

Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы, в России, Беларуси и Казахстане

М.В. Эйдельштейн¹, Е.Ю. Склеенова¹, О.В. Шевченко¹, Д.В. Тапальский², И.С. Азизов³, Дж.В. Д'соуза¹, А.В. Тимохова¹, М.В. Сухорукова¹, В.К. Козырева¹, Е.В. Сафронова⁴, М.В. Астахова⁴, И.А. Карпов⁵, С.Х. Шамаева⁶, Н.В. Абрамова⁷, Н.А. Гординская⁷, Р.С. Козлов¹, исследовательская группа «МЕТАЛЛ»*

¹ НИИ антимикробной химиотерапии, ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Смоленск, Россия

² Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

³ Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

⁴ Городской центр бактериологических исследований, Липецк, Россия

⁵ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

⁶ Республиканская больница «Центр экстренной медицинской помощи», Якутск, Россия

⁷ Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии, Нижний Новгород, Россия

В настоящей работе представлены данные исследования распространенности и молекулярной эпидемиологии грамотрицательных бактерий, продуцирующих МБЛ, в России (в 1998–2010 гг.), Беларуси и Казахстане (в 2005–2010 гг.). Анализ нозокомиальных штаммов, выделенных в рамках нескольких многоцентровых эпидемиологических исследований в России, выявил стремительное нарастание доли МБЛ-положительных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (от 4,5 до 20,3% в период между 2002–2004 и 2006–2007 гг.), которое в основном было связано с эпидемическим распространением клона *P. aeruginosa* ST235 VIM-2. Циркуляция данного клона отмечена не только на всей территории России, но и в нескольких городах Беларуси и Казахстана. Доля ST235 среди всех

исследованных МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* ($n=711$) составила 96,3%, остальные изоляты относились к неродственным сиквенс-типам: ST234 (3,4%), ST244 (0,1%) и ST270 (0,1%). Большинство изолятов были чувствительны только к полимиксидам. У *P. aeruginosa* гены МБЛ – VIM-2 (99,6%) и нового варианта IMP-1 (Glu59/Lys) – IMP-30 (0,4%), найдены в составе интегронов пяти различных типов. В двух случаях установлен вероятный перенос гена *bla*_{VIM-2} в составе наиболее распространенного Tn5090-ассоциированного интегрона от ST235 к ST234 и ST244. Помимо *P. aeruginosa*, продукция МБЛ (VIM-4) выявлена у единственного штамма *Escherichia coli*.

Ключевые слова: грамотрицательный, *P. aeruginosa*, резистентность, металло-бета-лактамазы.

Контактный адрес:

Михаил Владимирович Эйдельштейн
Эл. почта: Mikhail.Edelstein@antibiotic.ru

* И.А. Александрова (Москва), М.В. Архипенко (Краснодар), Г.Г. Беккер (Новосибирск), В.В. Беспалова (Екатеринбург), А.Е. Гончаров (Санкт-Петербург), А.В. Джапакова (Екатеринбург), Н.А. Зубарева (Пермь), В.Н. Ильина (Новосибирск), Т.И. Карпунина (Пермь), О.И. Кречикова (Смоленск), О.Ю. Куцевалова (Ростов на Дону), И.Р. Лобацевич (Нижевартовск), Ю.Ю. Макарычева (Самара), О.А. Маркина (Екатеринбург), С.И. Монахова (Ярославль), Е.Н. Москвитина (Северск), Г.И. Нехаева (Воронеж), И.П. Новоселова (Пермь), Ш.Х. Палютин (Ярославль), С.М. Розанова (Екатеринбург), Т.Н. Суборова (Санкт-Петербург), Г.Н. Холодок (Хабаровск), Р.М. Хохлявина (Тюмень), С.Е. Шушурина (Самара), Н.З. Яранцева (Екатеринбург).

Prevalence and Molecular Epidemiology of Gram-negative Bacteria Producing Metallo- β -lactamases (MBLs) in Russia, Belarus and Kazakhstan

M.V. Edelstein¹, E.Yu. Skleenova¹, O.V. Shevchenko¹, D.V. Tapalski², I.S. Azizov³, J.W. D'souza¹, A.V. Timokhova¹, M.V. Sukhorukova¹, V.K. Kozyreva¹, E.V. Safronova⁴, M.V. Astakhova⁴, I.A. Karpov⁵, S.Kh. Shamaeva⁶, N.V. Abramova⁷, N.A. Gordinskaya⁷, R.S. Kozlov¹, "METALL" study group*

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

² Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

³ Karaganda State Medical University, Karaganda, Kazakhstan

⁴ City Centre of Bacteriology, Lipetsk, Russia

⁵ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

⁶ Republic Centre of Emergency Medicine, Yakutsk, Russia

⁷ Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod, Russia

The prevalence and molecular epidemiology of MBL-producing Gram-negative bacteria have been studied in Russia (1998–2010), Belarus and Kazakhstan (2005–2010). Analysis of nosocomial strains isolated as part of several multicentre surveillance studies in Russia revealed rapid increase in prevalence of MBL-positive *Pseudomonas aeruginosa* isolates (from 4,5% to 20,3% between 2002–2004 and 2006–2007), which was mainly due to epidemic spread of *P. aeruginosa* clone ST235 VIM-2. Circulation of this clone was noted across Russia as well as in several cities of Belarus and Kazakhstan. ST235 comprised 96,3% of all ($n=711$) MBL-producing *P. aeruginosa*, the remaining isolates belonged to unre-

lated sequence-types: ST234 (3,4%), ST244 (0,1%) and ST270 (0,1%). Most isolates were susceptible only to polymyxins. In *P. aeruginosa*, five different types of integrons harbouring the genes for MBLs: VIM-2 (99,6%) and IMP-30, a new Glu59/Lys variant of IMP-1, (0,4%) were found. A likely horizontal transfer of the most prevalent Tn5090-associated integron carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassette from ST235 to ST234 and ST244 was observed in two cases. In addition to *P. aeruginosa*, production of MBL (VIM-4) was detected in a single isolate of *Escherichia coli*.

Key words: Gram-negative, *P. aeruginosa*, resistance, metallo-beta-lactamase.

Введение

Формирование и распространение резистентности к антибиотикам группы карбапенемов у грамотрицательных бактерий является одной из наиболее актуальных проблем современной антимикробной химиотерапии. Карбапенемы обычно рассматриваются как наиболее эффективные антимикробные препараты при лечении тяжелых нозокомиальных и внебольничных инфекций с полимикробной этиологией. Тем не менее, приобретенная устойчивость к препаратам данной группы в последнее время встречается все чаще, особенно среди возбудителей нозокомиальных инфекций [1].

Резистентность к карбапенемам грамотрицательных бактерий может быть обусловлена различными механизмами: изменением проницаемости наружной клеточной мембраны, активацией систем

эфлюкса или продукцией гидролизующих карбапенемы β -лактамаз (карбапенемаз) [2]. В настоящее время описано множество карбапенемаз, принадлежащих к трем молекулярным классам А, D и В [3]. Ферменты класса В, известные как *металло- β -лактамазы* (МБЛ), существенно отличаются от всех прочих β -лактамаз наличием атомов цинка в активном центре. МБЛ обладают наиболее широким спектром гидролитической активности, который включает все β -лактамы, за исключением монобактамов, и в связи с этим имеют особое клиническое и эпидемиологическое значение [4–6]. Активность МБЛ не подавляется классическими ингибиторами β -лактамаз молекулярного класса А – clavulanовой кислотой, сульбактамом и тазобактамом, так же, как и новыми ингибиторами, активными в отношении сериновых ферментов классов А, С и D – авибактамом (NXL-104), МК-7655 и BLI-489

* I.A. Alexandrova (Moscow), M.V. Arkhipenko (Krasnodar), G.G. Bekker (Novosibirsk), V.V. Bespalova (Ekaterinburg), A.E. Goncharov (St.-Petersburg), A.V. Djapakova (Ekaterinburg), N.A. Zubareva (Perm), V.N. Ilina (Novosibirsk), T.I. Karpunina (Perm), O.I. Kretchikova (Smolensk), O.Yu. Kutsevalova (Rostov-on-Don), I.R. Lobatsevich (Nizhnevartovsk), Yu.Yu. Makarycheva (Samara), O.A. Markina (Ekaterinburg), S.I. Monakhova (Yaroslavl), E.N. Moskvitina (Seversk), G.I. Nekhaeva (Voronezh), I.P. Novoselova (Perm), Sh.Kh. Paliutin (Yaroslavl), S.M. Rozanova (Ekaterinburg), T.N. Suborova (St.-Petersburg), G.N. Kholodok (Khabarovsk), R.M. Khokhliavina (Tyumen), S.E. Shushurina (Samara), N.Z. Yarantseva (Ekaterinburg).

[7, 8]. МБЛ присутствуют как видоспецифические ферменты у некоторых видов *грамотрицательных неферментирующих бактерий* (ГНБ), в частности *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* spp., *Burkholderia cepacia*, и обеспечивают природную резистентность или низкую чувствительность этих видов к карбапенемам [6, 9, 10]. Продукция приобретенных МБЛ встречается у многих видов ГНБ, чаще всего у *Pseudomonas aeruginosa*, а также у представителей семейства *Enterobacteriaceae* [3].

Эпидемиология МБЛ существенно отличается в разных регионах мира. Для ряда стран Южной и Восточной Азии, Дальнего Востока (Индии, Китая, Сингапура, Таиланда, Кореи), Центральной, Южной и Восточной Европы (Германии, Франции, Испании, Португалии, Греции, Италии, Польши, Хорватии) и Южной Америки (Бразилии, Аргентины) характерна эндемичность или поликлональное распространение МБЛ во многих стационарах. Единичные случаи и локальные вспышки внутрибольничных инфекций, вызванных МБЛ-продуцирующими штаммами, были описаны в странах Северной Америки (США и Канаде) и Северной Европы (Швеции, Голландии и Норвегии). Во всем мире, при различии в распространенности МБЛ в разных странах, отмечается тенденция быстрого роста числа инфекций, вызванных продуцентами МБЛ [6, 11].

В настоящее время известно 10 генетических групп (семейств) приобретенных МБЛ: VIM, IMP, NDM, SPM, GIM, DIM, SIM, AIM, KHM и TMB [6, 12]. Группы VIM и IMP являются наиболее многочисленными, МБЛ данных типов были выявлены в большинстве стран, где проводились регулярные эпидемиологические исследования. Широкое распространение VIM и IMP β -лактамаз в значительной степени обусловлено локализацией кодирующих генов в виде кассет в составе интегров 1 класса, ассоциированных с разнообразными мобильными генетическими элементами (инсерционными элементами и транспозонами) [5]. Быстрая диссеминация NDM-1 во всем мире была выявлена только в последние 3 года. Ген *bla*_{NDM-1} найден в составе различных трансмиссивных плазмид у многих представителей *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. и других *грамотрицательных бактерий* [13–16]. SPM-1 является доминирующим типом МБЛ в Южной Америке, где его распространение связано, в основном, с клональной экспансией эпидемического клона *P. aeruginosa* ST277 [17]. Остальные типы приобретенных МБЛ встречаются спорадически или были описаны у единичных изолятов [6].

