированной или деионизированной воды, и суспендируют с помощью шейкера. Микробные клетки осаждают центрифугированием в течение 1 мин при 10000 g. Супернатант удаляют, добавляют 100 мкл ТЕ-буфера и ресуспендируют осадок с помощью шейкера. Пробирки инкубируют в твердотельном термостате в течение 20 мин при 99°C. После термостатирования образцы центрифугируют в течение 1 мин при 10000 g. Для ПЦР используют 3 мкл супернатанта.

ПЦР-амплификация фрагментов *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* генов

Конечный объем реакционной смеси составляет 25 мкл с учетом добавления матричной ДНК.

Компоненты реакции вносят в соответствии с концентрациями, указанными в табл 1.

Амплификацию проводят в варианте «горячего старта» согласно протоколу, представленному в табл. 2.

Оценка результатов амплификации в режиме реального времени и анализ кривых плавления ПЦР-продуктов с SYBR Green I. Нарастание уровня флуоресценции SYBR Green I в последовательных циклах ПЦР свидетельствует о наличии у исследуемых штаммов *bla_{VIM}* или *bla_{IMP}* генов (рис. 3, А). Постаmplификационный анализ кривых плавления позволяет идентифицировать соответствующие ПЦР-продукты по температуре плавления: ~80°C для *bla_{IMP}* и ~85°C для *bla_{VIM}* генов (см. рис. 3, Б).

Анализ продуктов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. Разделение фрагментов ДНК осуществляют в 3% агарозном геле, используя 0,5X TBE буфер при напряженности электрического поля ≤6 В/см. Перед внесением в лунки геля каждый из образцов и маркер молекулярной массы в объеме 5 мкл смешивают с 2 мкл буфера для нанесения ДНК (50% 0,5X TBE, 50% глицерина, 0,25% бромфенолового синего). Гель окрашивают в растворе этидия бромида (1 мг/л) в течение 20 мин с последующей визуализацией с помощью УФ-трансиллюминатора.

Размер ПЦР-продуктов определяют путем сравнения их электрофоретической подвижности с подвижностью маркерных фрагментов ДНК. Ожидаемый размер фрагментов *bla_{VIM}* генов – 196 пн, *bla_{IMP}* генов – 154 пн (рис. 4).

Таблица 2. Рекомендуемые условия амплификации*

Этап	Температура, °C	Время	Число циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	
Денатурация	95	15 с	
Отжиг	50	15 с	30
Элонгация	72	15 с	
Детекция флуоресценции SYBR Green I**			
Конечная элонгация	72	2 мин	
Анализ плавления ПЦР-продуктов, детекция флуоресценции SYBR Green I**	Повышение температуры от 72 °C до 94 °C (шаг: 1 °C / 10 с)		

Примечание:

* – данный протокол оптимизирован для термоциклера DNA Engine PTC-200 (Bio-Rad, США), а также следующих систем ПЦР в реальном времени: Rotor-Gene (Corbett Research, Австралия), Chromo4 (Bio-Rad, США). Использование других приборов может потребовать настройки режима амплификации;

** – только при использовании систем ПЦР в реальном времени.

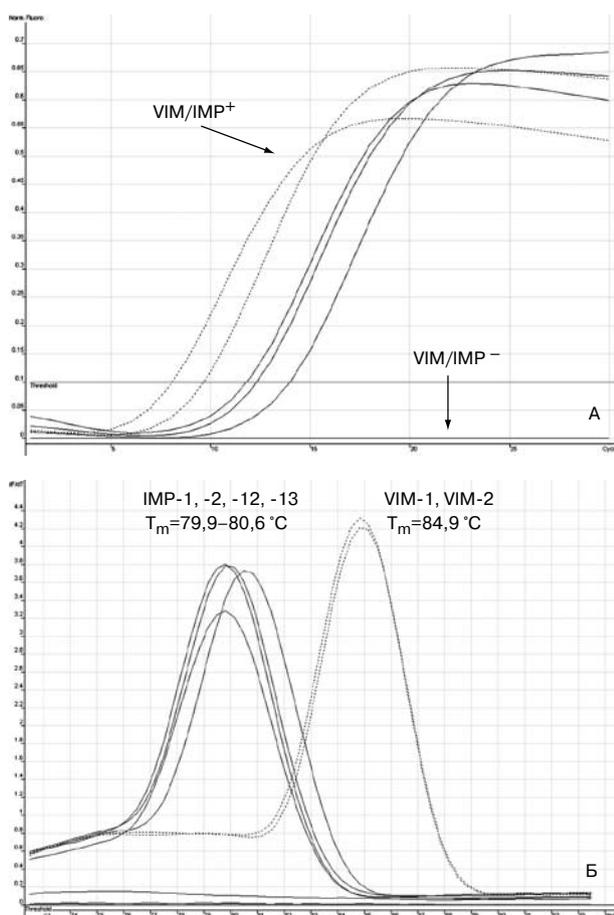


Рис. 3. Кривые амплификации (А) и плавления ПЦР-продуктов (Б), полученные с использованием системы ПЦР в реальном времени Rotor-Gene-2000.