Сцепление генов МБЛ и других детерминант устойчивости является частой причиной полире-

зистентности штаммов-продуцентов МБЛ. Такие штаммы обычно сохраняют чувствительность только к полимиксинам (некоторые виды энтеробактерий - к полимиксинам, тигециклину и фосфомицину), однако случаи вторичной резистентности к данным препаратам, включая формирование *de novo* устойчивости в ходе терапии, также являются нередкими у продуцентов МБЛ [6, 18, 19]. Новые антимикробные препараты, способные преодолеть резистентность МБЛ-продуцирующих *грамотрицательных бактерий*, находятся пока на ранних стадиях разработки и доклинических испытаний [7]. В связи с этим можно ожидать, что в ближайшие годы МБЛ-продуцирующие штаммы будут представлять одну из наиболее острых проблем антимикробной химиотерапии [5, 6, 8].

Цель данного исследования – изучить распространенность и молекулярную эпидемиологию МБЛ-продуцирующих клинических штаммов *грамотрицательных бактерий*, выделенных в различных регионах России и сопредельных государств.

Материалы и методы

Клинические штаммы микроорганизмов. Ретроспективный анализ продукции МБЛ проведен у 2396 клинических изолятов *грамотрицательных бактерий*, нечувствительных (резистентных или умереннорезистентных), согласно критериям *Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам* (EUCAST, <http://www.eucast.org>), к одному или нескольким карбапенемам: имипенему, меропенему, дорипенему и эртапенему (для *Enterobacteriaceae*). Исследованные изоляты были собраны в рамках трех многоцентровых исследований по эпидемиологии антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций в стационарах РФ в период с 1998 по 2007 гг. (табл. 1). Изоляты одного вида бактерий, повторно выделенные от одного пациента, в исследование не включались. У 207 изолятов *P. aeruginosa* с установленной продукцией МБЛ из числа вышеуказанных были проведены исследования по определению генетической родственности (клональности) типов продуцируемых МБЛ и структуры мобильных генетических элементов, несущих гены МБЛ.

Дополнительно, в ходе проспективного многоцентрового исследования «МЕТАЛЛ» по оценке распространенности МБЛ в России, Беларуси и Казахстане в 2005–2010 гг., в лаборатории НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ, г. Смоленск) проведен анализ на наличие МБЛ у 1729 изолятов, предварительно отобранных в локальных клинических микробиологических лабо-

Таблица 1. Источники получения клинических штаммов микроорганизмов

Виды микроорганизмов	Количество изолятов	Количество центров и городов	Исследование (период)	Характеристика изолятов
<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i>	597/136 142/6 988/39	28 центров 14 городов России	«NPRS II» (1998–1999 гг.)	Все последовательные, неповторяющиеся нозокомиальные изоляты из ОРИТ
<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i>	1053/628 466/60 1374/139	33 центра 22 городов России	«РЕЗОРТ» (2002–2004 гг.)	Все последовательные, неповторяющиеся нозокомиальные изоляты из ОРИТ
<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i>	787/584 333/178 1035/122	36 центров 26 городов России	«РЕВАНШ» (2006–2007 гг.)	Все последовательные, неповторяющиеся нозокомиальные изоляты
<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Enterobacteriaceae</i>	–/1530 –/168 –/31	53 центра 27 городов России, Беларуси и Казахстана	«МЕТАЛЛ» (2005–2010 гг.)	Только карбапенемочувствительные изоляты

Примечание. В числителе – общее количество изолятов, в знаменателе – количество карбапенемочувствительных.

расториях, исходя из фенотипа устойчивости к карбапенемам. Из этих изолятов 503 с подтвержденной продукцией МБЛ охарактеризованы с помощью молекулярно-генетических методов (см. табл. 1).

Идентификация и хранение культур микроорганизмов. Первичная видовая идентификация микроорганизмов проводилась в локальных лабораториях, осуществлявших выделение штаммов. Реидентификация всех культур проведена в лаборатории НИИАХ с помощью ручных методов (СИБ, НПО Микроген; API20 и API20NE, bioMerieux) или автоматических анализаторов (Vitek2 Compact, bioMerieux; BD Phoenix, Becton Dickinson). Штаммы хранились при температуре –70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 30% глицерина непосредственно перед проведением анализа.

Определение чувствительности. Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили с помощью метода разведений в агаре Мюллера–Хинтон II (Becton Dickinson). На основании выявленных значений МПК штаммы относили к категориям чувствительности (Ч, УР и Р) в соответствии с критериями EUCAST v.2.0 [20]. Оценку чувствительности к цефоперазону, фосфомицину и полимиксину В проводили на основании критериев МУК 4.2.1890-04 [21], EUCAST v.1.3 [22] и CLSI M100-S21 [23] соответственно. Для контроля качества определения чувствительности использовали штаммы: *E. coli* ATCC®25922, *E. coli* ATCC®35218 и *P. aeruginosa* ATCC®27853.

Фенотипическая детекция продукции МБЛ. Для первичного выявления продукции МБЛ использовали метод двойных дисков с ЭДТА [24]. При тестировании изолятов ГНБ диски с цефтазидимом (30 мкг), имипенемом (10 мкг) и меропенемом (10 мкг) наносили на поверхность агара

на расстоянии 15 мм (между центрами дисков) от диска с ЭДТА (840 мкг). Для определения МБЛ у энтеробактерий дополнительно использовали диск с эртапенемом (10 мкг); все диски, содержащие β-лактамы, помещали на расстоянии 20 мм от диска с ЭДТА.

В случае расхождения результатов детекции МБЛ с помощью метода двойных дисков и молекулярно-генетических методов в качестве референтного теста использовали спектрофотометрический анализ гидролиза имипенема грубыми экстрактами β-лактамаз [25]. Экстракцию ферментов осуществляли с помощью ультразвуковой дезинтеграции бактериальных клеток в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,0) с последующим удалением клеточного дебриса путем центрифугирования (21000 g × 30 мин, 4 °C). Гидролиз имипенема мониторировали с помощью спектрофотометра Ultraspec 3000 (GE Healthcare) при 299 нм ($\Delta\epsilon = -9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и начальной концентрации субстрата 150 мкМ. Перед проведением реакции тестируемые экстракты инкубировали в течение 20 мин при 25 °C с добавлением и без добавления ЭДТА в конечной концентрации 2 мМ. В качестве контролей использовали штаммы-продуценты известных МБЛ: *P. aeruginosa* VR-143/97 (VIM-1) и *P. aeruginosa* 101/1477 (IMP-1) (положительные контроли) и МБЛ-непродуцирующий штамм *P. aeruginosa* ATCC®27853 (отрицательный контроль).

Выявление генов VIM и IMP β-лактамаз с помощью ПЦР в реальном времени. Детекцию генов наиболее распространенных МБЛ VIM- и IMP-типов проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени, описанного ранее [24].

Определение структуры интегров, несущих гены МБЛ. Для определения структуры МБЛ-кодирующих интегров использовали метод

Таблица 2. Праймеры, использованные для амплификации и секвенирования переменных участков МБЛ-кодирующих интегров

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Ген-мишень	Назначение
3-CS QAC-EXT	AATGCGGATGTTGCGATTAC	<i>qacEΔ1</i>	ПЦР, секвенирование
TniC-rev	GTGGGCGATCTCTGCGAAG	<i>tniC</i> (Tn5090)	ПЦР, секвенирование
INT/5CS:	CTTCTAGAAAACCGAGGATGC	<i>intI1</i>	ПЦР, секвенирование
VIM-OUT-F	CTACCCGGAAGCACAGTTCGTC	<i>bla_{VIM}</i>	ПЦР, секвенирование
VIM-OUT-R	ACCGGAATTTTCGCTGACTGTCCG	<i>bla_{VIM}</i>	ПЦР, секвенирование
IMP-OUT-F	AGAGCAGGCGGTTAAAGGGTT	<i>bla_{IMP}</i>	ПЦР, секвенирование
IMP-OUT-R	TGAACATAAACGCCTTCATCAAGC	<i>bla_{IMP}</i>	ПЦР, секвенирование
5-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	<i>intI1</i> (-35 box)	Секвенирование
ATT/SEQ	AGAACCTTGACCGAACGCA	<i>intI1</i>	Секвенирование
aadA1-fw	CGATGAGCGAAATGTAGTGC	<i>aadA1</i>	Секвенирование
aadA1-rev	GAAAGGCGAGATCACCAAGG	<i>aadA1</i>	Секвенирование
aadA1-rev(2)	CCTTGGTGATCTCGCCTTTC	<i>aadA1</i>	Секвенирование
aadB-fw	AATAGTTGAAATGCTCGG	<i>aadB</i>	Секвенирование
CmlA-fw	TACGAGAGCGCCGCCAAATC	<i>cmlA</i> (-24)	Секвенирование
CmlA-fw(2)	TGAACTTCTGGTTGTACACG	<i>cmlA</i>	Секвенирование
dhfr-fw	AATGGAGTTATCGGGAATGG	<i>dhfr1</i>	Секвенирование
dhfr-rev	GTCTTGCGTCCAACCAACAGCC	<i>dhfr1</i>	Секвенирование
ISPa21-fw	ATTCTGTAGTTCGCGCAGC	<i>ISPa21</i>	Секвенирование
ISPa21-rev	CAGACTTCCGGACGCTCGATCA	<i>tnpA</i> (ISPa21)	Секвенирование
ISPa21-rev(2)	TGATCGAGCGTCCGGAAGTCTG	<i>tnpA</i> (ISPa21)	Секвенирование
OXA-2 (fw)	CAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATA	<i>bla_{OXA-2}</i>	Секвенирование
OXA-2-rev (2)	TATGAGGTATCTTGAATGTCCG	<i>bla_{OXA-2}</i>	Секвенирование
STR (OXA-2_rev)	TCGCGCAGCGTCCGAGTTGACTGCC	<i>bla_{OXA-2}</i>	Секвенирование
Smr-rev	ATGCCCGTCCAAACAGCGTAGG	<i>smr</i>	Секвенирование
OXA-35-rev	TCATGGCTCTTGGCTTTCGGTCC	<i>bla_{OXA-35}</i>	Секвенирование
OXA-rev	AGCTTCTTTTGATGCCGTCC	<i>bla_{OXA-21}</i>	Секвенирование
VIM-F	GGTGTTTGGTCGCATATCGC	<i>bla_{VIM}</i>	Секвенирование
VIM-RA	TCGTCATGAAAGTGCGT	<i>bla_{VIM}</i>	Секвенирование
IMP1-F	GCTAAAGATACTGAAAAATTAGT	<i>bla_{IMP}</i>	Секвенирование
IMP-R	TCATTTGTTAATTCAGATGCATA	<i>bla_{IMP}</i>	Секвенирование

ПЦР-рестрикционного картирования и секвенирования амплификационных фрагментов. Наборы генетических кассет интегров 1 класса, несущих гены МБЛ, определяли путем отдельной амплификации переменных последовательностей, фланкирующих *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* гены с обоих концов. Переменные участки, находящиеся на 5' конце между геном интегразы (*intI1*) и генами МБЛ, амплифицировали с помощью комбинаций прямого праймера к консервативному участку *intI1* и обратных внутренних праймеров к *bla_{IMP}* и *bla_{VIM}* генам. Для амплификации переменных участков, находящихся между генами МБЛ и 3'-концевыми

последовательностями интегров, использовали прямые внутренние праймеры к *bla_{IMP}* и *bla_{VIM}* генам в комбинации с обратными праймерами к типичным 3'-концевым последовательностям интегров: *qacEΔ1* или *tniC* (для Tn5090/Tn402-подобных интегров). Полученные ПЦР-продукты подвергали рестрикции с использованием частощепающей эндонуклеазы *TaqI*; рестрикционные фрагменты разделяли электрофоретически в 3% агарозном геле и проводили сравнительный анализ рестрикционных профилей. Нуклеотидные последовательности МБЛ-кодирующих интегров, отличающихся по данным ПЦР-рестрикционного анализа, определя-

ли путем прямого секвенирования ПЦР-продуктов с использованием амплификационных и дополнительных внутренних праймеров, представленных в табл. 2. Сборку, выравнивание и сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с известными последовательностями в GenBank проводили с помощью программного обеспечения CLC Main Workbench v.5.7.1 (CLC bio).

Аннотирование генных каскадов осуществляли с использованием on-line базы данных Attaca (<http://www2.chi.unsw.edu.au:8080/rac/>) [26, 27].

MLVA-типирование штаммов *P. aeruginosa*.

В качестве основного метода типирования МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa* использован анализ 6 тандемных повторов: ms061, ms127, ms077, ms172, ms142 и ms010, описанных Onteniente et al. [28]. Амплификацию указанных VNTR локусов проводили с помощью 2 мультиплексных ПЦР [29]. Прямые праймеры для амплификации каждого из 6 перечисленных локусов были мечены на 5' конце одним из трех флуорофоров: FAM, R6G, ROX. Синтез праймеров осуществлен ЗАО «Синтол» (г. Москва). Нуклеотидные последовательности и концентрации праймеров указаны в табл. 3. В состав ПЦР-смесей общим объемом 10 мкл входили также дНТФ (200 мкМ каждого), 1,5 мМ MgCl₂, 2,5 ед. Taq-F ДНК-полимеразы (Интерлабсервис), Taq-F реакционный буфер, 1-кратный: 67 мМ Трис-НСl (рН=8,3), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Твин-20, 0,12 мг/мл БСА, 8% глицерин и 1 мкл бактериальной ДНК, выделенной с помощью наборов InstaGene Matrix (Bio-Rad) в соответствии со стандартной методикой, рекомендованной производителем.

Смесь ПЦР продуктов, полученных в обеих реакциях, и внутреннего стандарта молекулярной массы, содержащего амплификационные фрагмен-

ты вектора pUC18, меченные TAMRA, анализировали с помощью автоматического флуоресцентного капиллярного электрофореза (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) и программного обеспечения Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems). Для приготовления флуоресцентного внутреннего стандарта молекулярной массы использовали метод DeWoody et al. [30].

Кластерный анализ MLVA профилей проводили с помощью программного пакета BioNumerics v.6 (Applied Maths), используя категориальные значения длин VNTR локусов и алгоритм построения дендрограмм минимальных дистанций (Minimum Spanning Tree).

MLST-типирование штаммов *P. aeruginosa*.

Выборочные штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в различных стационарах и отличающиеся по данным MLVA, были подвергнуты мультилокусному секвенированию-типированию в соответствии со стандартным протоколом, описанным ранее (<http://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>) [31]. Определение нуклеотидных последовательностей внутренних участков генов *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* и *trpE* проводили с помощью наборов для автоматического флуоресцентного секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Для идентификации аллельных вариантов перечисленных генов использовали on-line базу данных MLST *P. aeruginosa* [<http://pubmlst.org/paeruginosa/>]. Кластерный анализ MLST профилей проводили с помощью алгоритма BURST [<http://pubmlst.org/analysis/burst/burst.shtml>].

Таблица 3. Праймеры, использованные для амплификации 6 VNTR локусов *P. aeruginosa*

Праймер (5' флуорофор)	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'	Мультиплекс ПЦР	Концентрация в ПЦР, мкМ
ms010-F (ROX)	GCAGGAACGCTTGCAGCAGGT	1	0,25
ms010-R	CTTCGCCGACCCAGGGATCA	1	0,25
ms061-F (FAM)	CTTGCCGTGCTACCGATCC	1	0,05
ms061-R	CCCCCATGCCAGTTGC	1	0,05
ms077-F (FAM)	GCGTCATGGTCTGCATGTC	1	0,05
ms077-R	TATACCCTCTTCGCCAGTC	1	0,05
ms127-F (FAM)	CTCGGAGTCTCTGCCAACTC	1	0,05
ms127-R	GGCAGGACAGGATCTCGAC	1	0,05
ms142-F (R6G)	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG	2	0,05
ms142-R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG	2	0,05
ms172-F (FAM)	GGATTCTCTCGCACGAGGT	2	0,05
ms172-R	TACGTGACCTGACGTTGGTG	2	0,05

Результаты исследований

Распространенность штаммов, продуцирующих МБЛ. В ходе ретроспективного анализа нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. и *Enterobacteriaceae*, выделенных в ОРИТ многопрофильных стационаров РФ в 1998–1999 гг. (см. табл. 1), не было выявлено культур, продуцирующих МБЛ.

В 2002–2004 гг. в аналогичном по дизайну и географическому охвату исследовании продукция МБЛ была обнаружена у 47 неповторяющихся (по одному от каждого пациента) изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в 6 стационарах 3 городов РФ: Омска, Москвы и Краснодара. Общая доля МБЛ-продуцентов среди нозокомиальных изолятов *P. aeruginosa* составила 4,5%. Большинство МБЛ-продуцирующих изолятов ($n=36$) было выделено в одном из стационаров Омска в период с октября 2002 г. по июнь 2004 г. Распространенность МБЛ среди всех изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в ОРИТ данного стационара в указанный период времени, составила 81,8%. В двух других городах были выявлены спорадические случаи инфекций, вызванных МБЛ-продуцирующими штаммами: 10 изолятов были выделены в 4 различных стационарах Москвы и единственный штамм – в Краснодаре.

В 2006–2007 гг. частота продукции МБЛ у изолятов, выделенных в ОРИТ различных стационаров РФ, возросла более чем в 4 раза и достигла 20,0%. Общая распространенность МБЛ среди нозокомиальных изолятов *P. aeruginosa*, полученных из отделений различного профиля (включая хирургические и терапевтические отделения), составила 20,3%. Анализ распространенности МБЛ в зависимости от профиля отделений показал, что доля МБЛ была максимальной (47,5%) среди изолятов *P. aeruginosa* из ожоговых отделений и отделений хирургической инфекции (табл. 4). В общей сложности 160 культур, экспрессирующих МБЛ,

было выявлено в 18 стационарах 12 городов РФ. Наиболее высокая частота встречаемости МБЛ-продуцирующих изолятов была отмечена в отдельных стационарах Нижнего Новгорода (56,3%) Челябинска (44,8 и 73,1%), Новосибирска (65,8 и 100,0%) и Якутска (85,3%).

В 2005–2010 гг. проведено многоцентровое проспективное исследование с целью выявления и изучения МБЛ-продуцирующих штаммов в России, Беларуси и Казахстане. В рамках данного исследования наличие МБЛ подтверждено с помощью фенотипических и молекулярно-генетических методов у 503 клинических изолятов *P. aeruginosa* и одного штамма *E. coli* (55/1389) из более 1700 изолятов, полученных лабораторией НИИАХ из локальных клинических микробиологических лабораторий, осуществлявших предварительный отбор штаммов на основании фенотипа устойчивости к карбапенемам или положительных результатов фенотипического теста на наличие МБЛ. МБЛ-продуцирующие штаммы получены из 47 стационаров 21 города России, 8 стационаров 3 городов Беларуси и 3 стационаров 3 городов Казахстана.

Таким образом, в данной работе представлены суммарные данные анализа 711 МБЛ-продуцирующих изолятов, выделенных в период с 2002 по 2010 гг. (табл. 5).

Представленные на рис. 1 данные распределения исследованных изолятов по типам и локализации инфекций указывают на преобладание культур, выделенных при инфекциях кожи и мягких тканей (47,0%), респираторного тракта (24,6%), органов брюшной полости (13,2%) и мочевых путей (8,2%).

Антибиотикорезистентность МБЛ-продуцирующих штаммов. Изученные МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* проявляли характерный фенотип устойчивости ко всем пенициллинам, цефалоспорином и карбапенемам (табл. 6). Единичные изоляты проявляли *in vitro* чувствительность к пиперациллину, пиперациллину/тазо-

Таблица 4. Распространенность МБЛ у нозокомиальных изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в отделениях различного профиля стационаров России в 2006–2007 гг.

Профиль отделений	Общее число изолятов <i>P. aeruginosa</i>	Число (%) МБЛ(+) изолятов
Ожоговые и хирургические инфекции	80	38 (47,5%)
ОРИТ	464	93 (20,0%)
Хирургический	205	26 (12,7%)
Терапевтический	26	3 (11,5%)
Другие	12	0
Все отделения	787	160 (20,3%)

Таблица 5. Распределение МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* по городам и периодам исследования

Страна, город	Общее количество изолятов <i>P. aeruginosa</i> (количество МБЛ-продуцирующих)		
	2002–2004 гг.	2006–2007 гг.	2005–2010 гг.
Россия:			
Владивосток	17 (0)	–	–
Волгоград	2 (0)	–	–
Воронеж	52 (0)	22 (6)	(6)
Екатеринбург	71 (0)	91 (0)	(30)
Иркутск	20 (0)	11 (0)	–
Казань	33 (0)	87 (4)	–
Калуга	–	24 (0)	(1)
Кемерово	–	20 (0)	–
Краснодар	97 (1)	5 (0)	(1)
Красноярск	69 (0)	6 (0)	–
Липецк	–	24 (2)	(247)
Москва	172 (10)	64 (6)	(1)
Нижевартовск	–	–	(1)
Нижний Новгород	–	16 (9)	(46)
Новокузнецк	–	3 (0)	–
Новосибирск	41 (0)	62 (49)	–
Ноябрьск	–	36 (0)	–
Омск	44 (36)	–	(7)
Орел	–	36 (0)	–
Пермь	30 (0)	11 (2)	(9)
Ростов-на-Дону	–	4 (0)	(1)
Самара	–	–	(7)
Санкт-Петербург	36 (0)	24 (0)	(3)
Северск	–	8 (0)	–
Смоленск	37 (0)	20 (6)	(84)
Ставрополь	68 (0)	–	–
Тольятти	26 (0)	18 (1)	–
Томск	53 (0)	20 (0)	–
Тюмень	40 (0)	62 (14)	(17)
Уфа	63 (0)	24 (0)	–
Хабаровск	–	–	(1)
Челябинск	40 (0)	55 (32)	–
Якутск	28 (0)	34 (29)	–
Ярославль	14 (0)	–	(9)
Беларусь:			
Гомель	–	–	(2)
Минск	–	–	(15)
Могилев	–	–	(3)
Казахстан:			
Астана	–	–	(3)
Жезказган	–	–	(1)
Караганда	–	–	(8)
Всего:	1053 (47)	787 (160)	(503)

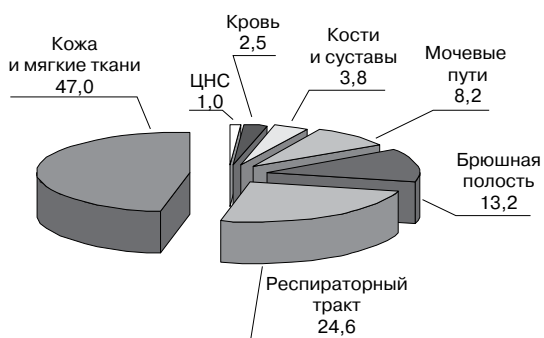


Рис. 1. Распределение МБЛ-продуцирующих изолятов по локализации инфекций, %

бактерии (0,6%), цефтазидиму (0,4%) и цефепиму (1,2%) на уровне пограничных значений МПК, тогда как подавляющее большинство были высокорезистентны. Большинство изолятов *P. aeruginosa* были также умеренно резистентны (78,6%)

или резистентны (21,2%) к азтреонаму, который не расщепляется МБЛ, что говорит о наличии у них дополнительных факторов устойчивости к монобактамам. Снижение МПК азтреонама в присутствии тазобактама в 4 и более раз, свидетельствующее о вероятной ко-продукции БЛРС молекулярного класса А, было отмечено у 4 изолятов. У остальных изолятов отсутствие синергизма между азтреонамом и тазобактамом указывало на возможность гиперпродукции цефалоспориноза класса С (AmpC) или активации эффлюкса как наиболее вероятных механизмов устойчивости к азтреонаму.