Результаты оценки эффективности выявления М β Л с помощью представленных методов

Оценка чувствительности и специфичности описанных выше методов была проведена с использованием контрольных штаммов-продуцентов металло- β -лактамаз – VIM-1, VIM-2, VIM-10, IMP-1, IMP-2, IMP-12 и IMP-13 из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии, а также 584 штаммов *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *A. kwofii* – возбудителей нозокомиальных инфекций, выде-

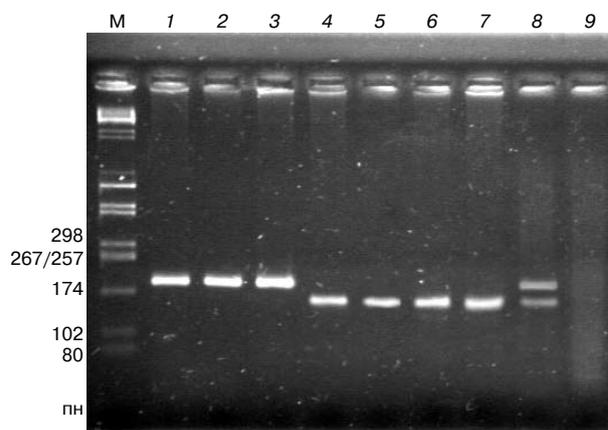


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации *bla*_{VIM} и *bla*_{IMP} генов.

М – маркер молекулярной массы (pUC18-Hae III); 1 – *P. aeruginosa* VR-143/97 (VIM-1); 2 – *P. aeruginosa* 565 (VIM-2); 3 – *P. aeruginosa* 010 (VIM-10); 4 – *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1); 5 – *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2); 6 – *P. aeruginosa* VA-758/00 (IMP-12); 7 – *P. aeruginosa* MV461 (IMP-13); 8 – смесь штаммов *P. aeruginosa* VR-143/97 (VIM-1) и *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1); 9 – *P. aeruginosa* ATCC® 27853 (М β Л⁻).

ленных в отделениях реанимации и интенсивной терапии 32 стационаров Российской Федерации в 2002–2004 гг. Среди исследованных клинических штаммов 367 (62,8%) были резистентны (МПК ≥ 16 мкг/мл), 44 (7,5%) – умеренно резистентны к имипенему и/или меропенему (МПК 8 мкг/мл) и 173 (29,6%) – чувствительны (МПК ≤ 4 мкг/мл) к обоим карбапенемам. Все культуры были протестированы на наличие М β Л с помощью представленных методов, а также спектрофотометрического анализа гидролиза имипенема в бесклеточных экстрактах периплазматических белков с добавлением и без ЭДТА, который, согласно данным литературы [2], является референтным методом обнаружения М β Л. Карбапенемазная активность, подавляемая при добавлении ЭДТА, была выявлена с помощью спектрофотометрического метода у 48 (8,2%) клинических изолятов, а также у всех контрольных штаммов-продуцентов известных М β Л.

В сравнении с референтным тестом чувствительность и специфичность обнаружения М β Л при первичном скрининге методом «двойных дисков с ЭДТА» составили 96,4 и 99,1% соответственно. Ложноотрицательные результаты были получены только для двух М β Л-продуцирующих контрольных штаммов: *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1) и *A. baumannii* AC-54/97 (IMP-2) – при использовании стандартной методики с расположением дисков на расстоянии 15 мм между центрами. Тем не менее, повторное тестирование с изменением расстояния между дисками до 10 мм позволило выявить продукцию М β Л у обоих штаммов (см. рис. 2).

Ложноположительные результаты были получены для 5 клинических штаммов *P. aeruginosa*, проявляющих чувствительность к карбапенемам.

Таким образом, метод «двойных дисков с ЭДТА» может быть рекомендован для широкого использования в клинических микробиологических лабораториях, учитывая его доступность, невысокую стоимость и значительную эффективность.

Предложенный метод мультиплексной ПЦР для выявления внутренних фрагментов генов, детерминирующих синтез наиболее распространенных типов М β Л – VIM и IMP, показал 100% специфичность и чувствительность, что позволяет рассматривать его как перспективный подход для выявления и дифференциации VIM и IMP типов М β Л. Метод показал свою эффективность при изучении механизмов резистентности ГНБ, собранных в ходе проведения многоцентровых исследований резистентности к антибиотикам бактериальных возбудителей нозокомиальных инфекций в России («РЕЗОРТ», 2002–2004 гг. и «Металл», 2006–2007 гг.). В ходе тестирования 1141 штамма *P. aeruginosa* выявлено 126 изолятов, экспрессирующих М β Л VIM типа и 3 штамма, продуцирующих ферменты IMP типа. М β Л-продуцирующие штаммы выделены в 23 стационарах 9 городов Российской Федерации (Воронеж, Краснодар, Липецк, Москва, Нижний Новгород, Новосибирск, Омск, Смоленск и Тюмень). Полученные данные свидетельствуют о широкой географической распространенности М β Л в России.

Литература

- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005; 18:306-25.
- Cornaglia G., Akova M., Amicosante G., et al. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. Int J of Antimicrob Agents 2007; 29:380-8.
- Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
- Castanheira M., Toleman M.A., Jones R.N., Schmidt F.J., Walsh T.R. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4654-61.
- Lee K., Yum J.H., Yong D., et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:4485-91.
- Toleman M.A., Simm A.M., Murphy T.A., et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 2002; 50:673-9.
- Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:71-8.
- Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1612-5.
- Poirel L., Lambert T., Turkoglu S., et al. Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the *bla*_{VIM-2} carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance

- gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:546-52.
10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации. Москва, 2004.
 11. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (№ 19/52-17, утверждены Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора РФ 22 июня 1995 г.). Москва, 1995.