Ассоциированная устойчивость к антибиотикам других классов – фторхинолонам, аминогликозидам и фосфомицину была выявлена почти у всех продуцентов МБЛ. Наибольшей активностью в отношении исследованных изолятов обладали полимиксины В и Е (колистин): соответственно 92,6 и 94,1% изолятов проявляли чувствительность к данным препаратам. Следует, однако, отметить,

Таблица 6. Чувствительность МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* к различным антибиотикам

Антибиотик	МПК, мг/л			Количество изолятов, %			Критерии оценки чувствительности**
	диапазон	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Ч	УР	Р	
Пиперациллин*	16–≥256	128	≥256	0,6	0,0	99,4	EUCAST v2.0 (16-32)
Пиперациллин/ тазобактам (4 мг/л)*	16–≥256	128	≥256	0,6	0,0	99,4	EUCAST v2.0 (16-32)
Цефоперазон*	64–≥256	≥256	≥256	0,0	0,0	100,0	МУК 4.2.1890 (16-64)
Цефоперазон/ сульбактам (1:1)*	32–≥256	≥256	≥256	–	–	–	–
Цефтазидим*	8–≥256	64	128	0,4	0,0	99,6	EUCAST v2.0 (8-16)
Цефепим*	4–≥256	32	64	1,2	0,0	98,8	EUCAST v2.0 (8-16)
Имипенем*	16–≥256	64	128	0,0	0,0	100,0	EUCAST v2.0 (4-16)
Меропенем*	8–128	32	128	0,0	0,0	100,0	EUCAST v2.0 (2-16)
Дорипенем*	4–≥256	32	64	0,0	0,2	99,8	EUCAST v2.0 (1-8)
Азтреонам	1–≥256	8	32	0,2	78,6	21,2	EUCAST v2.0 (1-32)
Азтреонам/ тазобактам (4 мг/л)	1–≥256	8	32	–	–	–	–
Ципрофлоксацин	0,125–≥128	16	32	0,2	0,0	99,8	EUCAST v2.0 (0.5-2)
Левифлоксацин	2–≥128	16	32	0,0	0,2	99,8	EUCAST v2.0 (1-4)
Гентамицин	8–≥256	≥256	≥256	0,0	0,0	100,0	EUCAST v2.0 (4-8)
Нетилмицин	8–≥256	≥256	≥256	0,0	0,0	100,0	EUCAST v2.0 (4-8)
Амикацин	4–≥512	256	≥512	1,4	1,8	96,8	EUCAST v2.0 (8-32)
Фосфомицин	32–≥512	128	128	1,3	0,0	98,7	EUCAST v1.3 (32-64)
Полимиксин Е	0,25–16	2	4	94,1	0,0	5,9	EUCAST v2.0 (4-8)
Полимиксин В	0,25–8	2	2	92,6	6,6	0,8	CLSI M100-S21 (2-8)

Примечание. * – штаммы с подтвержденной продукцией МБЛ рассматриваются как нечувствительные к отмеченным антибиотикам. Распределение изолятов по категориям чувствительности проведено в соответствии с формальными критериями интерпретации значений МПК.

** – в скобках указаны пограничные значения МПК (Ч – ≤, Р – ≥).

Таблица 7. Чувствительность *E. coli* 55/1389 к различным антибиотикам

Антибиотик	МПК, мг/л	Категория чувствительности	
		МУК 4.2.1890-04	EUCAST v2.0
Ампициллин	≥256	Р	Р
Амоксициллин / клавуланат (2:1)	32/16	Р	Р
Пиперациллин	≥256	Р	Р
Пиперациллин / тазобактам (4 мг/л)	≥256/4	Р	Р
Цефоперазон	≥256	Р	–
Цефоперазон / сульбактам (1:1)	64/64	–	–
Цефтазидим	256	Р	Р
Цефтазидим / клавуланат (4 мг/л)	32/4	–	–
Цефотаксим	≥256	Р	Р
Цефотаксим / клавуланат (4 мг/л)	128/4	–	–
Цефепим	128	Р	Р
Цефепим / клавуланат (4 мг/л)	4/4	–	–
Азтреонам	≥256	Р	Р
Цефокситин	≥256	Р	–
Имипенем	4	Ч	УР
Меропенем	0.5	Ч	Ч
Эртапенем	2	Ч	Р
Гентамицин	≥256	Р	Р
Амикацин	64	Р	Р
Нетилмицин	≥256	Р	Р
Ципрофлоксацин	≥128	Р	Р
Триметоприм / сульфаметоксазол (1:19)	128/2432	Р	Р
Фосфомицин	1	Ч	Ч

что МБЛ-продуцирующие изоляты *P. aeruginosa*, обладающие сочетанной устойчивостью ко всем не-β-лактамам антибиотикам, включая полимиксины, были выявлены в стационарах 10 городов. Все панрезистентные изоляты были выделены в период с 2006 по 2010 гг.

Единственный МБЛ-продуцирующий штамм *E. coli* 55/1389, выявленный в ходе данного исследования, был высокорезистентен к большинству β-лактамов – пенициллинам, цефалоспорином, цефокситину, азтреонаму, и проявлял сниженную чувствительность к карбапенемам на уровне пограничных значений МПК (табл. 7). Снижение МПК оксиминоцефалоспоринов в присутствии клавулановой кислоты свидетельствовало о наличии у данного штамма БЛРС, которая по данным ПЦР и секвенирования была идентифицирована как СТХ-М-15 (данные не представлены). Штамм также проявлял устойчивость к большинству не-β-лактамов антибиотиков, за исключением фосфомицина.

Типы МБЛ и структура МБЛ-кодирующих интегров. С помощью ПЦР наличие МБЛ

VIM-типа установлено у 707 (99,6%) изолятов *P. aeruginosa*; β-лактамазы IMP-типа обнаружены только у 3 (0,4%) изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в одном стационаре Москвы в январе 2004 г.

По данным ПЦР-ПДРФ анализа, МБЛ-кодирующие интегроны всех исследованных штаммов *P. aeruginosa* были разделены на 5 типов. Структура и кассетный состав интегров каждого типа установлены путем секвенирования и представлены в GenBank под номерами: DQ522233, DQ522234, DQ522235, DQ522236 и DQ522237. Данные о структуре и встречаемости интегров, несущих гены МБЛ, представлены в табл. 8. Генные кассеты *bla*_{VIM-2}, кодирующие β-лактамазу VIM-2, были обнаружены в составе интегров 4 типов у подавляющего большинства МБЛ-продуцирующих изолятов (99,6%). Несмотря на существенные различия в структуре этих интегров, нуклеотидные последовательности *bla*_{VIM-2} кассет длиной 909 пн, включая кодирующие участки и характерные «59-base» элементы, были полностью идентичны. Генные кассеты *bla*_{IMP} длиной 880 пн, кодирующие

Таблица 8. Структура МБЛ-кодирующих интегров у исследованных штаммов *P. aeruginosa*

GenBank Асс. №	n (%) изолятов	Число городов	Кассетный промотор	Длина, пн*	Структура интегрона** (5'-.....-3')
DQ522233	679 (95,6)	27	PcH2/P2	2713	
DQ522236	24 (3,4)	4	PcH1/P2	4317	
DQ522235	3 (0,4)	2	PcH1/P2	2009	
DQ522234	1 (0,1)	1	PcW/P2	2383	
DQ522237	3 (0,4)	1	PcW/P2	4604	

Примечание. * – длина варибельного участка (ВУ) интегрона между геном интегразы (*intI1*) и характерными 3'-концевыми последовательностями (*qacEA1* или *tniC* Tn5090);

** – характерные концевые последовательности интегровов I класса показаны серым цветом, гены МБЛ – черным.

β -лактамазу IMP-типа у 3 изолятов *P. aeruginosa*, входили в состав одинаковых по строению интегровов и отличались от описанных ранее кассет *bla*_{IMP-1} (например, в интегоне In123, GenBank Асс. № AV462903) наличием единственной нуклеотидной замены G121/A в кодирующей последовательности *bla*_{IMP} (нумерация нуклеотидов от начала кодирующей последовательности), которая соответствует аминокислотной замене Glu59/Lys в IMP-1 (нумерация аминокислотных остатков согласно стандартной схеме для β -лактамаз класса В [32]). Новому варианту IMP-1 присвоено международное номенклатурное название IMP-30 (<http://www.lahey.org/studies/>).

Интегрон, выявленный у 679 (95,6%) изолятов, (GenBank Асс. № DQ522233), включал 4 кассеты: *aacA7*, *bla*_{VIM-2}, *dfrB5* и *aacC-A5*, кодирующие соответственно аминогликозид-ацетилтрансферазу AAC(6')-Ib, МБЛ VIM-2, дигидрофолатредуктазу DHFRIIe и аминогликозид-ацетилтрансферазу AAC(3)-Ie. В кодирующей последовательности гена интегразы (*intI1*) был выявлен гибридный кассетный промотор PcH2 и в области сайта интеграции (*attI*) – второй неактивный промотор P2. На 3'-конце варибельной области интегрона присутствовал ген резолвазы (*tniC*) Tn5090/Tn402-подобного транспозона. Структура данного интегрона была практически идентична таковой ранее описанных интегровов *P. aeruginosa*, выявленных в США в 2003 г. (GenBank Асс. № AY943084) [33], Тайване – в том же году [34], Норвегии – в 2006 г. (GenBank Асс. № FM165436) [35] и Индии в 2010 г. (GenBank Асс. – HQ005291). Нуклеотидная последовательность интегрона, выявленного в США,

отличалась только наличием 3 точечных мутаций в кодирующей области *intI1*, одна из которых определяла наличие слабого кассетного промотора PcW вместо PcH2.

Второй по частоте встречаемости интегрон (GenBank Асс. № DQ522236), обнаруженный у 24 (3,4%) изолятов, включал кассету *bla*_{VIM-2} в первой позиции, кассету *gcu21* длиной 319 пн с неизвестной функцией, проявляющую частичную гомологию с участком *orfE* (GeneBank Асс. № AY139595), кассету *aadB*, кодирующую аминогликозид-2'-О-аденилтрансферазу, и кассету *bla*_{OXA-2}, кодирующую оксациллиназу OXA-2. В *attC* сайте кассеты *aadB* была обнаружена инсерция *ISKpn4b* (IS1111-*attC*-подобного инсерционного элемента). В 5'-концевой последовательности интегрона присутствовала комбинация гибридного кассетного промотора PcH1 и неактивного промотора P2, а на 3'-конце варибельной последовательности – характерная последовательность гибридной кассеты *qacEA1sul*.

Интегрон, обнаруженный у 3 изолятов *P. aeruginosa* (GenBank Асс. № DQ522235), содержал идентичную комбинацию промоторов перед кассетой *bla*_{VIM-2} в первой позиции, кассету *aadA1*, кодирующую аминогликозид-3'-аденилтрансферазу во второй позиции, и 3'-концевую последовательность *qacEA1sul*.

У одного изолята был обнаружен также VIM-2-кодирующий интегрон (GenBank Асс. № DQ522234), содержащий слабый промотор PcW и неактивный промотор P2 перед блоком кассет: *aadB*, *bla*_{VIM-2}, *aacA4*, кодирующей аминогликозид-6'-ацетилтрансферазу, и *qacEA1sul*.

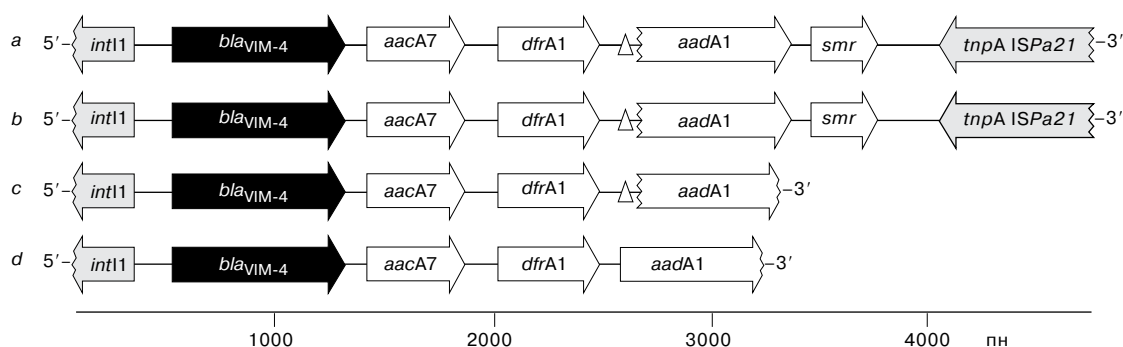


Рис. 2. Структура интегров, несущих кассету *bla_{VIM-4}* у *E. coli* 55/1389 и штаммов энтеробактерий, выделенных в различных странах. *a* – *E. coli* 55/1389; *b* – In416 *Klebsiella pneumoniae* (GenBank Acc. № AJ704863, Италия); *c* – *K. pneumoniae* (GenBank Acc. № AM181293, Тунис); *d* – *Enterobacter cloacae* (GenBank Acc. № EF467306, Греция). Делеция 82 пн в *aadA1* обозначена символом Δ.

В составе интегона (GenBank Acc. № DQ522237), несущего ген новой МБЛ – IMP-30, у 3 изолятов была также выявлена комбинация неактивного промотора P2 и слабого промотора PcW. Данный интегрон включал блок из 6 кассет: *aadB*, *bla_{IMP-30}*, *gcu21* (генной кассеты с неизвестной функцией длиной 464 пн), *cmlA7*, кодирующей транспортный белок, опосредующий резистентность к хлорамфениколу, *bla_{OXA-21}*, кодирующей оксациллиназу OXA-21, и *qacEΔ1sul*.

В отличие от штаммов *P. aeruginosa*, у большинства из которых была выявлена продукция VIM-2, у штамма *E. coli* 55/1389 установлено наличие другой МБЛ – VIM-4. Соответствующая кассета – *bla_{VIM-4}* была обнаружена в первой позиции In416-подобного интегона (GenBank Acc. № AJ704863). Нуклеотидная последовательность VIM-4-кодирующего интегона *E. coli* 55/1389 длиной 4457 пн была идентична In416, за исключением единственной замены – Т/Г, превращающей сильный кассетный промотор (PcS) в гибридный промотор PcH1. Перед блоком кассет присутствовал также неактивный вторичный промотор P2. Помимо *bla_{VIM-4}* в составе интегона были обнаружены кассеты: *aacA7*, *dfrA1*, неполная кассета *aadA1*, содержащая на 5' конце делецию 82 пн, и *smr*, кодирующая белок SMR (*small multidrug resistance*). ПЦР-картирование выявило наличие гена *tnpA* инсерционного элемента ISPa21 вместо типичных последовательностей на 3' конце интегона, так же как и у In416 (рис. 2).

Клональность и генетическое разнообразие МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa*. По данным MLVA типирования, все исследованные штаммы *P. aeruginosa* были разделены на 44 типа (соответствующие MLVA профили представлены в табл. 9). Кластерный анализ позволил отнести все,

за исключением трех отдельных MLVA типов, каждый из которых был представлен одним штаммом, к двум клональным группам (кластерам) (рис. 3).

Первый доминирующий кластер включал 36 родственных типов и 684 (96,3%) изолята, выделенных в 28 городах России, Беларуси и Казахстана в 2002–2010 гг. Все изоляты, принадлежащие к первому кластеру, имели одинаковую длину тандемных повторов *ms127* (225 пн), *ms172* (826 пн) и *ms142* (180 пн). У большинства изолятов данной группы длина амплификационного фрагмента *ms077* составляла 392 пн, у четырех наблюдалось отсутствие ПЦР-фрагмента, соответствующего данному локусу. Таким образом, различия между отдельными MLVA типами в пределах кластера определялись, в основном, полиморфизмом двух гипервариабельных локусов: *ms061* и *ms010*. Мультилокусное секвенирование-типирование 17 изолятов, выделенных в разных городах и относящихся к различным MLVA типам, входящим в доминирующий кластер, показало наличие у них идентичных аллельных профилей *acsA-aroE-guaA-mutL-nuoD-ppsA-trpE* (38-11-3-13-1-2-4), определяющих принадлежность к сиквенс-типу 235 (ST235), описанному нами впервые в 2006 г. (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Согласно данным BURST анализа, ST235 является «центральным» сиквенс-типом клонального комплекса 235 (CC235), который в настоящее время включает более 20 сиквенс-типов. У подавляющего большинства исследованных нами изолятов, относящихся к кластеру ST235 (n=677), были обнаружены идентичные по структуре интегоны (GenBank Acc. № DQ522233), несущие кассету *bla_{VIM-2}*. Данный факт является дополнительным подтверждением генетической родственности изолятов, выделенных в стационарах многих городов на территории трех

Таблица 9. Генотипы МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa* по данным MLVA, MLST и анализа структуры интегров

MLVA профиль (ms061-ms127- ms077-ms172-ms142-ms010)*	Количество (%) изолятов	Количество городов	Тип интегрона (GenBank Acc. №)**	Кластер***
109-225-392-826-180-185	387 (54,5)	21	DQ522233 ^s	ST235 ^a
109-225-392-826-180-191	83 (11,7)	15	DQ522233 ^s	ST235 ^a
115-225-392-826-180-185	44 (6,2)	9	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-173	27 (3,8)	5	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-179	23 (3,2)	5	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-197	23 (3,2)	6	DQ522233	ST235 ^a
109-225-392-826-180-209	20 (2,8)	1	DQ522233	ST235
103-225-392-826-180-185	9 (1,3)	4	DQ522233	ST235
115-225-392-826-180-155	8 (1,1)	2	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-215	6 (0,8)	2	DQ522233	ST235
115-225-392-826-180-191	6 (0,8)	4	DQ522233	ST235
115-225-392-826-180-179	5 (0,7)	1	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-161	4 (0,6)	1	DQ522233	ST235
121-225-392-826-180-185	4 (0,6)	3	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-167	3 (0,4)	2	DQ522233	ST235
97-225-392-826-180-185	3 (0,4)	1	DQ522233	ST235
97-225-392-826-180-191	3 (0,4)	2	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-203	2 (0,3)	2	DQ522233	ST235
115-225-392-826-180-173	2 (0,3)	2	DQ522233	ST235 ^a
115-225-392-826-180-209	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235 ^a
127-225-392-826-180-185	2 (0,3)	1	DQ522233	ST235
103-225-392-826-180-191	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
103-225-392-826-180-215	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
109-225-0-826-180-179	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
109-225-0-826-180-185	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
109-225-0-826-180-191	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
109-225-392-826-180-155	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
115-225-392-826-180-203	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
121-225-392-826-180-161	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
121-225-392-826-180-173	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
121-225-392-826-180-179	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
127-225-0-826-180-185	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
91-225-392-826-180-185	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
127-210-392-771-180-185	1 (0,1)	1	DQ522233	ST235
103-225-392-826-180-209	1 (0,1)	1	DQ522234 ^s	ST235 ^a
115-225-392-826-180-209	1 (0,1)	1	DQ522235	ST235
109-225-392-826-180-221	1 (0,1)	1	DQ522235 ^s	ST235 ^a
115-225-392-826-180-215	1 (0,1)	1	DQ522235	ST235
109-225-392-826-180-209	3 (0,4)	1	DQ522237 ^s	ST235 ^a
145-210-392-665-961-155	9 (1,3)	1	DQ522236	ST234 ^a
145-210-392-665-961-215	8 (1,1)	3	DQ522236 ^s	ST234 ^a
145-210-392-665-961-221	3 (0,4)	2	DQ522236	ST234 ^a
151-210-392-665-961-215	2 (0,3)	1	DQ522236	ST234
145-210-392-665-961-197	1 (0,1)	1	DQ522236	ST234
127-210-392-771-180-185	1 (0,1)	1	DQ522233	ST244 ^a
139-210-392-826-961-233	1 (0,1)	1	DQ522233	ST234 ^a
121-210-338-718-514-191	1 (0,1)	1	DQ522236	ST270 ^a

Примечание. * – числа указывают длину (в пн) ПЦР-фрагментов соответствующих VNTR локусов. 0 – означает отсутствие ПЦР-фрагмента;

** – типы интегров по данным ПЦР-ПДРФ анализа; s – у штаммов с соответствующими профилями MLVA структура интегров установлена путем секвенирования;

*** – кластеризация в соответствии с дендрограммой минимальных дистанций (см. рис. 3). Названия кластеров отражают соответствие сиквенса типам (ST), установленным с помощью MLST: ^a – для штаммов с соответствующими профилями MLVA определена принадлежность к соответствующему сиквенса-типу.

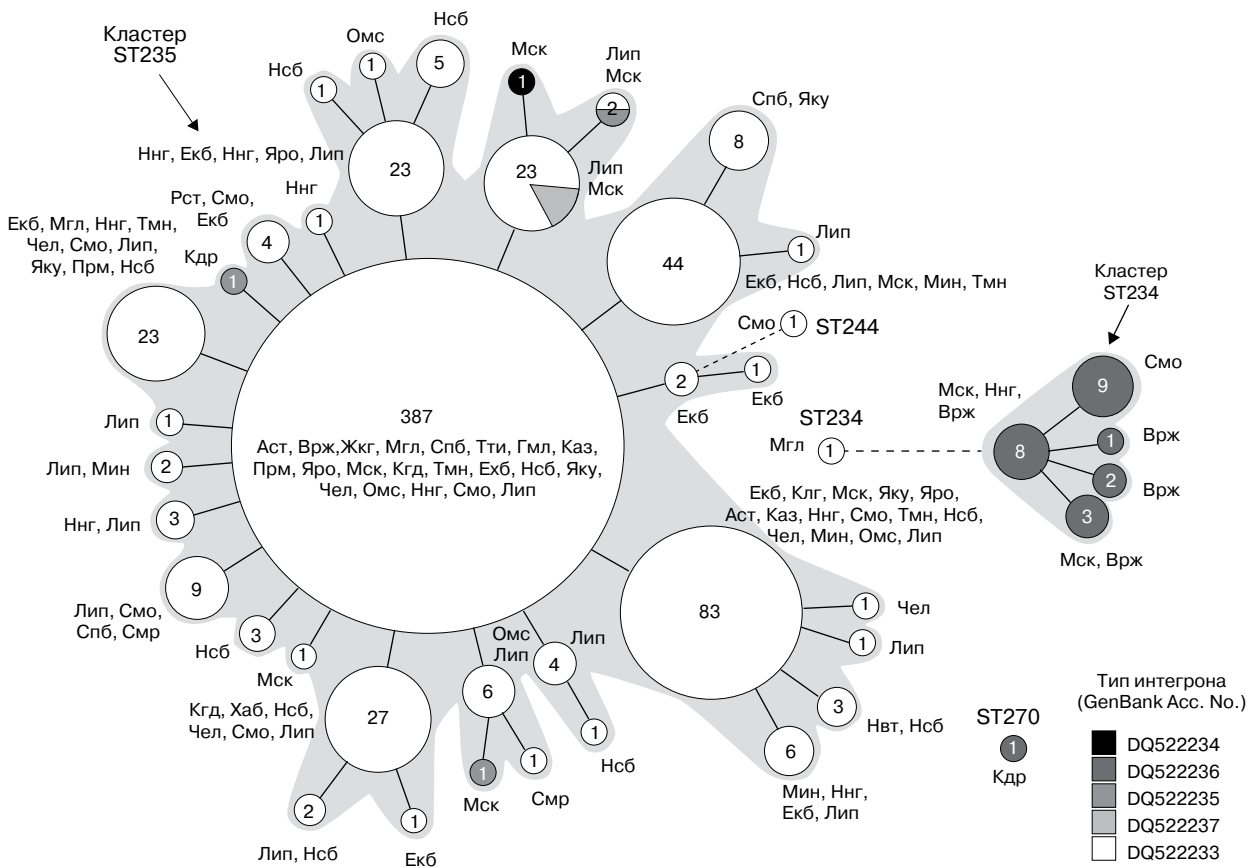


Рис. 3. Дендрограмма минимальных дистанций, построенная по результатам кластерного анализа MLVA профилей МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa*.

Узлы дендрограммы (круги) соответствуют различным типам (профилям) MLVA; размер каждого узла пропорционален числу изолятов, указанному в центре. Линии связывают родственные типы, отличающиеся минимальным числом VNTR локусов: различия в 1 локусе – сплошные линии, различия в 2 локусах – пунктирные линии. Кластеры ST235 и ST234 указаны стрелками. Названия городов, где были выделены штаммы, относящиеся к каждому типу, указаны в виде сокращений: Астана (Аст), Воронеж (Врж), Гомель (Гмл), Екатеринбург (Екб), Жесказган (Жкг), Казань (Каз), Калуга (Клг), Караганда (Кгд), Краснодар (Кдр), Липецк (Лип), Минск (Мин), Могилев (Мгл), Москва (Мск), Нижний Новгород (Ннг), Нижегородовск (Нвт), Новосибирск (Нсб), Омск (Омс), Пермь (Прм), Ростов на Дону (Рст), Санкт-Петербург (Спб), Самара (Смр), Смоленск (Смо), Тольятти (Тти), Тюмень (Тмн), Хабаровск (Хаб), Челябинск (Чел), Якутск (Яку), Ярославль (Яро).

стран. Вместе с тем, у 7 изолятов, также принадлежащих к ST235, были выявлены интегроны трех других типов, несущие гены разных МБЛ: VIM-2 (GenBank Acc. № DQ522234 и DQ522235) и IMP-30 (GenBank Acc. № DQ522237), что свидетельствует о возможности независимого приобретения МБЛ штаммами *P. aeruginosa* ST235.

Второй по размеру кластер объединял 5 MLVA типов, к которым принадлежали 23 (3,2%) изолята, выделенные в 4 городах России в 2002–2009 гг. Все изоляты данной группы характеризовались наличием идентичных профилей ПЦР-фрагментов: ms127 (210 пн), ms077 (392 пн), ms172 (665 пн) и ms142 (961 пн) и отличались только длиной тандемных повторов ms061 и ms010. Пять произвольно выбранных изолятов из данной группы,

выделенных в разных городах, были отнесены, по результатам MLST, к отдельному сиквенс-типу – ST234 (аллельный профиль *acsA-aroE-guaA-mutL-nuoD-ppsA-trpE*: 1-5-11-3-4-10-3). Принадлежность к кластеру ST234 коррелировала также с наличием определенного типа интегрона (GenBank Acc. № DQ522236), кодирующего VIM-2.

Интересно отметить, что МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa*, принадлежащие к двум основным генетическим кластерам и соответственно к двум различным сиквенс-типам – ST234 и ST235, были впервые выявлены в стационарах Москвы (ST234 и ST235) и Омска (ST235) приблизительно в одно и то же время в октябре 2002 г. Дальнейшее увеличение частоты МБЛ было связано преимущественно с клональным распространением VIM-2-

продуцирующих штаммов ST235 (DQ522233) и, в меньшей степени, ST234 (DQ522236), как внутри отдельных стационаров, так и между лечебными учреждениями разных городов. В нескольких стационарах было выявлено параллельное распространение штаммов, сходных фенотипически, но принадлежащих к двум разным генетическим группам: ST235 (DQ522233) и ST234 (DQ522236). Так, в одном из стационаров Смоленска первые МБЛ-продуцирующие штаммы *P. aeruginosa* были выделены в 2 разных отделениях в августе и октябре 2005 г. и относились соответственно к ST235 и ST234. Всего в 2005-2010 гг. в 4 отделениях данного стационара было выявлено 80 случаев инфекций, вызванных штаммом ST235 (DQ522233), и 10 – ST234 (DQ522236). В трех других стационарах соотношение числа штаммов вышеуказанных групп ($N_{ST235} : N_{ST234}$) существенно отличалось: 54:1 в центре № 1 (Нижний Новгород), 3:2 в центре № 2 (Москва), и 1:11 в центре №3 (Воронеж).

Несмотря на преобладающую роль клонального механизма распространения МБЛ, в ходе исследования была выявлена также возможность горизонтального переноса мобильных структур, несущих кассеты *bla*_{VIM-2}, а именно: в нескольких случаях было установлено наличие одинаковых VIM-2-

кодирующих интегров у генетически неродственных штаммов. В частности, наиболее распространенный интегрон (GenBank Acc. № DQ522233) присутствовал у трех выделенных в Могилеве изолятов *P. aeruginosa*, два из которых принадлежали к доминирующему кластеру ST235 и отличались только по одному VNTR локусу – ms061 (109 и 115 пн), а третий относился к ST234 (согласно результатам MLST) и отдельному MLVA типу, отличающемуся по 4 VNTR локусам: ms061 (139 пн), ms127 (210 пн), ms142 (961 пн) и ms010 (233 пн). Интегрон того же типа был обнаружен также у штамма, который был выделен в Смоленске и отличался от всех изолятов, входящих в кластер ST235, по данным MLST (ST244) и MLVA типирования: различия в двух VNTR локусах – ms127 (210 пн) и ms172 (771 пн)). Второй по частоте встречаемости интегрон (GenBank Acc. № DQ522236), характерный для всех изолятов кластера ST234, был дополнительно выявлен у неродственного штамма *P. aeruginosa* из Краснодара, обладающего уникальным MLVA профилем (ms061-ms127-ms077-ms172-ms142-ms010: 121-210-338-718-514-191 пн) и принадлежащего к ST270.

Данные, представленные на рис. 4, показывают, что МБЛ-продуцирующие штаммы, принадлежа-

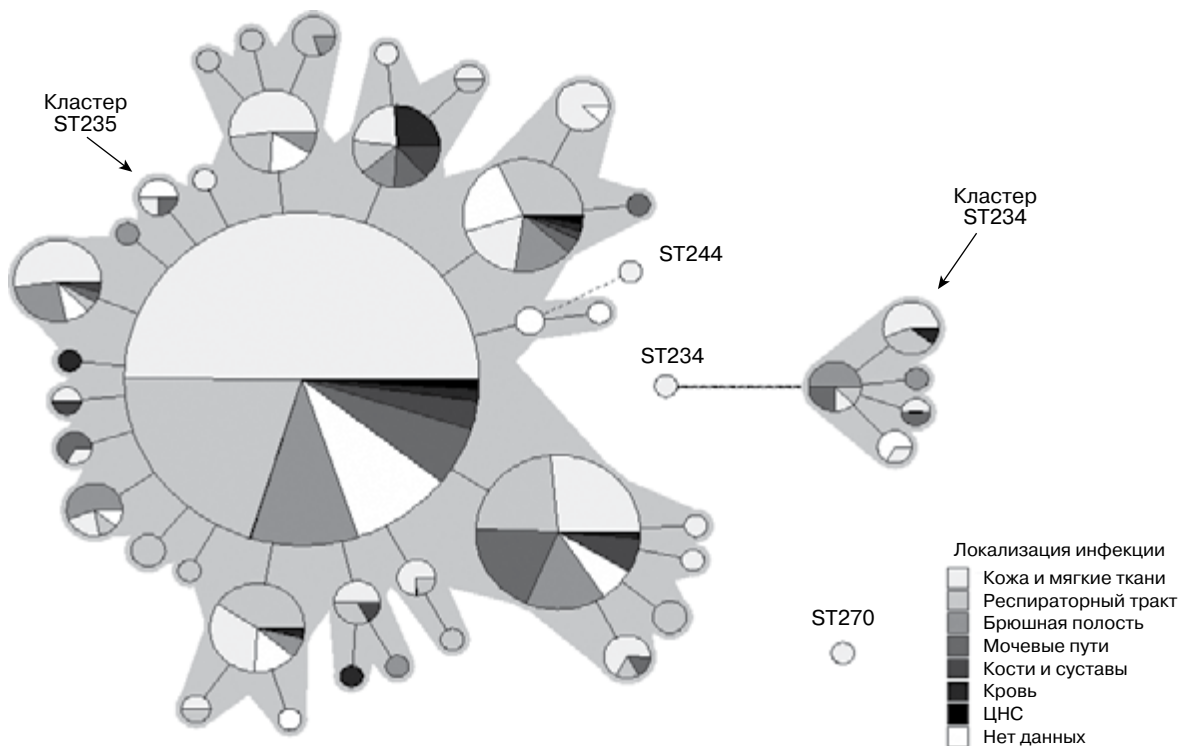


Рис 4. Распределение МБЛ-продуцирующих изолятов *P. aeruginosa* различных генетических групп по локализации инфекций. Кластеризация генотипов соответствует рис. 3.

щие к двум основным генетическим группам – ST235 и ST234, вызывали инфекции различной локализации. Доли изолятов, выделенных из крови, в обеих группах достоверно не отличались (2,4 и 4,8% соответственно; χ^2 тест, $p=0,51$).

Резистентность к полимиксину Е и полимиксину В была выявлена только среди изолятов группы ST235 (6,2%) и не встречалась среди изолятов ST234, однако данные различия были статистически недостоверны (χ^2 тест, $p=0,51$) вследствие значительно меньшего числа исследованных изолятов, принадлежащих к последней группе. Колистин-резистентные изоляты относились к 7 MLVA-типам и были выделены в 10 городах, что указывает на возможность независимого приобретения ими устойчивости к полимиксинам.

Обсуждение результатов

Резистентность к карбапенемам за счет экспрессии МБЛ у грамотрицательных бактерий является быстро растущей проблемой во всем мире. Наиболее частыми продуцентами «классических» МБЛ VIM- и IMP-типов являются бактерии рода *Pseudomonas*, значительно реже ферменты данных групп встречаются у других видов [6]. Штаммы *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter*, продуцирующие IMP β -лактамазы (главным образом – IMP-1) в основном распространены в странах Дальнего Востока – Японии и Корее [6, 11, 36]. Широкая циркуляция энтеробактерий, продуцирующих VIM-1 и родственные ферменты (VIM-4), отмечена в странах Средиземноморского бассейна, прежде всего в Греции, Италии, Испании и Франции [37–41]. По данным национального эпидемиологического исследования в Греции, доля изолятов *K. pneumoniae*, резистентных к имипенему за счет наличия VIM β -лактамаз, в различных отделениях стационаров по всей стране выросла с 2001 г. по 2006 г. от <1% до 20%, а в отделениях интенсивной терапии – до 50% [41]. В другом исследовании, проведенном в стационарах г. Афины, гены *bla*_{VIM-1} были выявлены у 37,6% изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из крови [42]. Кроме того, в последние годы отмечается тенденция стремительного распространения во всем мире штаммов *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter*, несущих гены МБЛ нового типа – NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) [13, 14, 16, 43–45]. Большинство случаев инфекций, вызванных NDM-продуцирующими штаммами, связано с их импортированием из стран Юго-Восточной Азии (Индии и Пакистана), где отмечается высокий уровень эндемичности NDM, а также из стран Балканского региона (Боснии, Сербии, Косово и Черногории) [15, 44, 46].

В ходе проведенного нами исследования МБЛ-продуцирующие штаммы *Acinetobacter* spp. выявлены не были, несмотря на то что в исследование было включено более 400 карбапенемнечувствительных изолятов *Acinetobacter* из 17 стационаров. Разумеется, данный результат не позволяет сделать вывод об отсутствии таких штаммов в России. В то же время, ранее проведенные нами исследования показывают, что более значимым механизмом устойчивости к карбапенемам у нозокомиальных штаммов *Acinetobacter baumannii* в России и Беларуси, так же как и в других странах, является продукция карбапенемаз класса D, относящихся к группам OXA-23, OXA-40 и OXA-58 [47, 48].

До 2010 г. нами был также выявлен единственный случай продукции МБЛ VIM-4 у штамма *E. coli*. Сходство структуры VIM-кодирующего интегрона у данного штамма и In416/In-e541-подобных интегронных, описанных у *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* и других видов энтеробактерий из стран Средиземноморья [49–57], позволяет сделать вывод об их вероятной эпидемиологической связи [58].

Наиболее важной проблемой, выявленной в ходе данного исследования, является стремительное распространение штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих МБЛ, в России и на территории соседних государств. Первые случаи инфекций, вызванных такими штаммами, были зарегистрированы в России в 2002 г. [59], – позже, чем в ряде европейских стран [5]. В 2002–2004 гг. доля МБЛ среди всех изолятов *P. aeruginosa* в ОРИТ многопрофильных стационаров России составила 4,5%. Однако уже в 2006–2007 гг. продукция МБЛ была выявлена у 20,3% нозокомиальных изолятов синегнойной палочки. Таким образом, распространенность МБЛ у штаммов *P. aeruginosa* в России существенно превысила соответствующие показатели в других странах в аналогичный период: 0,1% в Испании в 2007 г. [60], 0,8% в Греции в 2003 г. [61], 1,3% в Италии в 2008 г. [39], 1,9% в Японии в 2005 г. [62], 2,6% в Южной Корее в 2006 г. [63, 64]. Сходная частота встречаемости МБЛ у псевдомонад (18,9%) была описана только в Индии в 2009 г. [65]. Проспективное эпидемиологическое исследование «МЕТАЛЛ», в котором в 2005–2010 гг. приняли участие медицинские центры из России, Беларуси и Казахстана, выявило не только дальнейший рост числа случаев нозокомиальных инфекций, вызванных МБЛ-продуцирующими штаммами *P. aeruginosa*, но и значительные масштабы их географического распространения на территории трех стран.

Почти у всех исследованных нами изолятов было выявлено наличие VIM-2 – наиболее часто встречающейся у псевдомонад МБЛ. Лишь у

трех генетически и эпидемиологически родственных изолятов *P. aeruginosa* отмечена продукция IMP-30 – нового варианта IMP-1, отличающегося заменой одной аминокислоты (Glu59/Lys). МБЛ других типов у *P. aeruginosa* обнаружены не были. В другом отечественном исследовании у 31 (68,9%) из 45 карбапенеморезистентных изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в 9 городах РФ, с помощью ПЦР были выявлены гены VIM-1 МБЛ, причем в 25 (55,6%) случаях в сочетании с VIM-2 [66]. Тем не менее, анализ последовательностей ПЦР-праймеров, использованных в данной работе для амплификации внутреннего фрагмента гена *bla_{VIM-1}*, позволяет заключить, что данные праймеры не являются специфичными для определенного субтипа *bla_{VIM}*, и, следовательно, вывод о широком распространении VIM-1 у *P. aeruginosa* в России также не является достоверным. Преимущественное распространение VIM-2 подтверждается, помимо наших данных, и результатами исследования М.В. Кузнецовой и соавт., проведенного в Перми в 2008–2009 гг. [67].

Результаты MLVA и MLST типирования свидетельствуют о преимущественно клональном

распространении МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa* в России, Беларуси и Казахстане. Рост доли МБЛ-положительных штаммов в основном был обусловлен распространением эпидемических клонов ST235 и, в меньшей степени, ST234. ST235 является центральным сиквенс-типом клонального комплекса 235 (CC235) и известен как международный эпидемический клон. Глобальное распространение штаммов *P. aeruginosa* ST235 и родственных сиквенс-типов, входящих в CC235, описано в ряде публикаций [68–71]. В большинстве исследований отмечается множественная лекарственная устойчивость CC235. Интересно, что МБЛ VIM-типа (VIM-1) была впервые обнаружена в Италии в 1997 г. у штамма *P. aeruginosa*, принадлежащего к ST227 – однолокусному варианту ST235 [68, 72]. Впоследствии штаммы CC235, несущие гены различных МБЛ в составе разных интегров, были неоднократно выявлены во многих странах мира (табл. 10).

Помимо этого, в Турции, а затем и в Европе – Польше, Венгрии, Сербии, Франции, Испании и Бельгии была выявлена широкая циркуляция госпитальных штаммов ST235, продуцирующих

Таблица 10. Случаи обнаружения МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa* CC235 в различных странах (по данным литературы)

Страна (год выделения)	Сиквенс-тип	МБЛ-кодирующий интегрон	Комментарий	Ссылка
Италия (1997–2003)	ST227	VIM-1 (In70.2, In80, In107, In110, In85)	Нозокомиальные вспышки в нескольких стационарах	[39, 68]
Греция (2002)	ST230	VIM-4 (In118)	Спорадические случаи	[68]
Швеция (2001)	ST230	VIM-4 (In114)	Импортирование из Греции	[68]
Норвегия (2006)	ST235	VIM-4	Импортирование из Кипра	[73]
Венгрия (2005–2006)	ST235	VIM-4	Спорадические случаи	[74]
Сербия (2007)	ST235	VIM-2	Единичный изолят	[75]
Испания (2005–2008)	ST235	VIM-13	Спорадические случаи	[76]
Япония (2004–2006; 2009–2010)	ST235	IMP-1 (In113)	Доминирующий МБЛ(+) клон во многих стационарах	[77, 78]
Бельгия (2004–2008)	ST235	VIM-2, -4	Множественные случаи	[79]
Сингапур (2008)	ST235, ST745	VIM-2, IMP-1, -7	Спорадические случаи	[80]
Бразилия (2000–04)	ST235	SPM-1	Единичный изолят	[17]
Южная Корея (2011)	ST235	IMP-6	Доминирующий МБЛ(+) клон во многих стационарах	[81]
Хорватия (2001–2007)	ST235	VIM-2	Спорадические случаи	[82]

БЛРС: PER-1, OXA-17, -19, -28, BEL-1, GES-1 и карбапенемазы класса А: GES-5 [79, 83–88]. В Бельгии, Чехии и Франции ST235 был описан как доминирующий или один из основных полирезистентных клонов *P. aeruginosa* [70, 79, 83], а недавнее исследование М. Maatallah et al. выявило эпидемическое распространение CC235 по всему Средиземноморскому региону [69].

Четыре из пяти описанных нами типов МБЛ-кодирующих интегронов *P. aeruginosa* были выявлены у штаммов ST235, что еще раз доказывает исключительную способность штаммов данной генетической линии к формированию антибиотикорезистентности за счет независимого приобретения генов. В то же время, явное доминирование одного из интегронов (GenBank Acc. № DQ522233) среди изолятов ST235 является дополнительным подтверждением преимущественно клонального механизма распространения МБЛ в России, Беларуси и Казахстане. Идентичные или близкие по структуре VIM-2 кодирующие интегроны были выявлены у штаммов *P. aeruginosa* в нескольких странах: США, Тайване, Норвегии и Индии [33–35, 89]. Данные интегроны являются частью Tn5090/Tn402-подобных транспозонов, которые содержат полный набор генов (*tniA-C*), необходимых для

самостоятельной транспозиции [89]. Интересно отметить, что в рамках проведенного исследования нами были выявлены два случая вероятной передачи гена *bla*_{VIM-2} в составе Tn5090-ассоциированного интегрона от штаммов ST235 штаммам других сиквенс-типов: ST234 и ST244, последний из которых также известен как международный эпидемический клон [69, 86, 90]. Таким образом, ST235 является не только основным резервуаром, но и донором генов МБЛ для штаммов *P. aeruginosa* других генетических групп.

В заключение следует отметить, что распространение МБЛ-продуцирующих штаммов *P. aeruginosa* в стационарах России и соседних государств приняло масштабы наднациональной катастрофы. Ассоциированная резистентность к антибиотикам всех классов, за исключением полимиксинов, крайне ограничивает возможности терапии инфекций, вызванных такими штаммами. Особенно настораживающим является факт появления отдельных штаммов *P. aeruginosa* ST235, устойчивых к полимиксину E (колистину). В этой ситуации своевременная микробиологическая диагностика и строгое соблюдение мер инфекционного контроля в стационарах являются единственным путём сдерживания распространения МБЛ.

Литература

- Cornaglia G., Rossolini G.M. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2):99-101.
- Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6):371-9.
- Miriagou V., Cornaglia G., Edelstein M., et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2):112-22.
- Walsh T.R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 Suppl 6:2-9.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):306-25.
- Cornaglia G., Giamarellou H., Rossolini G.M. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; 11(5):381-93.
- Biondi S., Long S., Panunzio M., Qin W.L. Current trends in beta-lactam based beta-lactamases inhibitors. *Curr Med Chem* 2011; 18(27):4223-36.
- Bush K., Fisher J.F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65:455-78.
- Rossolini G.M., Condemi M.A., Pantanella F., Docquier J.D., Amicosante G., Thaller M.C. Metallo-beta-lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3):837-44.
- Livermore D.M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-84.
- Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10):1791-8.
- El Salabi A., Borra P.S., Toleman M.A., Samuelsen O., Walsh T.R. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-beta-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5):2241-5.
- Nordmann P., Poirel L., Walsh T.R., Livermore D.M. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011; 19(12):588-95.
- Toleman M.A., Spencer J., Jones L., Walsh T.R. *bla*_{NDM-1} is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5):2773-6.
- Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(5):355-62.
- Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_(NDM-1), and a

- novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12):5046-54.
17. Silva F.M., Carmo M.S., Silbert S., Gales A.C. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb Drug Resist* 2011; 17(2):215-20.
 18. Antoniadou A., Kontopidou F., Poulakou G., et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(4):786-90.
 19. Livermore D.M., Warner M., Mushtaq S., Doumith M., Zhang J., Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37(5):415-9.
 20. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 2012:1-73.
 21. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890_04). *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2004; 6(4):307-59.
 22. EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3. 2011:1-73.
 23. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. 2011; (31):165.
 24. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Металло- β -лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2007; 9(3):211-8.
 25. Woodford N., Tierno P.M., Jr., Young K., et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4793-9.
 26. Tsafnat G., Coiera E., Partridge S.R., Schaeffer J., Iredell J.R. Context-driven discovery of gene cassettes in mobile integrons using a computational grammar. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:281.
 27. Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(4):757-84.
 28. Onteniente L., Brisse S., Tassios P.T., Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11):4991-7.
 29. Shevchenko O., Edelstein M. Application of fluorescent MLVA for molecular typing of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains. 8th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers; 2008 May; Zakopane, Poland.
 30. DeWoody J.A., Schupp J., Kenefic L., Busch J., Murfitt L., Keim P. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques* 2004; 37(3):348, 50, 52.
 31. Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12):5644-9.
 32. Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini G.M., Spencer J., Dideberg O., Frere J.M. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3):660-3.
 33. Lolans K., Queenan A.M., Bush K., Sahud A., Quinn J.P. First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8):3538-40.
 34. Tseng S.P., Tsai J.C., Teng L.J., Hsueh P.R. Dissemination of transposon Tn6001 in carbapenem-non-susceptible and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(6):1170-4.
 35. Samuelsen O., Buaro L., Toleman M.A., et al. The first metallo-beta-lactamase identified in Norway is associated with a TnIC-like transposon in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate of sequence type 233 imported from Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1):331-2.
 36. Perez F., Hujer A.M., Hujer K.M., Decker B.K., Rather P.N., Bonomo R.A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(10):3471-84.
 37. Cagnacci S., Gualco L., Roveta S., et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolyzing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(2):296-300.
 38. Canton R., Akova M., Carmeli Y., et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5):413-31.
 39. Rossolini G.M., Luzzaro F., Migliavacca R., et al. First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(11):4023-9.
 40. Tato M., Coque T.M., Ruiz-Garbajosa P., et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis* 2007; 45(9):1171-8.
 41. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill* 2008; 13(4).
 42. Psychogiou M., Tassios P.T., Avlami A., et al. Ongoing epidemic of bla_{VIM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1):59-63.
 43. Giske C.G., Froding I., Hasan C.M., et al. Diverse Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to the Dissemination of bla_{NDM-1} in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5):2735-8.

44. Rolain J.M., Parola P., Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(12):1699-701.
45. Walsh T.R., Toleman M.A. The new medical challenge: why NDM-1? Why Indian? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(2):137-41.
46. Livermore D.M., Walsh T.R., Toleman M., Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis* 2011; 11(3):164.
47. Martinovich A., Shevchenko O., Edelstein M., Kozlov R. Assessment of carbapenem resistance and presence of acquired carbapenemases in Russian nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2008 April; Barcelona, Spain.
48. Martinovich A., Edelstein M., Kozlov R. Multilocus sequence typing of *Acinetobacter* strains from Russia and Belarus that produce acquired OXA carbapenemases. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2009 September; San Francisco, CA, USA.
49. Colinon C., Miriagou V., Carattoli A., Luzzaro F., Rossolini G.M. Characterization of the IncA/C plasmid pCC416 encoding VIM-4 and CMY-4 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(2):258-62.
50. Drieux L., Bourgeois-Nicolaos N., Cremniter J., et al. Accumulation of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in a single patient linked to the acquisition of multiple carbapenemase producers and to the in vivo transfer of a plasmid encoding VIM-1. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(2):179-80.
51. Kassis-Chikhani N., Decre D., Gautier V., et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(1):142-5.
52. Ktari S., Arlet G., Mnif B., et al. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(12):4198-201.
53. Loli A., Tzouveleki L.S., Tzelepi E., et al. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1}. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(3):669-72.
54. Miriagou V., Carattoli A., Tzelepi E., Villa L., Tzouveleki L.S. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8):3541-3.
55. Miriagou V., Papagiannitsis C.C., Kotsakis S.D., et al. Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the *bla*_{VIM-1} metallo-beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(10):4497-502.
56. Samuelsen O., Toleman M.A., Hasseltvedt V., et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(12):1811-6.
57. Ikonomidis A., Spanakis N., Poulou A., Pournaras S., Markou F., Tsakris A. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo-beta-lactamase and SHV-2a extended-spectrum beta-lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist* 2007; 13(4):221-6.
58. Shevchenko O.V., Mudrak D.Y., Skleenova E.Y., et al. First detection of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia. *Clin Microbiol Infect* 2012.
59. Stratchounski L., Kretchikov V., Edelshtein I., Kozlova I., Edelshtein M. First report of metallo-beta-lactamase production in *P. aeruginosa* strains isolated in different regions of Russia. 6th European Congress of Chemotherapy and Infection/24th Interdisciplinary Meeting of Anti-Infection Chemotherapy; 2004 December; Paris, France.
60. Gutierrez O., Juan C., Cercenado E., et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(12):4329-35.
61. Giakkoupi P., Petrikos G., Tzouveleki L.S., Tsonas S., Legakis N.J., Vatopoulos A.C. Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2):822-5.
62. Kimura S., Alba J., Shiroto K., et al. Clonal diversity of metallo-beta-lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):458-61.
63. Lee K., Lim C.H., Cho J.H., et al. High prevalence of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and increase of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in Korea: a KONSAR program in 2004. *Yonsei Med J* 2006; 47(5):634-45.
64. Lee K., Park A.J., Kim M.Y., et al. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J* 2009; 50(3):335-9.
65. Castanheira M., Bell J.M., Turnidge J.D., Mathai D., Jones R.N. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(3):1225-7.
66. Черкашин Е.А., Федорчук В.В., Иванов Д.В., Сидоренко С.В., Тишков В.И. Исследование распространенности металло-бета-лактамаз в Российской Федерации. *Вестн Моск Унив (Химия)* 2006; 47(3):83-6.
67. Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Егорова Д.О., Плотникова Е.Г., Демаков В.А. Карбапенемоустойчивые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах города Пермь. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2010; 12(3):246-52.
68. Giske C.G., Libisch B., Colinon C., et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12):4309-15.

69. Maatallah M., Cheriaa J., Backhrouf A., et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 2011; 6(10):e25617.
70. Nemeč A., Krizova L., Maixnerova M., Musilek M. Multidrug-resistant epidemic clones among bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic. *Res Microbiol* 2010; 161(3):234-42.
71. Woodford N., Turton J.F., Livermore D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(5):736-55.
72. Lauretti L., Riccio M.L., Mazzariol A., et al. Cloning and characterization of bla_{VIM} , a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7):1584-90.
73. Samuelsen O., Toleman M.A., Sundsfjord A., et al. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1):346-52.
74. Libisch B., Watine J., Balogh B., et al. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol* 2008; 159(3):162-8.
75. Lepsanovic Z., Libisch B., Tomanovic B., Nonkovic Z., Balogh B., Fuzi M. Characterisation of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2008; 55(4):447-54.
76. Juan C., Zamorano L., Mena A., Alberti S., Perez J.L., Oliver A. Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(3):474-8.
77. Kitao T., Tada T., Tanaka M., et al. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo-beta-lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(6):518-21.
78. Kouda S., Ohara M., Onodera M., et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the bla_{IMP-1} gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(1):46-51.
79. Glupczynski Y., Bogaerts P., Deplano A., et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(5):866-71.
80. Koh T.H., Khoo C.T., Tan T.T., et al. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel $bla_{(IMP-26)}$ gene. *J Clin Microbiol* 2010; 48(7):2563-4.
81. Seok Y., Bae I.K., Jeong S.H., Kim S.H., Lee H., Lee K. Dissemination of IMP-6 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(12):2791-6.
82. Sardelic S., Bedenic B., Colinson-Dupuich C., et al. Infrequent Finding of Metallo-beta-Lactamase VIM-2 in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Croatia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5):2746-9.
83. Cholley P., Thouverez M., Hocquet D., van der Meer Marquet N., Talon D., Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* 2011; 49(7):2578-83.
84. Danel F., Hall L.M., Duke B., Gur D., Livermore D.M. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(6):1362-6.
85. Danel F., Hall L.M., Gur D., Akalin H.E., Livermore D.M. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35(2):281-94.
86. Empel J., Filczak K., Mrowka A., Hryniewicz W., Livermore D.M., Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2829-34.
87. Libisch B., Poirel L., Lepsanovic Z., et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54(3):330-8.
88. Viedma E., Juan C., Acosta J., et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11):4930-3.
89. Toleman M.A., Vinodh H., Sekar U., Kamat V., Walsh T.R. bla_{VIM-2} -harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7):2636-8.
90. Lee J.Y., Song J.H., Ko K.S. Identification of nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced colistin susceptibility in Korea. *Microb Drug Resist* 2011; 17(2):299-304.